



II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

Kongresuko artikulu-bilduma

OSASUN ZIENTZIAK

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12

IRUÑEA, EUSKAL HERRIA





(c) 2017 Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)
Nafarroako Unibertsitateko Publikoa, Euskal Herriko Unibertsitatea
(UPV/EHU), Mondragon Unibertsitatea (MU), Deustuko Unibertsitatea (DU)
eta Nafarroako Unibertsitatea laguntzaileak izan dira edizio honetan.

(c) Egileak

Editoreak: Iñaki Alegria, Ainhoa Latatu, Miren Josu Omaetxebarria, Patxi Salaberri

Artikuluak *Creative Commons Aitortu-PartekatuBerdin 3.0* lizentziapean daude

ISBNa: 978-84-8438-627-8 Lan osorako

ISBNa: 978-84-8438-629-2 2. liburukia

DOI: <https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.2017.02>

Harremanetarako: argitalpenak@ueu.eus

UEU. Erribera 14 1 D. 48005 Bilbo. Tel.: 94 679 05 46

OSASUN ZIENTZIAK

Aurkibidea

Hitzaurrea.....	5
Batzordeak.....	7
STAT3 transkripzio faktorean gertatutako mutazio aktibatzaile batek jaioberriko diabetesa eragiten du intsulina sintesia murriztuz, <i>Teresa Velayos, Rosa Martínez, Milagros Alonso,</i> <i>Koldo Garcia-Extebarria, Anibal Aguayo, Cristina Camarero, Ines Urrutia, Idoia Martínez de</i> <i>Lapiscina, Raquel Barrio, Luis Castaño eta Izortze Santin.....</i>	10
Aho-aurreprietako mina pairatzen duten pazienteengan emozioen mimika eta alde-identifikaziorako gaitasuna neurtzeko tresna digitalen diseinu eta inplementazioa, <i>Ibane Aizpurua eta</i> <i>Jon Jatsu Azkue.....</i>	18
Ingurune aberastua: nerabezaroan alkoholarekin trataturiko C57BL6 saguen terapia eraginkorra?, <i>Irantzu Rico-Barrio, Sara Peñasco, Nagore Puente, Leire Reguero, Jon Egaña-Huguet, Ianire</i> <i>Buceta, Paula Torres-Maldonado, Inma Gerrikagoitia, Izaskun Elezgarai eta Pedro Grandes.....</i>	26
Haur Astinduaren Sindromearen inguruko hausnarketa eta Erizaintzaren esku hartzea, <i>Leire Astoreka</i> <i>Atxikallende eta Itziar Hoyos Cillero.....</i>	34
Euskal Herriko Unibertsitateko ikasleek dietan haragia eta honen eratorriak sartzeak dituen ondorioak berotegi gasen isurketan, <i>Nerea Telleria-Aramburu, Nerea Bermudez- Marin, Dolores Encinas,</i> <i>Ana María Rocandio, Saioa Telletxea, Nekane Basabe, Esther Rebato eta Marta Arroyo-Izaga.....</i>	42
Edizio genikoan oinarritutako estrategien garapena intzidentzia txikiko gibeletako gaixotasunen tratamendurako: I. motako hiperoxaluria primarioa, <i>Miren Barberia.....</i>	50
USP1 deubikitinasa pankrea-minbiziaren aurkako itxura terapeutiko gisa, <i>Anne Olazabal, Maria Sendino,</i> <i>Godefridus J Peters, Elisa Giovannetti eta Jose Antonio Rodriguez.....</i>	58
Tumoreak, estres sozialak eta estresari aurre egiteko estrategiek jokabide depresiboan eta garunaren aktibitatean duten eragina, <i>Olatz Goñi-Balentziaga, Oscar Vegas, Ainitze Labaka eta Larraitx</i> <i>Garmendia.....</i>	66
Venlafaxinaren eragina ezegonkortasun sozial kronikoa jasandako sagu emeen sistema serotoninergiko zentralean eta jokabidean, <i>Ainitze Labaka Etxeberria, Eneritz Gómez-Lázaro,</i> <i>Olatz Goñi-Balentziaga eta Larraitx Garmendia Rezola.....</i>	73
TRPV1-KO saguek epilepsia krisi arinagoak jasatearen zergatiak bilatzen, <i>Jon Egaña-Huguet,</i> <i>Irantzu Rico-Barrio eta Izaskun Elezgarai.....</i>	80
Elementu erregulatzaileen identifikazioa eritasun zeliakoan genoma osoko koadierazpen analisi bidez, <i>Irati Romero-Garmendia, Koldo Garcia-Etxebarria, Izortze Santin, Amaia Jauregi-Miguel,</i> <i>Leticia Plaza-Izurieta, Maria Legarda, Iñaki Irastorza, Nora Fernandez-Jimenez eta</i> <i>Jose Ramon Bilbao.....</i>	88
Analisi proteogenomikoak minbiziaren ikerkuntzan, <i>Alba Garin-Muga, Elizabeth Guruceaga,</i> <i>Fernando José Corrales eta Victor Segura.....</i>	94

Faktore genetikoak eta iskiotibialetako lesio muskularrak goi-mailako futbolarietan: asoziazio eta balioztatze ikerketa, <i>Jon Larruskain, David Celorrio, Irantzu Barrio, Adrian Odriozola, Susana Maria Gil, Jose Ramon Fernandez-Lopez, Raul Nozal, Isusko Ortuzar, Jose Antonio Lekue eta Jose Maria Aznar</i>	102
“In vivo” saiakerak kolon-ondesteko gibel metastasia hipertermia magnetikoaren bitartez tratatzeko, <i>Irati Rodrigo, Borja Herrero, Oihane Arriortua, Eneko Garaio, Fernando Plazaola, Jose Angel Garcia, Maite Insausti, Jose Javier Echevarría-Uraga eta Ignacio García-Alonso</i>	108
Jarduera fisikoa eta gorputz-osaeraren eragina hezur-dentsitate mineralean, <i>Gotzone Hervás, Fátima Ruiz-Litago, Idoia Zarrazquin, Amaia Caballero and Jon Irazusta</i>	114
Fe ₃ O ₄ nanopartikulen prestakuntza eta karakterizazioa, hipertermia magnetikoan aplikatzeko, <i>Itziar Galarreta, Oihane Arriortua, Idoia Ruiz de Larramendi, Izaskun Gil de Muro eta Maite Insausti</i>	120
MAGI2-ren aldaera genetikoaren asoziazioa eta adierazpen alterazioa eritasun zeliakoan, <i>Amaia Jauregi Miguel, Izortze Santin, Irati Romero Garmendia, Koldo Garcia Etxebarria, Iñaki Irastorza, Ainara Castellanos Rubio eta Jose Ramon Bilbao</i>	128
Glutamatoaren eta kannabinoideen neurohartzaileak hipokanpoko hilusean, <i>Aitor Medrano Peral, Sonia María Gómez Urquijo eta Pedro Rolando Grandes Moreno</i>	134
Melanomaren biomarkatzailerik lipidikoak, <i>Arantza Perez-Valle, Jone Garate, Cristina Penas, Roberto Fernández, Ainara Herraiz, Egoitz Astigarraga, Gabriel Barreda-Gómez, Laura Guevara, José Andres Fernández, Maria Dolores Boyano, Begoña Ochoa, Aintzane Asumendi eta Sergio Lage</i>	139
Zelulen banan-banako atxikipena lortzeko “Microcontact Printing” teknikaren garapena, <i>Maite Garcia-Hernando, Jaione Etxebarria- Elezgarai, Fernando Benito-Lopez eta Lourdes Basabe-Desmots</i>	145
Endokannabinoidak eta zerebeloaren garapena, <i>Ianire Buceta, Irantzu Rico, Jon Egaña, Inmaculada Gerrikagoitia, Pedro Grandes eta Izaskun Elezgarai</i>	153
Morfinak H3K27me ₃ histonaren antolamenduan sortutako eraldaketak inpronta genomikodun geneen adierazpenean duen eragin zuzenaren egiaztapena, ChIP-seq teknikaren bidez, <i>Iraia Muñoz Hoyos, Marta Gianzo Citores, Paloma Garcia, Jon Irazusta Astiazaran eta Nerea Subiran Ciudad</i>	160
Sistema kannabinoidearen funtzioa sagu oozitoen heltze-prozesuan, ernalketan eta enbrioiaren garapenean, <i>Lide Totorikaguena Iturriaga</i>	168

IKERGAZTE 2017

Nazioarteko Ikerketa Euskaraz

HITZAURREA

Duela 45 urte sortu zenetik, euskal komunitate zientifiko-intelektuala trinkotzea da UEUk duen helburu garrantzitsuenetako bat. Elkarren berri izatea ezinbestekoa da ezagutzak aurrera egin dezan, are gehiago gure kasuan, euskaraz lanean dihardugun ikertzaileak hain sakabanatuta egonda. Ildo horretatik, UEUk hainbat arlotako adituak bildu izan ditu zenbait ekimenetan azken hamarkadetan: Informatikari Euskaldunen Bilkurak (10 edizio) Historialari Euskaldunen Topaketak (5 edizio), Hizkuntzalari Euskaldunen Bilkura (2 edizio), Matematikari Euskaldunen Bilkura, Osasun Zientzietako eta Natur Zientzietako ikertzaileen bilkurak (2 edizio), besteak beste, horren adibide argiak dira.

Pozik esan dezakegu ikertzaile euskaldunak inoiz baino gehiago direla, baina tamalez, haien arteko ezagutza urria da oraindik. Hutsune horretaz jabetuta 2015. urtean antolatu genuen I. Ikergazte kongresua, Durangon, arrakasta handiz. Aurten maiatzaren 10, 11 eta 12an, Iruñean, bigarren Ikergazte kongresua antolatu dugu, Nafarroako Unibertsitate Publikoarekin elkarlanean, antzeko arrakastarekin. Ohiko kongresu zientifikoen moduan antolatu da: hitzaldi orokorrak, arlokako ahozko aurkezpenak zein posterrak, tailerrak eta saio osagarriak; baina ezaugarri berezi birekin: jakintza-arlo guztiak bilduta eta euskaraz.

“IkerGazte2017: Nazioarteko Ikerketa Euskaraz” goiburu duen kongresuaren artikuluko bilduma dugu hau. Izenburu horretan Ikerketa, Euskara eta Gaztetasuna bildu nahi izan ditugu. Ikusgarri egin nahi dugu Euskal Herriko ikertzaile gazteek egiten duten nazioarte mailako ikerketa. Maiz nazioartean erakutsi eta aurkezten dira lan horiek, Euskal Herrian eta euskaraz aurkezteko aukerarik izan gabe. Kongresu honen helburua komunitate-zientifiko euskaldunaren ikertzaileak bildu eta elkarren berri izatea da, arlo guztiak jorratuz; hasi humanitateetatik eta gizarte-zientzietatik, eta zientzia zehatz, natur zientzia, ingeniari, arkitektura eta osasun-arloetako gaietaraino. Nazioartean ingelesez argitaratu ohi diren lanak euskaraz ere argitaratzeko eta zabaltzeko aukeraren aldeko apustua da. Bigarren edizio hau ere euskaraz egindako ikerketan mugarri izango delakoan gaude!

Honelako kongresu bat aurrera ateratzeko ezinbestekoa da bai banakoen lan eskerga, baita erakunde publiko eta pribatu ugariaren laguntza ere: UEUko lan-taldea, Nafarroako Sostengu Taldea eta UEUkideak; Batzorde Zientifikoko ikertzaileak eta Batzorde Dinamizatzaileko ikergazteak; Unibertsitate eta Ikertalde laguntzaileak; aldizkari zientifikoak eta bestelako laguntzaileak. Aurten azpimarratzekoak dira Nafarroako Unibertsitate Publikoaren aldetik eta Nafarroako Gobernutik jasotako interesa eta babesa. Bestalde, Iruñeko Udalak eta Udalbiltzak sariak babestu dituzte. Horrez gain, hainbat pertsonak eta komunikabidek erakutsitako atxikimendua ere aipatu nahi dugu. Esker mila guztiei.

Egitarau interesgarri eta erakargarria da, arlo guztietako ekarpenak biltzen dituen; 63 ahozko aurkezpenak dira eta 59 poster modukoak. Guztira 122 komunikazio.

Hasieran, 136 komunikazio jaso ziren, baina gainbegiratze-prozesua gainditu ondoren 126 komunikazio hautatu ziren aurkezteko, eta horietatik 122 daude bilduma honetan.

Jakintza-arloei dagokionez hauek dira zenbakiak:

Giza Zientziak eta Arteak	25
Gizarte-Zientziak eta Zuzenbidea	24
Zientzia Zehatzak eta Natur Zientziak	27
Ingeniaritza eta Arkitektura	23
Osasun Zientziak	23

Ikertzaileen filiazioari dagokionez, espero bezala, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) da maizen aipatu dena, 88 ekarpenekin. Ondoren Mondragon Unibertsitatea (8 ekarpen), Nafarroako Unibertsitate Publikoa (7 ekarpen) eta Nafarroako Unibertsitatea (7 ekarpen) aurkitzen ditugu maizen. Deustuko Unibertsitatetik aurkezpen bat dago. Paueko Unibertsitatetik ere ekarpen bat egon da eta ekarpen bana Madrileko Unibertsitate Teknikotik, Bartzelonako Jaume I Unibertsitatetik eta Radboud Unibertsitatetik.

Unibertsitateei loturiko ikerketa-zentroak eta taldeak aipatzen dira ekarpenetako askotan, beherago aipatzen diren Ikertalde laguntzaileez gain, PIE, NU-Cima, NU-Tecnun, Hegoa Institutua, DeustoTech, BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, BCMaterials, DIPC, edo CIC-energyGUNE agertzen dira besteak beste.

Euskal Herritik kanpoko erakundeei dagokienez, hauek dira lankidetzan aipatzen diren unibertsitateak: Curtin University, University of Antwerpen, Stockholm University, Tecnológico de Monterrey, Australian Nuclear Science and Technology Organisation (ANSTO), University of Birmingham.

Eta bi urtean behin errepikatzeko asmoa dugu. Beraz, adi, Ikergazte2019 etorriko da-eta!

Iñaki Alegria, Ainhoa Latatu, Miren Josu Omaetxebarria, Patxi Salaberri

BATZORDEAK

Batzorde Zientifikoa

Batzordeburua:

Miren Josu Omaetxebarria (UPV/EHU, UEU)
Patxi Salaberri (NUP)

Idazkaria:

Edurne Koch (UEU)
Ainhoa Latatu (UEU)

Giza Zientziak eta Arteak

Itziar Aduriz (Bartzelonako Unibertsitatea, UEU)
Mikel Aizpuru (UPV/EHU, UEU)
Enara Artetxe (UPV/EHU, UEU)
Aritz Irurtzun (CNRS-IKER, UEU)
Paula Kasares (NUP, UEU)
Kepa Korta (UPV/EHU)
Aitzpea Leizaola (UPV/EHU, UEU)
Elizabete Manterola (UPV/EHU, UEU)
Ismael Manterola (UPV/EHU, UEU)
Blanca Urgell (UPV/EHU)

Gizarte Zientziak eta Zuzenbidea

Luzia Alberro (Deustuko Unibertsitatea)
Josu Amezaga (UPV/EHU, UEU)
Ritxar Arlegi (NUP, UEU)
Aitor Bengoetxea (UPV/EHU, UEU)
Eneko Bidegain (MU, UEU)
K. Josu Bijuesca (Deustuko Unibertsitatea)
Lore Erriondo (UPV/EHU, UEU)
M^aLuz Esteban (UPV/EHU, UEU)
Mikel Iruskieta (UPV/EHU, UEU)
Xabier Landabidea (Deustuko Unibertsitatea, UEU)
Jean-Michel Larrasquet (ESTIA, UEU)
Nerea Mujika (Deustuko Unibertsitatea)
Iñaki Peña (Deustuko Unibertsitatea)

Zientzia Zehatzak eta Natur Zientziak

Elizabete Alberdi (UPV/EHU, UEU)
Itziar Aretxaga (INAOE)
Arturo Elosegi (UPV/EHU, UEU)
Nestor Etxebarria (UPV/EHU, UEU)
Arantza Garcia Lekue (DIPC)
Maite Insausti (UPV/EHU)
Kizkitza Insausti (NUP)
Marian Iriarte (UPV/EHU)
Natxo Irigoien (NUP)
Josu Jugo (UPV/EHU, UEU)

Ingeniaritza eta Arkitektura

Olatz Arbelaitz (UPV/EHU, UEU)
Gorka Azkune (Deustuko Unibertsitatea)
Gabriel Ibarra (UPV/EHU)
Karmele Lopez de Ipiña (UPV/EHU, UEU)
Maialen Sagarna (UPV/EHU)
Arkaitz Zubiaga (University of Warwick)

Osasun Zientziak

Rafael Aldabe (CIMA, NU)
Jose Ramon Bilbao (UPV/EHU, Gurutzetako Ospitalea)
Koldo Callado (UPV/EHU, UEU)
Izaskun Elezgarai (UPV/EHU, UEU)
Felix Elortza (Biogune, UEU)
Karlos Ibarguren Olalde (Osakidetza)
Xabier Isasi (UPV/EHU, UEU)
Nerea Osinalde (UPV/EHU)

Beste gainbegirale batzuk

Lorea Agirre (Jakín)
Iñaki Alegria (UEU)
Ander Altuna (UEU)
Unai Lopez (Deusto)
Iñigo Mendialdua (EHU)

Batzorde Dinamizatzailea

Borja Ariztimuño (UPV/EHU)
Garazi Arrula (UPV/EHU)
Haritz Iribas (NUP)
Eñaut Izagirre (UPV/EHU, UEU)
Olatz Pereda (UPV/EHU, UEU)
Olatz Perez de Viñaspre (UPV/EHU, UEU)
Libe Solagaistua (UPV/EHU, UEU)

Batzorde Teknikoa

Ane Sarasua (UEUko idazkari nagusia)
Idoia Torregarai (komunikazio-arduraduna)
Ainhoa Latatu (koordinatzailea)
Edurne Koch (koordinatzaile teknikoa)

Ikerketa-talde laguntzaileak

- ADIAN. UPV/EHUko Informatika Fakultateko Ikerketa Taldea (Aldapan, Egokituz eta DSG ikerketa-taldeak barneratzen ditu).
- AFIT. UPV/EHUko Antropologia Feminista Ikerketa Taldea.
- DEUSTU-EUSKAL GAIK. Deustuko Unibertsitateko Euskal Gaien Institutua.
- EUDIA – UPV/EHUko Euskararen barietatea aztertzeke ikerketa-taldea.
- GOGO ELEBIDUNA – Psikolinguistika Laborategia.
- HEZIKOM. Mondragon Unibertsitateko HUHEZI Fakultateko Hezkuntza eta Komunikazioaren inguruko ikerketa-taldea.
- IXA. UPV/EHUko hizkuntzaren tratamendu automatikoaren inguruko ikerketa-taldea.
- Jokabide-Ekologia eta Eboluzioa Saguzarretan Ikerketa Taldea. UPV/EHU.
- NOR. UPV/EHUko Ikus-entzunezko Komunikazio eta Publizitate Saileko Ikerketa Taldea.
- PARTE HARTUZ. UPV/EHUko Politika eta Administrazio Zientzia Saileko Ikerketa Taldea

Aldizkari zientifiko laguntzaileak

- EKAIA. Euskal Herriko Unibertsitateko zientzia- eta teknologia-aldizkaria da.
- ELHUYAR ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA aldizkaria.
- GOGOIA. Euskal Herriko Unibertsitateko Logika, Kognizio, Hizkuntza eta Informaziorako Institutuak (ILCLik) egindako aldizkaria da.
- JAKIN. Giza eta gizarte-zientzien alorreko kultur aldizkaria.
- SENEZ. EIZIE elkarteak kudeatzen duen itzulpengintzaren arloko aldizkaria.
- TANTAK. Euskal Herriko Unibertsitateko hezkuntzari buruzko aldizkaria da.
- UZTARO. UEUk kudeatzen duen giza eta gizarte-zientziei buruzko aldizkaria.

Hizlari gonbidatuak

- Laurence Tresse, Lyoneko Astrofisika Ikerketa Zentroko zuzendaria.
- Jose Ramon Etxebarria, UPV/EHUko irakasle eta ikertzailea, UEUkidea.
- Arkaitz Carracedo, Ikerbasqueko ikertzailea eta CIC bioGUNEn ikerketa-taldeko burua.
- Elin Haf Gruffyd Jones, Aberystwyth Unibertsitateko irakasle eta ikertzailea.

Tailerrak

- «Komunikazioa errazteko teknikak». Amagoia Lauzirika. Jendaurreko komunikazio eta haren gaitasunen garapenerako trebatzailea.
- «Informazioaren irudikapena. Nondik hasi?». Vega Asensio. Biologian doktorea eta Zientzia Bisualean eta Ilustrazio Zientifikoan aditua.
- «Euskaraz hobeto idazteko tailerra». Ander Altuna. UEUren argitalpenen hizkuntza-arduraduna.
- «Ingurune digitalaren inguruko ikerketak diziplina aniztasunaren ikuspegitik: sarea egiten». Errota digitala. Ikerketarako, dibulgaziorako eta formaziorako elkarteak #Audiences #Transmedia #MediaEcology #MinorityLanguages.
- «Bibliografiaren kudeaketa Zotero erabiliz». Juanan Pereira. UPV/EHUko irakasle eta ikertzailea.
- «Ikerketatik irakaskuntzara: gaitasun digitala giltzarri». Amaia Arroyo eta Rakel Gamito. Konpetentzia digitaletan eta on-line irakaskuntzan adituak.

Mahai-inguruak

- «Ikerketa eta politika. Politika eta ikerketa». Gidaria: Josu Amezaga. UPV/EHUko Gizarte eta Komunikazio Zientzien fakultateko irakasle eta ikertzailea. Parte-hartzaileak: Itziar Alkorta (UPV/EHU), MLuz Esteban (UPV/EHU), Inmaculada Arostegi (UPV/EHU), Emilio Majuelo (NUP).
- «Euskarazko aldizkari zientifikoen etorkizuna». Gidaria: Xabier Isasi. UPV/EHUko irakasle eta ikertzailea. Parte-hartzaileak: Belen Uranga (BAT), Asier Vallejo (EKAIA), Aitziber Agirre (ELHUYAR), Karlos del Olmo (SENEZ) eta Gidor Bilbao (UZTARO).

STAT3 transkripzio faktorean gertatutako mutazio aktibatzaile batek jaioberriko diabetesa eragiten du intsulina sintesia murriztuz

Velayos Teresa¹, Martínez Rosa¹, Alonso Milagros², Garcia-Etxebarria Koldo³, Aguayo Anibal¹,
Camarero Cristina², Urrutia Ines¹, Martínez de LaPiscina Idoia¹, Barrio Raquel², Castaño Luis¹,
Santin Izortze¹

¹Endocrinologia eta diabetes ikerketa taldea, Gurutzetako unibertsitate ospitalea, BioCruces,
CIBERDEM, CIBERER, UPV-EHU, Barakaldo, Euskal herria, Espainia

²Endocrinologia pediatrikoa, Ramon y Cajal unibertsitate ospitalea, Madrid, Espainia

³Immunogenetika laborategia, Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalia Fisiologia Saila, Biocruces,
UPV-EHU, Leioa, Euskal Herria, Espainia

teresa.velayosgainza@osakidetza.eus

Laburpena

Jaioberriko diabetes mellitusa (DMN) bizitzako lehen sei hilabeteetan garatzen den diabetes mota arraro bat da. Kasu gehienetan diabetes isolatu bezala ematen da, baina agertu daiteke beste egoera patologiko batzuekin batera, gaixotasun autoimmuneak kasu. Exoma osoaren sekuentziazioaren bitartez *STAT3* transkripzio faktorearen DNARA lotzeko domeinuan mutazio aktibatzaile berri bat identifikatu dugu jaioberriko diabetesa duen paziente batean. Gure ikerketa funtzionalek agerian utzi dute mutazio honek *STAT3* transkripzio faktorearen hiperaktibazioa eragiten duela eta honek, era berean, eragina duela zelula beta pankreatikoaren funtzioan. Konkreteki, identifikatutako mutazioak Isl-1 transkripzio faktorearen inhibizioa eragiten du eta ondorioz, intsulinaren adierazpena gutxitzen da.

Hitz gakoak: jaioberriko diabetesa, *STAT3*, mutazio aktibatzailea, Isl-1, intsulina.

Abstract

Neonatal diabetes mellitus (NDM) is a rare form of diabetes diagnosed within the first 6 months of life. Most cases of NDM involve isolated diabetes, but sometimes NDM appears in association with other pathological conditions, including autoimmune diseases. By using whole-exome sequencing, we identified a novel missense mutation in the binding domain of the STAT3 protein in a patient with NDM. The functional analyses showed that the mutation results in an aberrant activation of STAT3, leading to deleterious downstream effects in pancreatic b-cells. The identified mutation leads to hyperinhibition of the transcription factor Isl-1 and, consequently, to a decrease in insulin expression.

Key words: neonatal diabetes, STAT3, activating mutation, Isl-1, insulin.

1. Sarrera

Jaioberriko diabetes mellitusa (DMN) bizitzako lehen sei hilabeteetan garatzen den diabetes mota arraro bat da (Murphy R et al., 2008; Naylor RN et al., 2011; Vaxillaire M et al., 2009). DMN kasuen erdia iragankorra den arren, badaude iraunkorrak diren kasuak, eta azken hauek tratamendua behar dute bizitza osoan zehar (Murphy R et al., 2008; Naylor RN et al., 2011; Vaxillaire M et al., 2009). Ikerketa genetikoek gaixotasun honi asoziaturiko hainbat mutazio puntual eta alterazio kromosomiko identifikatu dituzte 20 genetean, gene hauek, beta zelulen garapenean, glukosaren metabolismoan, mintzaren despolarizazioan edota apoptosian parte hartzen dutelarik (Murphy R et al., 2008). Kasu ohizkoenak 6q24 eskualdearen, KATP kanalak kodifikatzen dituzten geneetako (*KCNJ11* eta *ABCC8*) alterazioek edota intsulina genearen alterazioek eragiten dituzte.

Kasu gehienetan diabetes isolatu bezala aurkezten da, baina agertu daiteke beste egoera patologiko batzuekin batera, gaixotasun autoimmuneak kasu (Polak M et al., 2007). Egoera horren adibiderik ohizkoena IPEX sindromea da, zeina *FOXP3* genean agertzen diren mutazioek eragiten duten (Bennet CL

et al., 2001; Verbsky JW et al., 2013). Berriki argitaratutako ikerketa batek, *STAT3* genearen (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) mutazio aktibatzaileak diabetesa barneratzen duen garapen goiztiarreko gaixotasun autoimmune batekin asoziatu dituzte (Flanagan SE et al., 2014).

STAT3 transkripzio faktorea, seinale desberdinek aktibatzen dute, zitokinak, hazkuntza faktoreak edota hormonak, besteak beste (Abroun S et al., 2015; Levy DE et al., 2002). Transkripzio faktore honen aktibazioa zitoplasman gertatzen da, eta funtzio biologiko desberdinen erregulazioan parte hartzen du, adibidez, zelulen diferentziazioan, zelulen proliferazioan, apoptosian edota inflamazioan (Abroun S et al., 2015; Levy DE et al., 2002). Transkripzioaren aktibatzaile edo inhibitzaile bezala joka dezake, beste transkripzio faktore batzuekin edo koaktibatzaile/koerrepresoreekin elkarrekinez (Caldenhoven E et al., 1996). Pankrean, *STAT3* transkripzio faktorearen bidezidorrak oinarritzkoak dira organo honen funtzio endokrinoaren garapen eta mantentze egokirako (Kostromina E et al., 2010). Arratoietan eginiko ikerketetan ikusi da leptinaren bidezko *STAT3* faktorearen aktibazioak oinarritzko eginkizuna duela intsulina jarioaren inhibizioan (Chen J et al., 2013).

2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa genetikoek gaixotasun honi asoziatutako hainbat mutazio puntual eta alterazio kromosomiko identifikatu dituzten arren, DMN duten %20aren erantzule genetikoak identifikatzeko daude (Naylor RN et al., 2011). Gaixo bakoitzaren diabetesaren etiologiaren ezagutza handitzeaz gain, erantzule genetikoaren identifikazioak ezinbesteko informazioa ematen du tratamendu eta aholku genetiko egokiak ematerako orduan. Era berean, paziente bakoitzean diabetesak izango duen bilakaera aurreraketa baimentzen du.

Hori dela eta, ikerketa honen helburu nagusiak bi dira.

- 1) Diabetes neonatalari asoziatutako gene berrien bilaketa, exoma osoaren sekuentziazioaren bitartez
- 2) Identifikaturiko mutazio potentzialen *in vitro* azterketa funtzionala zelula beta pankreatikoetan

3. Ikerketaren muina

3.1. Mutazioen bilaketa exoma osoaren sekuentziazioaren bitartez

Exoma osoaren sekuentziaziorako, DMN pairatzen duen emakume bat eta bere gurasoak aukeratu ziren. Sekuentziazioaren ostean, lortutako datuak erreferentziazko giza genoma (UCSC GRCh37/hg19) erabilita mapeatu ziren. Mapaketa hau, duplikatuen ezabaketa, kalitaterako errekalibrazioa, SNP/DIP identifikazioa eta anotazioa *Whole-Exome sequencing Pipeline web tool* lanabes informatikoaren laguntzaz burutu ziren (D'Antonio M et al., 2013). Behin kalitate parametroak aplikatuta, irizpide desberdinak ezarri genituen filtrazioarekin jarraitzeko, hautagai posible bat bilatzeko helburuz. Horretarako, gaixotasunaren izaera genetiko eta klinikoa kontuan hartu genituen.

Jarraian, *in silico* predikzioa erabili genuen bariante horietatik potentzialki kaltegarriak izan zitezkeenak aukeratzeko. Horrela, 4 barianterekin geratu ginen. Azkenik, bilaketa bibliografiko bat burutu genuen PUBMED datubasean, aukeraturiko lau gene horiek zelula pankreatikoekin erlazioaturiko funtzio interesgarriak zuten ikusteko (pankrearen garapena, beta zelula pankreatikoen diferentziazioa, eta abar.).

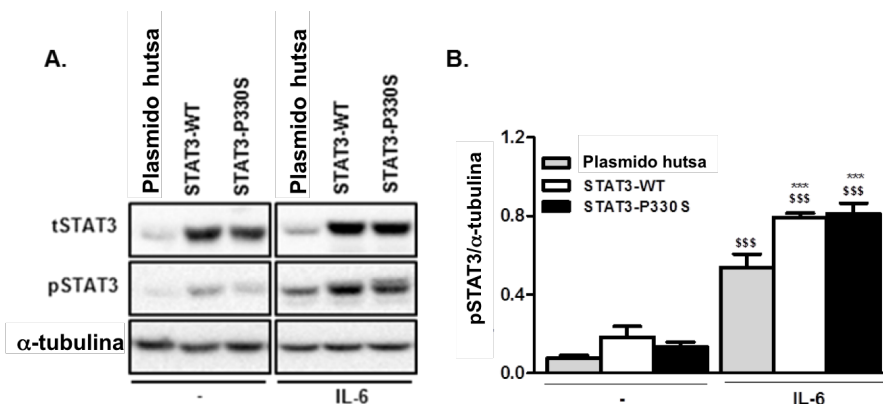
Filtro eta bilaketa horien ostean, *STAT3* genean identifikatu genuen bariantea aukeratu genuen gaixotasunaren kausa genetiko potentzial bezala (c.988C>T; p.Pro330Ser). Alterazioa Sanger sekuentziazioaren bidez baieztatu genuen pazientean, eta baztertu gurasoen kasuan. *STAT3* transkripzio faktoreak duen DNA lotzeko domeinuan kokatzen zela ikusi genuen, domeinu horretan kokaturiko mutazioak garapen goiztiarreko gaixotasun autoimmuneari asoziatutak deskribatu direlarik (Haapaniemi EM et al., 2015; Milner JD et al., 2015; Wienke J et al., 2015).

3.2 STAT3 transkripzio faktorean identifikaturiko mutazioaren karakterizazioa

STAT3 transkripzio faktorea fosforilazio bidez aktibatzen da. Horrek, transkripzio faktorearen dimerizazioa, nukleorako translokazioa eta DNARA lotzea eragiten du (Darnell Je et al., 1994). Aurretiaz deskribatu izan da STAT3ak dituen zenbait Serinetan gertaturiko aldaketek fosforilazioan eragina izan ditzaketela, baita aktibazio prozesuan ere (Decker T eta Kovarik P, 2000). Guk identifikatutako mutazio berriak 330 posizioan dagoen Prolina (fosforilatu ezin daitekeen aminoazidoa) Serina (fosforilatu daitekeen aminoazidoa) batengatik ordezkutzen du, beraz fosforilatu daitekeen gune potentzial berri bat sortzen da eta honek aktibazioan eragina izan dezake.

Zenbait estimulu aktibatu dezakete STAT3 transkripzio faktorea, horien artean interleukina 6 (IL-6) zitokina. Hori dela eta, STAT3 proteinaren kantitate maila neurtu genuen bai egoera basalean baita IL-6 bidez eginiko tratamenduaren ostean ere (1. Irudia). Egoera basalean zein IL-6rekin eginiko tratamendurekin, STAT3 proteina totalaren (tSTAT3) maila oso baxua zen. Aldiz, gainadierazpen plasmidoekin transfektaturiko zeluletan, bai WT eta bai mutantearen kasuan, STAT3 totalaren maila altuagoa zen (1A irudia). Egoera basalean, STAT3 fosforilazio maila oso baxua zen (pSTAT3) eta ez zen desberdintasunik antzematen WT eta STAT3 mutantearekin transfektaturiko zelulen artean (1A-1B irudiak). IL-6 zitokinarekin eginiko tratamenduak STAT3 proteinaren fosforilazioa areagotzen zuen baina desberdintasunik ez zen nabaritzen WT eta STAT3 mutatuarekin transfektaturiko zelulen artean. Emaiza horiekin ondorioztatzen dugu P330S mutazioak ez duela eraginik STAT3aren fosforilazio mailan, ez tratamendurik gabeko baldintzapean, ezta trataturiko baldintzapean ere.

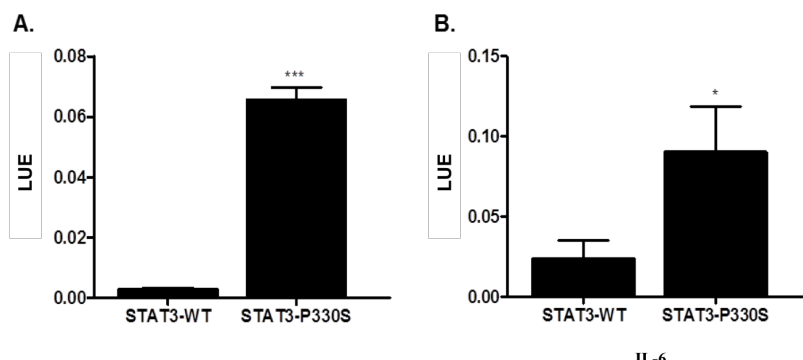
1. Irudia. STAT3 proteina mailaren analisisia.



(A-B) INS-1E zelulak plasmido hutsarekin edo STAT-WT eta STAT3 mutantearekin (STAT3-P330S) transfektatu ziren. Zelulak tratatu gabe uzi ziren (-) edo IL-6rekin (20ng/ml) tratatu ziren 12 orduz. STAT3 totalaren (tSTAT3) eta fosforilatutako STAT3ren (pSTAT3) adierazpena Western blot bidez neurtu zen α -tubulina kontrol bezala erabiliz. Emaitzak hiru esperimentu independenteren erakusgarri dira (A) eta dentsitometria emaitzak (B) batezbestekoa $\pm$ batezbestekoaren errore tipikoa bezala adierazita daude. $^{SSS}p < 0.001$ vs (-) eta plasmido berdinarekin transfektaturikoak; $^{***}p < 0.001$ vs plasmido hutsa IL-6 tratamendurekin (*t* testa).

Bestalde, mutazioa DNARA lotzeko domeinuan kokatuta egonik, eta jakinik, STAT3aren funtzioa beste gene batzuen transkripzioa erregulatzea dela, mutazioak STAT3aren aktibitate mailan eraginik zuen aztertu genuen (2. Irudia). Horretarako luziferasa esperimentu bat egin genuen. Trataturik gabeko zeluletan, STAT3 mutantearen aktibitatea 23 aldiz handiagoa da STAT3-WTarekin konparatzen badugu (2A irudia). Mutazioak aktibitatearen areagotzea eragiten du ere IL-6rekin tratatuz gero, baina kasu honetan emendapena txikiagoa da (3.8 inguru) (2B irudia). Emaiza hauek frogatzen gute P330S mutazioak STAT3 transkripzio faktorearen hiperaktibazioa eragiten duela eta aktibazio hau fosforilazio egoerarekiko independentea dela.

2. Irudia. STAT3 transkripzio faktorearen aktibitatearen analisisa



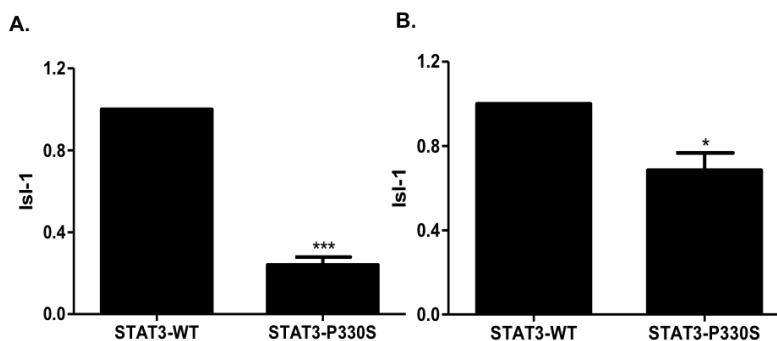
(A-B) INS-1E zelulak STAT3-WT edo STAT3-P330S, eta STAT3ari erantzuten dion luziferasa daraman plasmidoarekin transfektatu ziren. 24 ordu eta gero, zelulak tratatu gabe uzi ziren (-) edo IL-6rekin (20ng/ml) tratatu ziren 12 orduz. Ostean luziferasa aktibitatea neurtu zen. Emaizak 6 esperimentu independenteren batezbestekoa $\pm$ batezbestekoaren errore tipikoa dira eta luziferasa unitate erlatibo (LUE) bezala adierazita daude. *** $p < 0.001$ eta * $p < 0.05$ vs STAT3-WT plasmidoarekin transfektatutakoak (t testa).

3.3. STAT3 faktorearen hiperaktibazioak zelula beta pankreatikoan dituen eraginaren analisisa

Kontuan izanik STAT3ak funtzio garrantzitsuak dituela beta zeluletan, adibidez, insulina jarioaren erregulazioan (Chen J et al., 2013; Kostromina E et al., 2010), identifikaturiko mutazioak bidezidor horietan izan dezakeen eragina aztertzea erabaki genuen. Intsulinarean adierazpena transkripzio faktore desberdinek erregulatzen dute, adibidez, Pax4, Nkx6.1, Maf, Foxa, Pdx1, eta Isl-1. Iragarpen bioinformatiko baten bitartez ikusi genuen intsulinarean adierazpena erregulatzen zuten transkripzio faktoreen artean hiruk (Isl-1, PAX6 eta LMX1A) STAT3 lotzeko domeinu potentzialak dituztela beraien promotoreetan.

Ikerketa lerro hau jarraituz, gure mutazioak Isl-1, PAX6 eta LMX1A transkripzio faktoreen adierazpenean eraginik zuen aztertu genuen bai arratoi zeluletan eta bai giza zeluletan. Analisi hau burutzeko, transkripzio faktore hauen mRNA maila aztertu zen WT eta STAT3 mutantearekin transfektaturiko zeluletan. PAX6 eta LMX1A adierazpenean aldaketarik nabaritzen ez zen bitartean (ez da irudia erakusten), Isl-1 faktorearen adierazpena %75 eta %32 murrizten zen arratoi eta giza zeluletan hurrenez hurren (3. Irudia).

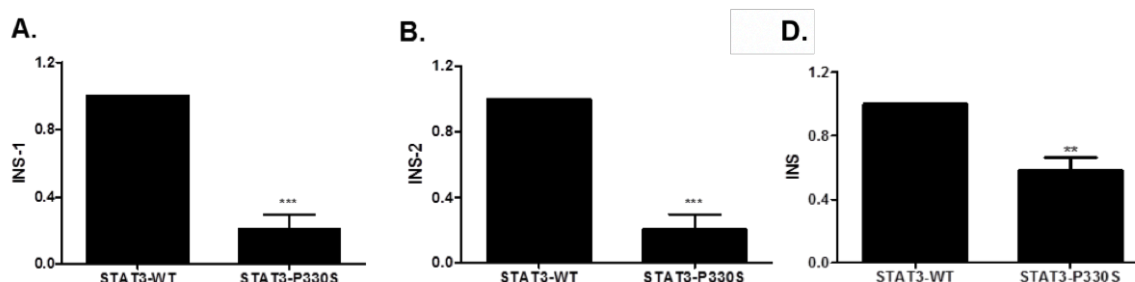
3. Irudia. Isl-1 transkripzio faktorearen adierazpen analisisa arratoi eta giza zeluletan.



(A) INS-1E zelulak (arratoi-zelulak) eta (B) EndoC-βH1 zelulak (giza-zelulak) STAT3-WT eta STAT3-P330S mutantearekin transfektatu ziren. Isl-1 transkripzio faktorearen adierazpena aztertu zen GAPDH (A) eta β-aktina (B) normalizaziorako kontrol bezala erabiliz. Emaizak STAT3ren adierazpenarekiko ere normalizatu ziren transfekzio efizientziaren desberdintasunak kontrolatzeko. Emaizak lau (A) eta sei (B) esperimentu independenteren erakusgarri dira, batezbestekoa $\pm$ batezbestekoaren errore tipikoa bezala adieraziak. *** $p < 0.001$ eta * $p < 0.05$ vs STAT3-WT (t testa).

Gure mutazioak intsulinarean adierazpenean eragina zuen ikusteko helburuaz, intsulinarean adierazpena aztertu genuen WT eta STAT3 mutantearekin transfektaturiko zeluletan. Arratoi zeluletan, INS-1 eta INS-2 geneen adierazpena murriztu egiten zen %70ean STAT3 mutantearekin transfektaturiko zeluletan (4A eta 4B irudiak). Giza zeluletan ere INS adierazpena jaisten zen, kasu honetan %42 inguru (4D irudia).

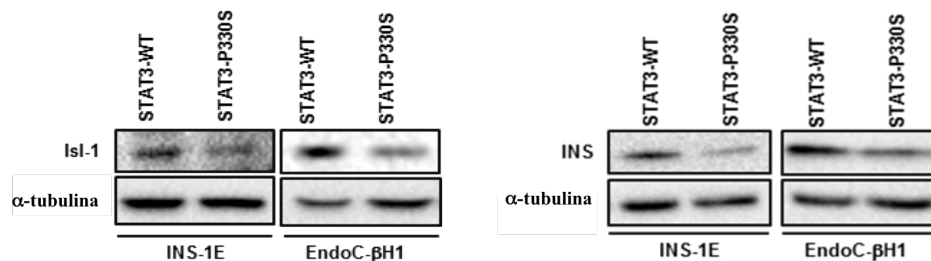
4. Irudia. Intsulinarean adierazpen analisia arratoi eta giza zeluletan.



INS-1E zelulak (A) eta EndoC- β H1 zelulak (B) STAT3-WT eta STAT3-P330S mutantearekin transfektatu ziren. Intsulinarean adierazpena aztertu zen GAPDH (A) eta β -aktina (B) normalizaziorako kontrol bezala erabiliz. Emaitzak STAT3ren adierazpenarekiko ere normalizatu ziren transfekzio efizientziaren desberdintasunak kontrolatzeko. Emaitzak lau (A) eta sei (B) esperimentu independenteren erakusgarri dira, batezbestekoa $\pm$ batezbestekoaren errore tipikoa bezala adieraziak. *** p <0.001 eta * p <0.05 vs STAT3-WT (t testa).

5. irudian apreziatu daitekeen bezala, mRNA mailan ikusitako Isl-1 transkripzio faktorearen eta intsulinarean adierazpen murrizpena proteina mailan ere ikusi daiteke bai arratoi zeluletan baita bai giza zeluletan ere.

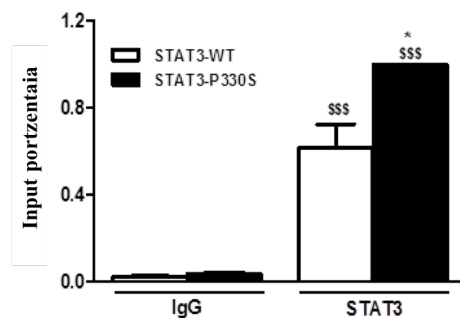
5. Irudia. Isl-1 eta Insulinaren adierazpena proteina mailan.



Isl-1 eta insulina proteinen adierazpena STAT3-WT eta STAT3-P330S mutantearekin transfektaturiko zeluletan. α -tubulina kontrol bezala erabili zen bai arratoi zeluletan baita giza zeluletan ere.

Kromatinaren immunoprezipitazioa (ChIP) erabili genuen STAT3 mutanteak Isl-1 transkripzio faktorearen promotorera lotzeko afinitate handiagoa zuen ikusteko. Horretarako, INS-1E zelulak WT edo STAT3 mutantearekin transfektatu ziren. STAT3rekiko espezifiko den antigorputzaren bitartez prezipitatutako DNA zatiak hartu eta PCR kuantitatiboaren bidez Isl-1 promotorean dagoen eta STAT3 lotzeko eskualde potentziala den -1262tik -1143ra doan eskualdea amplifikatu genuen (aurretik eginiko beste ikerketa batean ikusi da eskualde horrek STAT3ak ezagutzen duen sekuentzia duela (Chen J et al., 2013). 6. irudian erakusten den bezala, STAT3 mutanteak STAT3-WT baino afinitate handiagoa du Isl-1 promotorera lotzeko.

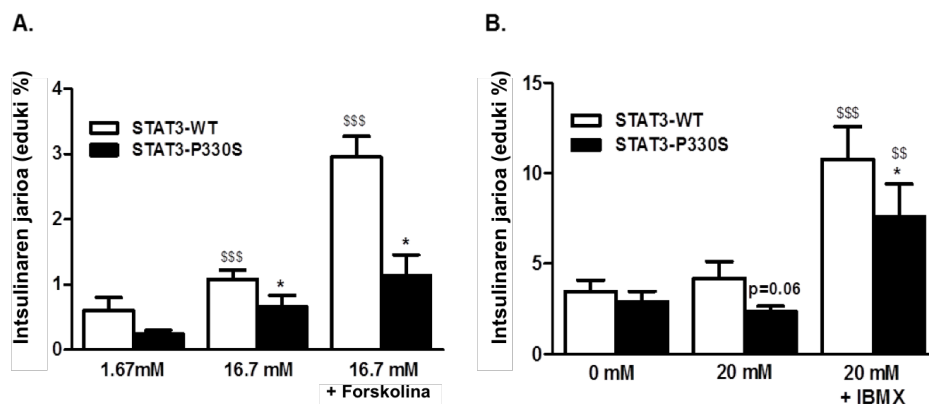
6. Irudia. Kromatinaren immunoprezipitazio-analisia.



ChIP analisiak erakusten du nola STAT3-P330S mutanteak Isl-1 promotorera lotzeko gaitasun handiagoa duela STAT3-WT-arekin konparatuta. IgG antigorputza erabili zen kontrol modura. Emaitzak lau esperimentu independenteren batezbestekoa $\pm$ batezbestekoaren errore tipikoa dira, inputaren portzentai bezala adieraziak. * $p<0.05$ vs STAT3-WT plasmidoarekin transfektatutako zelulak; \$\$\$ $p<0.001$ vs IgG eta plasmido berdinarekin transfektatutako zelulak (t testa).

Intulina adierazpena murrizteaz gain, mutazioak bere jarioan ere eragina duen ala ez aztertzeko, glukosa bidezko estimulazio osteko intulina jarioa analizatu genuen WT eta STAT3 mutantearekin transfektaturiko zeluletan. 7. irudian ikusi daitekeen bezala, INS-1E zelulen kasuan (7A irudia), WT STAT3ekin transfektaturiko zeluletan intulina jariapenaren areagotzea ikusi daiteke glukosa kontzentrazioa emendatzen doan heinean. Aldiz, STAT3 mutantearekin transfektaturiko zelulen kasuan, %60 murrizten da intulinaren jariapena glukosa kontzentrazio baxuarekin zein kontzentrazio altua eta forskolinarekin trataturiko zeluletan. Glukosa kontzentrazio altupean, %40a jaisten da jariapena STAT3-WT-arekin konparatuta (7A irudia). Emaiza horiek giza zeluletan ere baieztatzen dira (7B irudia).

7. Irudia. Intulinaren jarioaren analisia glukosa kontzentrazio desberdinen estimulazioaren ostean.



INS-1E zelulak (A) eta EndoC- β H1 zelulak (B) STAT3-WT eta STAT3-P330S mutantearekin transfektatu ziren. Zelulak glukosa kontzentrazio desberdinekin tratatu eta intulina jarioa neurtu zen. Emaitzak STAT3ren adierazpenarekiko normalizatu ziren transfekzio efizientziaren desberdintasunak kontrolatzeko. Emaitzak sei esperimentu independenteren erakusgarri dira, batezbestekoa $\pm$ batezbestekoaren errore tipikoa bezala adieraziak. * $p<0.05$ vs. STAT3-WTekin transfektaturiko zelulak, glukosa kontzentrazioe berdinean; \$\$\$ $p<0.001$ eta \$\$ $p<0.01$ vs. 1,67 mmol/L glukosa (A) edo 0 mmol/L glukosa (B) eta plasmido berdinarekin transfektaturiko zelulak (t testa).

4. Ondorioak

Ikerketa honetan, exoma osoko sekuentziazioaren bitartez, Jaioberriko Diabetesari (eta beste kondizio patologiko autoimmune batzuei) asoziatutako mutazio aktibatzaile berri bat identifikatu dugu STAT3 transkripzio faktorean. Gure analisi funtzionalen arabera, identifikatutako mutazioak intulinaren sintesian du eragina. Zehazki, intulina sintesia murrizten du Isl-1 transkripzio faktorearen inhibizioa eraginez.

Aurretiaz eginiko ikerketek mutazio aktibatzaile hauek autoinmunitate goiztiar batekin erlazionatzen dituzten arren, gure ikerketak insulina jariapenean eragin zuzena duela frogatzen du lehen aldiz. Emaizta guztiak bateratuz, badirudi mutazio aktibatzaileek jaioberriko diabetesa bi mekanismo kontrajarriren bidez eragiten dezaketela, hots, zelula immuneen erregulazioa aldatuz eta beta zelula pankreatikoen disfuntzioa eraginez.

Badirudi mutazio honek STAT3ak duen DNARA lotzeko gaitasuna areagotzen duela eta beraz, transkripzioa erregulatzeko ahalmena. Gure emaitzak bat datoz beste ikerketa batzuekin, zeintzuek DNA lotzeko domeinuan kokaturiko eta garapen goiztiarreko gaixotasun autoimmuniari asoziatutako beste mutazio aktibatzaile batzuk aztertu dituzten. Ikerketa horiek ere frogatu dute STAT3aren aktibitatea handitzen dutela (Flanagan SE et al., 2014).

Mutazio honek beta zelulen biziraupenean eraginik ez duen arren (ez dira emaitza hauek erakusten), ezin dugu baztertu mutazio honek beste eragin potentzial batzuk izan ditzakeela beta zelula mailan. Izan ere, frogatua dago STAT3ren aktibazio konstitutiboak ziklo zelularren erregulazioan eragina duela eta apoptosia eragiten duela beste zelula mota batzuetan (Al Zaid Siddiquee K eta Turkson J, 2008). Pankrea mailan, STAT3ak beta zelulen ziklo zelularra modulatu du eta DNA kalteetatik babesten du (Pan Y et al., 2016). Baita ere ikusi izan da STAT3rako *knock out* diren arratoiek insulina jarioaren prozesuan akatsak dituztela eta isote pankreatikoen egitura ez dela normala (Gorogawa S et al., 2004).

5. Etorkizuna

Ikerketa honetan, jaioberriko diabetesari asoziatutako mutazio aktibatzaile berri bat identifikatu dugu STAT3 transkripzio faktorean. Frogatu dugu mutazioak eragiten duen hiperaktibazioak eragin zuzena duela insulinarren jarioan, STAT3 transkripzio faktorearen DNA lotzeko gaitasuna emendatzen duelako. Hala ere, DNARA lotzeko gaitasun horren emendapenaren mekanismoa oraindik ez dugu argitu. Beraz, hurrengo pausua mekanismo honen azterketa izango litzateke.

Horretaz gain, jakinik, STAT3an identifikatu diren beste mutazio batzuek T zeluletan ere eragina dutela, guk identifikatutako mutazioak zelula horietan zein eragin duen aztertzea ere interesgarria litzateke. Izan ere, mutazio hau daraman gaixoak baditu ere autoimmuneak diren ezaugarriak, hipotiroidismo autoimmunea kasu.

6. Erreferentziak

Abroun S, Saki N, Ahmadvand M, et al. (2015), STATs: An Old Story, Yet Mesmerizing, *Cell J*, 17, 395-411.

Al Zaid Siddiquee K, Turkson J. (2008), STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors, *Cell Research*, 18, 254-67.

Bennett CL, Christie J, et al. (2001), The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3, *Nat Genet*, 27, 20-21.

Caldenhoven E, van Dijk TB, et al. (1996), STAT3 β , a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription, *J Biol Chem*, 271, 13221-13227.

Chen J, Fu R, Cui Y, et al. (2013), LIM-homeodomain Transcription Factor Isl-1 Mediates the Effect of Leptin on Insulin Secretion in Mice, *J Biol Chem*, 288, 12395–12405.

D’Antonio M, D’Onorio De Meo P, et al. (2013), WEP: a high-performance analysis pipeline for whole-exome data, *BMC Bioinformatics*, 14, S11.

Darnell JE, Kerr IM, et al. (1994), Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins, *Science*, 264, 1415-21.

Decker T, Kovarik P. (2000), Serine phosphorylation of STATs, *Oncogene*, 19, 2628-37.

Flanagan SE, Haapaniemi E, et al. (2014), Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease, *Nat Genet*, 46, 812-814.

Gorogawa S, Fujitani Y, et al. (2004), Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic beta-cell-specific STAT3 knockout mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319, 1159-70.

Haapaniemi EM, Kaustio M, et al. (2015), Autoimmunity, hypogammaglobulinemia, lymphoproliferation, and mycobacterial disease in patients with activating mutations in *STAT3*, *Blood*, 125, 639-648.

Kostromina E, Gustavsson N, et al. (2010), Glucose Intolerance and Impaired Insulin Secretion in Pancreas-Specific Signal Transducer and Activator of Transcription-3 Knockout Mice Are Associated with Microvascular Alterations in the Pancreas, *Endocrinology*, 151, 2050–2059.

Levy DE, Darnell JE Jr. (2002), Stats: transcriptional control and biological impact, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 651- 662.

Milner JD, Vogel TP, et al. (2015), Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations, *Blood*, 125, 591-599.

Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. (2008), Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic β -cell diabetes, *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 4, 200–213.

Naylor RN, Greeley SA, et al. (2011), Genetics and pathophysiology of neonatal diabetes mellitus, *J Diabetes Investig*, 2, 158–169.

Pan Y, Li G, Zhong H, et al. (2016), RIG-I inhibits pancreatic β cell proliferation through competitive binding of activated Src, *Scientific Reports*, 6, 28914

Polak M, Cavé H. (2007), Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms, *Orphanet J Rare Dis*, 2, 12-23.

Vaxillaire M, DP, Bonnefond A, Froguel P. (2009), Breakthroughs in monogenic diabetes genetics: from pediatric forms to young adulthood diabetes, *Pediatr Endocrinol Rev*, 6, 405–417.

Verbsky JW, Chatila TA. (2013), Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) and IPEX-related disorders: an evolving web of heritable autoimmune diseases, *Curr Opin Pediatr*, 25, 708-714.

Wienke J, Janssen Wet al. (2015), A novel human STAT3 mutation presents with autoimmunity involving Th17 hyperactivation, *Oncotarget*, 6, 20037-20042.

7. Eskerrak/aipamenak

Lan hau nazioarteko artikulu batetik (Velayos T. et al., 2017) eratorria da. Ikerketa hau ISCIII (PI14/01104) ikerketa proiektuaren bitartez finantzatu zen.

Egileek CIC bioGUNEko Genoma analisirako plataformak emandako laguntza teknikoa eta gizatiarra eskertzen dute.

Aho-aurpegietako mina pairatzen duten pazienteengan emozioen mimika eta alde-identifikaziorako gaitasuna neurtzeko tresna digitalen diseinu eta inplementazioa

Aizpurua, Ibane eta Azkue, Jon Jatsu.

Neurozientzia Saila, Medikuntza eta Odontologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, 48940, Leioa, Bizkaia.

iaizpurua016@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Alexitimia edo emozioen kontzientzia gabezia, besteen emozioei hautemateko ezintasunarekin erlazionatzeaz gain, min kronikoarekin harremana duen nahasmendua da. Egun, badakigu aurpegi espresioetatik eginiko emozioen hautematean prozesamendu motor nahiz emozionalak parte hartzen dutela. Lan honetan, aho-aurpegietako min kronikoa duten pazienteek zuzenduriko bi tresna digitalen diseinua eta inplementazioa aurkezten ditugu, garun azalaren distortsio sentso-motorren hipotesia frogatzeko asmoz. Alde batetik, pazienteek besteen emozioei hautemateko duten gaitasuna neurtu dugu, emozionalak eta neutroak diren aurpegi keinuen bidez, eta bestetik, ezker/eskuin aldeak bereizteko gaitasuna ebaluatu dugu.

Gako-hitzak: Aho-aurpegietako min kroniko, tresna digital, alde-identifikazioa, emozioei hautematea, aurpegi-mimika.

Abstract

Alexithymia or inability to recognize, understand and describe emotions, is a prevalent condition in chronic pain. Today, we know that the recognition of emotions from facial expressions involves both motor and emotional processing. In this work we have designed and implemented two digital tools to evaluate the hypothesis of cortical sensorimotor distortion in patients with orofacial pain, which, on the one hand, measure the ability to recognize the expression of emotions through facial gestures and right/left discrimination of gestural movements of the face and hands.

Keywords: Orofacial pain, digital tools, laterality, emotion recognition, facial expression.

1. Sarrera eta motibazioa

Emozioak ulertzeko eta adierazteko gaitasuna beste norbanakoengan hautemateko eta interpretatzeko ahalmenarekin erlazionatuta dago (Ekman eta Rosenberg, 1997). Besteen emozioak beren aurpegiaren keinuen bidez identifikatzeko goi mailako asoziazio konplexuak behar dira, eta badirudi emozio bakoitza sistema neural ezberdinen menpe dagoela (Adolphs, 2002; Sprengelmeyer et al., 1998). Besteengan emozioak identifikatzean, behatzailearengan ere emozio horietan parte hartzen duten garun-azaleko gune berberak aktibatzen direla proposatu da, baita minarekin lotzen diren emozioekin ere (Botvinick et al., 2005).

Keinu espezifikoaren bitartez kodifikatuta dauden emozioak hautemateko ahalmenaren galerarekin, besteak beste, enpatia urritzen doa, gaizki-ulertuak ematen dira eta ziurtasun-eza sortzen da pertsonaren jokaeran (Gray eta Tickle-Degnen, 2010; Kano eta Fukudo, 2013). Mimikaren bitartez kodifikaturiko emozioen hautematearen eta alexitimia edota kontzientzia emozional ezaren artean harreman estua dago (Kupfer et al., 2001), iradokiz nolabait, emozioen hautemateari loturiko defizitak emozioen garun-azaleko prozesamendu nahasmena adieraz dezakeela. Alexitimiak prebalentzia nabarmena dauka min kronikoko zenbait egoeretan, baita aho-aurpegietako min kronikoa ere (Lumley et al., 1997; Lumley et al., 2004). Beste aldetik, zenbait autorek, aho-aurpegietako min kronikoa dela eta, beste pertsonen emozioak hautemateko edo norbere propioak mimikaren bidez eratzeko zailtasunak

edukitzea, garun-azal eragileko prozesamenduaren nahasmena islatzen duela diote, ez ordea emozioarena (Piekartz et al., 2014a). Honako baieztapena bat dator “Neuromatrix” izeneko teoriak planteatzen duenarekin (Melzack, 1999), non minaren kronikotasunak gorputz eskemaren distortsioa ekartzeaz gain, eskualde nahastuari dagokion garun-azaleko errepresentazio sentori-motorraren alterazioa eragiten duen (Flor, 2002; Moseley, 2004a; Schwoebel et al., 2002; Wallwork et al., 2013).

Neuromatrix-aren ereduak, aurpegiko minaren ondorioz, aurpegi inguruko errepresentazio sentori-motorraz arduratzen diren garun-azaleko neuronak sentikorrak bihurtzen direla aurreratu du (Price, 1999), beren kitzikakortasuna areagotzearen ondorioz (Kessler et al., 2007). Sentikortasunaren ondorio posible bat *smudging* (Vallence et al., 2013) izeneko fenomeno da, hots, aurpegi eskualdeari dagozkion formak eta dimentsioak desberdintzeko gaitasunen hondatzea, aurpegi-mimikaren bidezko emozioen hautematearen nahasmenaren ondorioz. Nahaste honek, aurpegiko eskualdeari loturiko gaitasun mimikoen narriadura dakar (Mohr et al., 2011), emozioak ulertzeko gaitasuna hondatzeaz gain (Piekartz eta Mohr, 2014). Ereduak, aho-aurpegietako min kronikoa duten pazienteek beren emozioak identifikatzeko eta adierazteko zailtasunak aurkituko dituztela baieztatzeaz gain, besteetan ere hautemateko arazoak izango dituztela aurreratu du, beren nahaste sentori-motorraren ondorioz.

Orain arte azaldukoak kontuan hartuz, aurreratu daiteke aurpegi aldean identifikazioa eta aurpegi-keinuen hautematearen kuantifikazioa uztartzen duten tresnek, aurpegi eremuko min kronikoa dutenen ebaluaketa klinikoarentzat ekarpen handia izan daitezkeela. Bestetik, gorputz eskema berreskuratzera bideratuak dauden baliabideak, min kronikorako abordaia terapeutiko berritzailetzat har daitezke, errepresentazio sentori-motorraren distortsioa ez baita min kronikoaren bigarren mailako adierazpena, azken honen faktore fisiopatologiko nagusia baizik.

Aurkezten den lanean, aurpegi-mimikari loturiko emozioen hautemate eta ezker/eskuin aldeak bereizteko gaitasuna neurtzen dira bi erreminta digitalen bitartez.

2. Ikerketaren helburuak

Tresnek garun-azalaren distortsio sentori-motorraren hipotesiaren hiru aspektu ebaluatzen dituzte, aho-aurpegietako min kronikoa duten pazienteengan:

- 1) Aurpegi-mimikari loturiko emozioen hautematea.
- 2) Patroi motoreen ezker/eskuin aldean identifikazioa.
- 3) Nahastearen lekukotasuna edo orokortasuna, konkretuki, ezker/eskuin aldean bereizketa gaitasunaren hondatzea aurpegi mimikari mugatzen den ala gorputz mugimenduei orokortzen den.

3. Ikerketaren muina

3.1 Tresna digitalen diseinua

SET-1 eta SET-2 izeneko bi aplikazio edo tresna digital egin ditugu. Lehenengo aplikazioa (SET-1), aurpegiaren keinuen bidezko adierazpenak hautemateko gaitasuna ebaluatzea bideratuta dago, eta bigarrena ordea (SET-2) ezker/eskuin aldeak bereizteko gaitasuna neurtzera.

SET-1: Emozioen adierazpena

Lehenengo aplikazioa aurpegi-mimikari loturiko sei emozio primario (poztasuna, tristezia, beldurra, haserrea, nazka edo harridura) eta neutro edo ez emozionalak diren aurpegi-keinuen loturiko 26 irudien sekuentzia batez eratuta dago. Irudi guztietan bekoki, begiak, sudurra, ahoa eta kokotsa bezalako aurpegi elementuak erakusten dira, elementu distraktore oro ekidinez. Irudiak banaka eta zoriz aurkezten dira, eta erabiltzaileak, aplikazioak eskaintzen dizkion zazpi botoietako bat sakatu beharko du irudi bakoitzari erantzun ahal izateko. Irudi bakoitza, emozio primario edo keinu neutro batekin erlazionatzen da, testu etiketa baten bitartez (ikus Ondorioak atala). 26 irudietako bakoitzean beraz, zazpi erantzun aukera ematen dira, hauen ondoan aurkezten direlarik. Erabiltzailea, bere aldetik, sagua erabili beharko du irudia hoberen deskribatzen duen aukera sakatzeko.

SET-2: Alde-identifikazioa

Irudien bigarren sekuentzia, aurpegi zein eskuen ezker/eskuin aldean bereizketa gaitasuna ebaluatzerantz bideratua dago. SET-2a osatzen duten irudiak, bi azpitaldeetan banatuta daude, non, alde batetik, (1) ezker/eskuin aldeetara orientaturiko emakume eta gizonen aurpegi-keinuen irudiak ageri diren eta bestetik, (2) ezker/eskuin aldeei dagokien eskuen irudiak aurkezten diren.

Lehen azpitaldeko irudiekin erabiltzaileari eredu horietako bakoitzean agertzen den subjektuaren ahoa, mihi punta eta begiak zein aldera orientatzen diren identifikatzea eskatzen zaio. Irudiak hurrengo keinu multzoetatik eskuratu dira: a) ezkerreko betazalaren itxiera; b) eskuineko betazalaren itxiera; c) mihi punta ezkererantz aterata; d) mihi punta eskuinerantz aterata; e) ezpainak ezkererantz okertuta; f) ezpainak eskuinerantz okertuta. Bigarren azpitaldearen kasuan, antzeko prozedura erabili da. Kasu honetan patroia desberdinak jarraitzen dituzten eskuen irudiak erabiliz: a) hatz erakuslea luzatua; b) hatzak C hizkiaren forma irudikatzen; c) hatz erakuslea eta lodia batera luzatuak.

Bi azpitaldeetako irudiak zoriz eta tartekatuta aurkezten dira, modu honetan SET-2ko sekuentzia multzo osoa eratzen delarik. SET-1ean ez bezala, sekuentzia honetako irudi guztiei 0°, 90°, 180° edo 270°ko errotazioak zoriz esleitu zaizkie, eginkizunaren zailtasuna areagotzeko helburuz.

Azkenik, irudi bakoitzerako bi erantzun ematen dira aukeran, ezker edo eskuin orientazioekin lotuta. Bigarren aplikazioak erabiltzaileak emandako erantzunen detekzioa teklatuaren Z eta M hizkien presioaren bitartez egiten du, ezker eta eskuin aldeetarako, hurrenez hurren. Honako sekuentzia beraz 48 irudiz eratua dago, 24 aurpegikoak eta 24 eskuenak.

3.2 Irudien hautaketa

Tresna digitalen baitan gerora inplementatuko genituen irudien selekzioa egiteko, lau subjektuen parte hartzea behar izan dugu, bi emakume eta bi gizonezko. Aurpegi-keinu ez-emozional edo neutroei loturiko argazkiak eta sei emozio primarioei loturiko aurpegi-keinuen argazkiak egin zaizkie. Canon Reflex EOS 1200 kamera modeloa erabiliz, eta testuinguru ezaugarriak neutroenak izatea ahaleginduz, partaideei emozio bakoitza ahalik eta zehaztasun handienarekin adieraztea eskatu diegu. Horietako bi partaideei, aipaturiko sei emozioez gain, adierazkortasun emozional eza edo neutroa bere aurpegietan islatzea eskatu diegu. Hartutako argazki guztietatik, aurpegi-keinu bakoitza hoberen azaltzen dituztenak aukeratu ditugu, emozio primario bakoitzarentzat sei irudi hautatuz eta keinu neutroentzat ordea bi aukeratuz, guztira SET-1erako 26 irudi bilduz.

SET-2ko lehen azpitaldearen (1) irudi multzoaren selekzioa egiteko, gure taldeko kide den emakume bati argazkiak hartu dizkiogu. Honakoan begien, ezpainen eta mihi puntaren kokalekua irudien ardatz nagusi izanik, hauekin ezker/eskuin aldeetara orientaturiko keinuak egiten saiatzea eskatu diegu. Irudien hautaketari dagokionez, aurreko atalean aipaturiko aurpegi-keinu multzo bakoitzetik irudi bat aukeratu dugu, aurpegi-keinu bakoitzerako 4 irudi lortuz, eta guztira horrela, 24 irudien bilduma eskuratu. Bigarren azpitaldeari dagokionez (2), hots, aurpegiz kanpoko edo esku mugimenduen taldeari, gure taldeko kide baten eskuaren argazkiak hartu ditugu eta bereganatu beharreko hatz-posizio konkrituak zeintzuk diren azaldu zaizkie. Hartutako irudi guztietatik, aurrez zehazturiko esku-posizio patroia bakoitzarentzat 8 irudi hautatu ditugu, guztira 24 irudi batuz.

Azkenik, irudi guztien kalitate eta tamainen inguruko aspektuak hobetzeko “Adobe Photoshop 7.0” programa erabili dugu. Irudien tamainen baliokidetza errespetatzeko, beren dimentsioak egokitu (450x450) eta argi efektuak gehitu dizkiegu guztiei.

3.3 Interfaze grafikoa eta aplikazioen funtzionamendu orokorra

Bi aplikazioak Java™-n programatu dira, Netbeans garapen inguru integrala erabiliz. Inguru integralak Swing liburutegien bidezko kontrolen maneia, leiho grafikoak eta saguaren bidezko interakzio estandarra eratzea ahalbidetzen du.

Aplikazioak, erakutsi beharreko irudien lotura eta zuzen hartu beharreko erantzunak fitxategi isolatu batetik kargatzen ditu. Ondoren, interfazearen leiho batean argazki irudien aurkezpen sekuentzialari ematen zaio hasiera, erabiltzaileak erantzun botoiak sakatzen ditueneko edo berriz,

erantzun botoiak ez sakatzeagatik automatikoki 10 segunduro irudiz aldatzen duen tenporizadore batean oinarrituz. Lehenengo kasuan, erantzuteko denbora eta erantzunaren zuzentasuna hartzen ditu kontuan aplikazioak, bigarren kasuan ordea, aplikazioak erantzun nulo edo baliogabetua erregistratzen du. Irudien sekuentzia bukatzen denean, aplikazioak testu formatu batean gordetzen ditu erabiltzailearen erantzun zuzenen kantitatea eta erantzuteko denbora, formatu laburtu eta zabalduan.

3.4 Tresna digitalen erabilerarekin lotutako beste alderdiak

Bi aplikazioak, 18 urte baino gehiagoko adina duten eta gutxienez 6 hilabetetan zehar aho-aurpegietako mina pairatu izan duten pertsonen zuzenduta daude, betiere, Nahaste Temporomandibularren Ikerketa Irizpide Diagnostikoak (CDI/TTM) betetzen dituztela ziurtatuz. Ordea, ez lirateke aproposak muga funtzional larriak edo bulkaden kontrol edota arreta arazoekin erlazionaturiko larritasun psikologikoak dituzten pazienteentzat.

4. Ondorioak

4.1 SET-1: Emozioen adierazpena

Lehenengo erremintaren aurkezpena portada batekin hasten da. Azken hau, gris koloreko leiho batez dago eratua, non “hasiera” deritzon botoia ageri da kokatua honen eskuin eta behe aldean. Pantaila geldirik mantentzen da erabiltzaileak hasiera botoia saguarekin sakatzen duen arte, eta momentu honetan aplikazioaren aktibitatea martxan jartzen da. Behin hasita, aurpegi eredu emozional edo neutro baten lehenengo irudia aurkezten da, honakoa zazpi botoietako bati lotzen zaiolarik: “poztasuna”, “harridura”, “nazka”, “haserrea”, “tristezia”, “beldurra” eta “neutroa”. Botoiak irudiaren eskuinean agertzen dira. Erabiltzaileak, bere aldetik, gehienez 10 segundotan eta sagua erabiliz, irudikatzen den emozioa hoberen adierazten duen erantzun aukera hautatu beharko du. Sekuentzia eratzen duten beste 25 irudientzat prozedura bera erabili izan da. Aplikazioak irudi guztiak aurkezten dituenean, hasierako portada erakustera pasatzen da berriz ere, erabiltzaileari zeregina bukatu dela adieraziz.

1. irudia. SET-1 sekuentziaren aurpegi irudi erdua. Aurkezten den emozioa haserreari dagokio.



Zeregina bukatzerakoan aplikazioak erabiltzaile bakoitzaren erantzunak bi fitxategietan erregistratzen ditu: EMOTION_ID (zereginaren burutze data).csv eta EMOTION_ID (zereginaren burutze data).txt.

Lehenengoa mota irekiko fitxategia da eta erabiltzailearen erantzunak taula formatuan aurkezten dira. Taula honen zutabeek, aurkezturiko irudiaren (“file.jpg”), irudiari loturiko erantzun zuzenaren (“emotion”), erabiltzailearen erantzunaren (“response”) eta erantzun denboraren (“time”) inguruko informazioa biltzen dute besteak beste. Fitxategi honek, aurkeztutako irudi bakoitzarentzat erabiltzaileak emandako erantzunak zeintzuk izan diren adierazten du, huts egindako erantzunak zein emozioekin lotuta dauden ezagutzearekin batera.

Bigarren fitxategian honako datuak erregistratzen dira: (1) aurkezturiko irudi kopurua; (2) irudiei dagozkien erantzun baliodunak zenbaki eta ehunekotan; (3) irudiei dagozkien erantzun egokiak zenbaki eta ehunekotan; (4) erantzun baliodunei loturiko bataz-besteko denbora (ms); (5) erantzun egokiei loturiko bataz-besteko denbora (ms) eta (6) erantzun okerrei loturiko bataz-besteko denbora (ms). Erantzun zuzenek puntu 1 gehitzen dute eta okerre 0 puntu, ordea, erabiltzaileak 10 segundotan zehar erantzuten ez badu, aplikazioak erantzun nulo edo baliogabetua erregistratzen du.

2. irudia. EMOTION.ID.csv fitxategia.

	A	B	C	D
1	file	emotion	response	time
2	SO2.JPG	SO	SO	8970
3	EN4.JPG	EN	TR	1850
4	SO3.JPG	SO	AS	1920
5	AS2.JPG	AS	AS	1060
6	AL3.JPG	AL	AL	2493
7	SO1.JPG	SO	SO	3210
8	MI2.JPG	MI	MI	3660
9	SO2.JPG	SO	SO	2570
10	NE1.JPG	NE	NE	8565
11	EN1.JPG	EN	TR	7160
12	EN3.JPG	EN	EN	3435
13	AS1.JPG	AS	AS	3535
14	AS3.JPG	AS	AS	8337
15	NE2.JPG	NE	NE	2840
16	AS4.JPG	AS	AS	1670
17	SO4.JPG	SO	SO	3210
18	TR1.JPG	TR	SO	1890
19	MI4.JPG	MI	MI	2430
20	EN2.JPG	EN	EN	2690
21	TR2.JPG	TR	TR	2020
22	MI1.JPG	MI	EN	9765
23	AL1.JPG	AL	AL	3882
24	MI3.JPG	MI	MI	1580
25	TR3.JPG	TR	TR	2000
26	AL2.JPG	AL	AL	3420
27	AL4.JPG	AL	AL	3040

3. irudia. EMOTION_ID.txt fitxategia.

```

*** SUMMARY DATA ***
- Total number of presented images: 26
- Valid responses: 26 (100%)
- correct answers: 21 (80% of valid responses and 80% of total responses)
- Mean response time for valid responses: 3738 ms
- Mean response time for correct responses: 3553 ms
- Mean response time for incorrect responses: 4517 ms

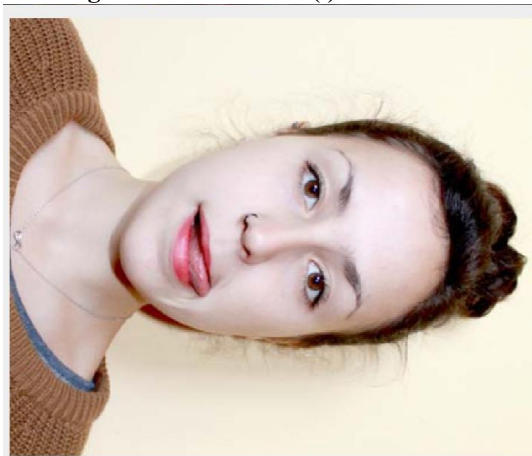
```

4.2 SET-2: Alde-identifikazioa

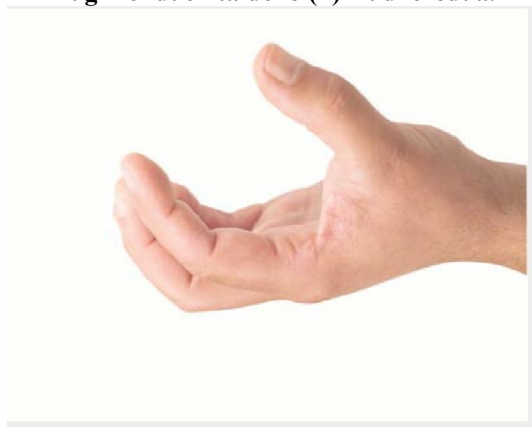
Bigarrena aplikazioa portadaren aurkezpenarekin hasten da. Gris koloreko leihoa bat irekitzen da, kasu honetan, hasiera botoirik gabekoa. Oraingoan erreminta martxan jartzeko teklatuaren “a” hizkia sakatu beharko da, eta honen ostean sekuentziaren lehen irudiaren aurkezpena hasiko da. Irudiak, aurretik aipaturiko aurpegi-keinu (1) edo eskuen orientazio (2) taldeetan dute jatorria. Lehenengo taldeko irudiak agertzen direnean, erabiltzailearen egitekoa irudian aurkezten den mihi punta, ezpain edo begien ezker/eskuin orientazioa zehaztea izango da; bigarren taldeko irudiekin ordea, helburua aurkeztutako eskuaren ezker/eskuin jatorria adieraztea izango da. Irudi bakoitzean soilik aurpegi-keinu edo esku orientazio bat aurkezten da.

Irudiei erantzun ahal izateko, erabiltzaileak “z” edo “m” hizkiak sakatuko ditu, ezker eta eskuinerako, hurrenez hurren. Horretarako, erantzuna 10 segundotako tartean eman beharko du, kontrako kasuan, aplikazioak erantzuna nulotzat hartu eta hurrengo irudia aurkeztera pasako da. Irudi guztiak erakusterakoan, monitorea gris kolorekoa bihurtzen da, zeregina bukatu dela seinalatuz.

4. irudia. SET-2 sekuentziari dagokion aurpegi mugimenduen taldeko (i) irudi eredua.



5. irudia. SET-2 sekuentziari dagokion gorputz mugimenduen taldeko (ii) irudi eredua.



Irudi guztiak aurkeztu direnean, aplikazioak SIDE_ID (zereginaren burutze data).csv eta SIDE_ID (zereginaren burutze data).txt izeneko fitxategiak eratzen ditu. Oraingo honetan, lehenengo aplikazioan deskribaturiko erantzun formatuak mantentzen dira.

5. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Aurkezten den lana burutu ahal izateko, ezker/eskuin bereizketa zereginak oinarritzat hartzen dituen *Implicit Motor Imagery* izeneko paradigmaman zentratu gara, momenturarte argitaratu diren ikerketetan oinarrituz (Bray eta Moseley, 2011). Bereziki, Piekartz et al (2014b)-en lana abiapuntutzat hartuz, garun-azalaren prozesaketa emozional eta motorraren ebaluaketa indibiduala egiteko, bi tresna digitalen diseinua eta inplementazioa eraman dugu aurrera. Bertan, aho-aurpegietako min kronikoa duten pazienteengan aipaturiko bi eremuen inplikazio maila neurtzea izan da xede nagusia. Tresnek aurpegi-keinuen hautematean garun-azal motorraren prozesaketaren inplikazioaren inguruko ebidentziak ematera lagundu dezakete. Modu honetan, besteen emozioak hautemateko dituzten zailtasunen jatorria nahaste motore batean oinarrituak egon daitezke frogatuko litzateke.

Min kronikoa dutenek ezker/eskuin identifikazioan erakutsitako errendimendu baxua, soilik gorputz eremu espezifikoarekin erlazionatzen dela dio literaturak (Moseley, 2004b; Stanton et al., 2012). Hori dela eta, diseinaturiko tresnetariko bat alterazioaren espezifikotasuna edo orokortasuna ebaluatzen bideratu dugu, ebatzi gabe dagoen zalantza inguruan ebidentziak emateko asmoz. Horretarako, aurpegiz kanpoko eremu baten ezker/eskuin identifikazio zeregin bat erantsi dugu, pazienteen errendimenduaren aldaketa modu orokortuan edo aldiz, soilik aurpegi eskualdearen garun-azal eremuan aldaketak eragiten dituen baztertzeko helburuarekin.

Aplikazioen diseinu eta inplementazioa paziente kolektibo zehatz bati zuzenduak badaude ere, horrek ez du esan nahi beren erabilgarritasuna azken hauei soilik mugatua geratzen dela. Modu berean, lan honetan bi tresnak nahaste konkretu honen jatorria hobeto ezagutzeari bideratu baditugu ere, bakoitza bere aldetik, batera edo indibidualki, trebetasun sozial baxuak edo alexitimia duten subjektuen entrenamendu emozionalerako erabili daitezke, eta honez gain, beren alde-identifikazioa indartzea bilatzen duten subjektuentzat ere aproposak lirateke. Hau dela eta, beren erabilpena anitza eta zabala izan daiteke, lortu nahi den helburuaren arabera.

Laburtuz, lan honek, aho-aurpegietako min kronikoa duten pertsonen aurpegi-keinu emozionalen hautemate defizitaren inguruan tresna berriak aurkezteko egitasmoa du. Horretarako, aurpegi eta eskuen alde-identifikazioa eta emozioen hautemateari loturiko errendimendua kuantifikatzeari zuzenduriko bi aplikazio digitalen diseinu eta inplementazioa burutu ditugu. Bi tresnak ebaluazio kliniko goiztiarragoa bermatzera zuzentzen dira gaur, paziente hauei beren gorputz eskema berreskuratzerantz bideratuta dauden baliabide hobeagoak eskaini ahal izateko bihar.

6. Erreferentziak

- Adolphs, R. (2002). Recognizing emotion from facial expressions: psychological and neurological mechanisms. *Behavioral and Cognitive Neuroscience*, 1, 21-62.
- Botvinick, M., Jha, A. P., Bylsma, L. M., Fabian, S. A., Solomon, P. E. eta Prkachin, K. M. (2005). Viewing facial expressions of pain engages cortical areas involved in the direct experience of pain. *Neuroimage*, 25, 312-319.
- Bray, H. eta Moseley, G. L. (2011). Disrupted working body schema of the trunk in people with back pain. *British Journal of Sports Medicine*, 45, 168-173.
- Ekman, P. eta Rosenberg, L. (1997). *What the face reveals*. Second edition. New York, Oxford University Press.
- Flor, H. (2002). The modification of cortical reorganization and chronic pain by sensory feedback. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*, 27(3), 215-227.
- Gray, H. M. eta Tickle-Degnen, L. (2010). A meta-analysis of performance on emotion recognition tasks in Parkinson's disease. *Depression and Anxiety*, 24(3), 176-191.
- Sprengelmeyer, R., Rausch, M., Meysel, U. T. eta Przuntek, H. (1998). Neural structures associated with recognition of facial expressions of basic emotions. *Proceedings of the Royal Society of London*, 265, 1927-1931.
- Kano, M. eta Fukudo, S. (2013). The alexithymic brain: the neural pathways linking alexithymia to physical disorders. *Biopsychosocial Medicine Journal*, 7(1), 1.
- Kessler, H., Roth, J., von Wietersheim, J., Deighton, R. M. eta Traue, H. C. (2007). *Depression and Anxiety*, 24(3), 223-226.
- Kupfer, J., Brosig, B. eta Brahler, E. (2001). *Toronto Alexithymie Skala: Deutsche version (TAS-26)*. Hogrefe.
- Lumley, M. A., Asselin, L. A. eta Norman, S. (1997). Alexithymia in chronic pain patients. *Comprehensive Psychiatry*, 38, 160-165.
- Lumley, M. A., Smith, J. A. eta Longo, D. J. (2004). The relationship of alexithymia to pain severity and impairment among patients with chronic myofascial pain. Comparisons with self-efficacy, catastrophizing and depression. *Journal of Psychosomatic Research*, 53, 823-830.
- Melzack, R. (1999). From the gate to the neuromatrix. *Pain*, 82, 121-126.

- Mohr, G., Piekartz, H. J. eta Hotze, E. (2011). A qualitative study on pain experiences and pain behavior in patients with chronic facial pain. *Journal of Craniomandibular Function*, 3(1), 9-28.
- Moseley, G. L. (2004). Why do people with complex regional pain syndrome take longer to recognize their affected hand? *Journal of Neurology*, 62, 2182-2186.
- Piekartz, H. eta Mohr, G. (2014). Reduction of head and face pain by challenging lateralization and basic emotions: a proposal for future assessment and rehabilitation strategies. *Journal of Manual and Manipulative Therapy*, 22(1), 24-35.
- Piekartz, H., Wallwork, S. B., Mohr, G., Butler, D. S. eta Moseley, G. L. (2014). People with chronic facial pain perform worse than controls at a facial emotion recognition task, but it is not all about the emotion. *Journal of Oral Rehabilitation*, 42(4), 243-250.
- Price, D. (1999). Psychological mechanisms of pain and analgesia. *Hippocampus*, 19, 893-901.
- Schwoebel, J., Coslett, H. B., Bradt, J., Friedman, R. eta Dileo, C. (2002). Pain and the bodyschema: effects of pain severity on mental representations of movement. *Journal of Neurology*, 59, 775-777.
- Stanton, T., Lin, C., Smeets, R., Taylor, D., Law, R. eta Moseley, G. (2012). Spatially-defined disruption of motor imagery performance in people with osteoarthritis. *Journal of Rheumatology*, 51, 1455-1464.
- Vallence, A. M., Smith, A., Tabor, A., Rolan, P. E. eta Ridding, M. C. (2013). Chronic tension-headache is associated with impaired motor learning. *Cephalalgia*, 3(12), 1048-1054.
- Wallwork, S. B., Butler, D. S., Fulton, I., Stewart, H., Darmawan, I., eta Moseley, G. L. (2013). Left/right neck rotation judgements are affected by age, gender, handedness and image rotation. *Manual Therapy*, 18(3), 225-230.

Ingurune aberastua: nerabezaroan alkoholarekin trataturiko C57BL6 saguen terapia eraginkorra?

Rico-Barrio, Irantzu¹; Peñasco, Sara¹; Puente, Nagore¹; Reguero, Leire¹; Egaña-Huguet, Jon¹; Buceta, Ianire¹; Torres-Maldonado, Paula¹; Gerrikagoitia, Inmaculada¹; Elezgarai, Izaskun¹; Grandes, Pedro^{1,2}

¹Neurozientziak Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, E-48940, Leioa

Medikuntza-zientzietako Saila, Victoriako Unibertsitatea, Victoria, V8W 2Y2, Kanada
irantzu.rico@ehu.eus

Laburpena

Gehiegizko alkohol-kontsumoa, batez ere nerabezaroan, egungo gizarteak kezkatzen duen arazo larrienetako bat da. Hainbat ikerketek etanolak eta sistema endokannabinoidak (SE) elkar eragiten dutela agerian utzi dute, azken honen funtzioa eraldatuz. Ingurune aberastuak (IAk) aldaketa molekular, anatomiko zein funtzionalak eragiten ditu garunaren garapen prozesuan. Gure xedea, nerabezaroan droga honen kontsumoaren ondorioz sorturiko eraginei aurre egiteko aberastutako inguruneak helduaroko saguen hipokanpoan duen rola aztertzea izango da.

Hitz gakoak: Alkohola, ingurune aberastua, kognizioa, plastikotasuna, terapia.

Abstract

Alcohol drinking, especially during adolescence, is a serious public health concern. Ethanol interacts with the endocannabinoid system whose function may be altered in ethanol dependence. An enriched environment (EE) has been shown to significantly facilitate recovery from brain injury due to important anatomical, functional and molecular changes that occur along brain development. Here, we investigated the potential positive effects that EE will have to counteract the impairment induced by ethanol intake during adolescence in the adult mice hippocampus.

Keywords: Alcohol, enriched environment, cognition, plasticity, therapy.

1. Sarrera eta motibazioa

Alkohola egungo nerabeek kontsumitzen duten substantzia psikoaktibo ohikoena da. Azken urteetako inkesten arabera, adingabeko gazteak gero eta goizago hasten dira gehiegizko alkohol kontsumo intentsiboan murgiltzen, non, asteburueta mozkorraldiak, intoxikazio etilikoak eta “binge drinking-a” edo betekadetan oinarritutako kontsumoa premiazkoa bilakatu egin den. Estatistiken arabera, lehenengo mozkorraldia 14.1 urterekin gertatzen da. Adin honetan, epe luzeko kalteak eta ondorio latzak pairatzeko arriskuak ez dira aintzat hartzen (Osasun Saila, 2014).

Nerabezaroa aldaketa denboraldi garrantzitsu bat da. Tarte horretan, garunean, etengabeko garapen eta heldze prozesu bat ematen da (Kyzar et al., 2016). Izan ere, astebururo gizartean ezarrita dagoen larregizko alkohol kontsumoaren ohiturak aldaketa fisiologiko nabarmenak eragiten dituela jakitera eman dute azken urteotako ikerketek; neurotransmisioaren galera, plastikotasunaren asaldura (Clark et al., 2008; Keshavan et al., 2014; Tau eta Peterson, 2010), eta prozesu hauekin zuzenki erlazionatuta dagoen narriadura kognitiboa (Vetreno eta Crews, 2015) aipatzekoak dira, besteak beste. Gainera, droga honek sortarazten duen tolerantzia maila eta ageriko mendetasuna azpimarratu beharra dago. Hortaz, gizarte eragileak gero eta arduratuagoak daude, adingabeko gazteei zuzendutako prebentzio egitasmoak jorratzen.

Alkohol kontsumoaren erregulazioan, endokannabinoidak sistema (ES) funtsezko eginkizun bat betetzen du. ES zelulen arteko komunikazio sistema fisiologiko moldakor neuromodulatzaile bat da, eta hainbat funtzio fisiologikotan parte hartzen du: ikasketan, oroimenean, lo-esnaldi zikloan,

metabolismoan eta adikzio erregulazioan, esaterako. Beraz, azken hamarkadan, sistema honek duen ahalmena itu-terapeutiko gisa aztertu egin da. ES bi oinarritzko endokannabinoidetaz (eKB) konposatuta dago: anadamina (AEA) eta 2-AG. EKB hauen efektuak bi hartzaile nagusien bitartez gauzatuko dira: CB₁ eta CB₂, hain zuzen ere. Ildo honetan, NAPE-PLD eta DAGL entzimak ditugu, eKB-en biosintesian parte hartzen dutenak eta bestalde, FAAH eta MAGL; AEA eta 2-AGren degradazioaz arduratzen direnak, hurrenez hurren (Di Marzo eta Piscitelli, 2015; Ianotti et al., 2016). Hainbat ikerketek etanolak eta sistema endokannabinoidak elkar eragiten dutela agerian utzi dute, azken honen funtzioa eraldatuz.

Ingurune aberastua (IA) “objektu desberdinen, gizarte-elkarrekintzaren eta ariketa fisikoaren konbinazioa da” (Rosenweig et al., 1978). Oinarritzko ikerkuntzan, aberastutako ingurugiroak ohiko laborategi kaiolak baino handiagoak dira. Bertan, korrika egiteko gurpilak, aldapak, tunelak eta kolore, tamaina eta ehundura ezberdinetako objektuak kokatzen dira. Objektu hauei esker, animalien zentzumenen kitzikapena, ariketa fisikoa eta gizarte-elkarrekintza sustatu egiten dira, garunaren garapen prozesuko aldaketa molekular, anatomiko zein funtzionalak bermatuz. Hortaz, paradigma honek garun lesio berreskurapenean izan dezakeen parte-hartze garrantzitsua zein onuragarria azpimarratu beharra dago.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

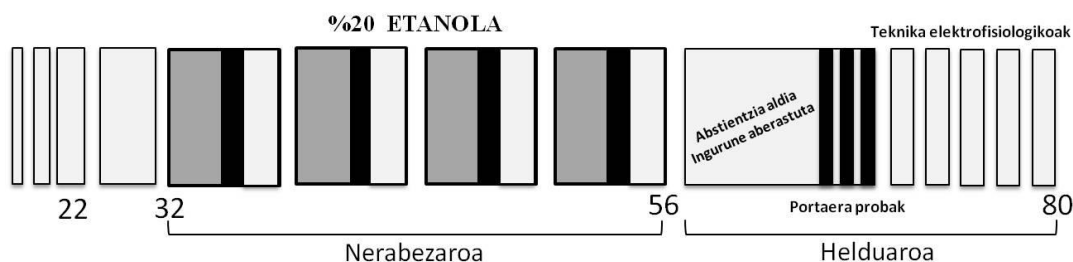
Adingabeko gazteen gehiegizko alkohol kontsumoaren prebalentzia-tasaren ohartarazpenak eta larregizko kontsumo honek dakartzan kalteen ezaguerak, ahobatezko eskakizun nabarmena eragin du bai osasun sisteman bai hiritargoan, prebentzio egitasmoak edo tratamendu berrien ikerketak burutzeko. Zentzu honetan, adikzio honen atzean ezkututzen diren mekanismo neurobiologiko eta neuropatologikoen ezaguerak, terapia eraginkor berrien garapenean lagun dezake, alkohol mendekotasunpean bizi diren pertsonen bizi kalitatea hobetuz.

Hori dela eta, ikerlan hau bi helburu nagusietan bideratuko da. Alde batetik, nerabezaroan alkohol kontsumoaren ondorioz sorturiko epe luzeko efektuen azterketa sakona egingo da. Zehazki, alkohol kontsumoaren eragina CB₁ hartzailaren bidezko transmisio sinaptiko kitzikatzaila eta plastikotasuna aztertuko da. Horretaz gain, oroimen prozesu kognitiboak, mugimenduen koordinazioa, oreka, animalien portaera depresiboa eta estutasun maila ikertuko da. Bestetik, ingurune aberastuak alkoholak eragindako lesio kognitiboetan nola eragiten duen aztertzeke dago, beraz, lan honen beste ardatz nagusia, nerabezaroan alkohol kontsumoaren ondorioz sorturiko efektuei aurre egiteko aberastutako inguruneak duen rola aztertzea izango da. Lortutako emaitzen ekarpenei esker, paradigma honek helduaroan eduki dezakeen ahalmen terapeutikoa aztertzeke aukera emango digu.

3. Ikerketaren muina

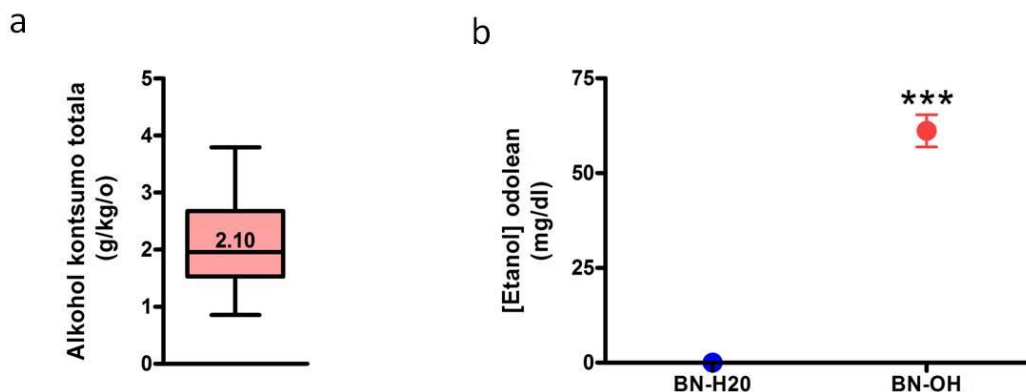
Azterlan honen helburua gauzatzeko, lau astetan zehar, nerabezaroko C57BL6 ar saguei, alkohola edateko protokolo bat ezarri zitzaion (1. irudia). Asteko lehenengo hiru egunetan, animaliak bi orduz segidan egon zitezkeen alkohola (%20) edota ura era aske batean edaten. Laugarren egunean, edateko denbora-tartea lau ordutara luzatu zen eta asteko gainontzeko hiru egunak atseden gisa hartu ziren.

1. irudia. C57BL6 ar saguei ezarritako alkohola edateko lau asteko protokoloa eta diseinu esperimentalaren eskema



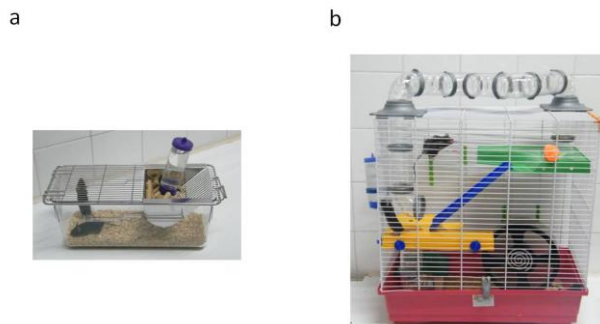
Ezarritako alkohol protokoloaren balioztapena bermatzeko animaliak edandako batz besteko alkohol kontsumo totalaren maila (2.a irudia) eta odoleko etanol kontzentrazioaren neurketa egin zen (2.b irudia).

2. irudia. C57BL6 ar saguek lau astetan zehar edandako a) batz besteko alkohol kontsumo totalaren maila eta b) etanol kontzentrazioaren neurketa



Ondoren, bi asteko abstinentsia aldia baliatuz, animaliak ingurune aberastuko kioletan barruratu ziren. Beraz, ikerketa honi hasiera emateko lau talde esperimental osatu ziren: Baldintza normalean hazitako kontrol taldea (BN-H₂O), baldintza normalean hazitako alkohol taldea (BN-OH), ingurune aberastuko kontrol taldea (IA-H₂O) eta ingurune aberastuko alkohol taldea (IA-OH) (3. irudia).

3. irudia. a) Ohiko laborategi kaiola eta b) ingurune aberasturiko kaiola



3.1 Portaera probak

Objektu berrien ezagutze proba

Ezagutze oroimena, objektu berrien probaren bitartez neurtu zen. Proba hau saguek daukaten objektu berrietara joateko berezko joeran oinarritzen da. Azterketa honen entrenatze prozesuan, berdinak diren bi objektu erakusten zaizkie saguei, hauek esplora dezaten. Bi ordu geroago, proba egiten da eta lehen esploratutako objektu ezagun horietako bat berri batengatik aldatzen da. Talde esperimental ezberdinen ezagutze oroimena, bereizketa indizea (BI) kalkulatzu neurtuko da. $BI = \frac{\text{denbora objektu berrian} - \text{denbora objektu ezagunean}}{\text{denbora totala}} \times 100$.

Kokaleku berrien portaera proba

Ilido honetan, oroimen espaziala, kokaleku berrien portaera probaren bitartez neurtu zen. Proba hau saguek daukaten leku berrietara joateko berezko joeran oinarritzen da. Lehenik eta behin, ikusgai diren lau pista ipiniko dira portaera-aparatuak osatzen duen horma bakoitzean. Entrenatze prozesuan, bi objektu berdinen bitartez, bi kokaleku ezberdin erakutsiko zaizkie saguei, hauek esplora dezaten. Bi ordu geroago, proba egiten da eta entrenatze prozesuan esploratutako kokaleku ezagun horietako bat berri batengatik aldatuko da. Objektu berrien ezagutze proban bezala, talde esperimental bakoitzaren oroimen espaziala BI kalkulatzuz neurtuko da.

Bi portaera proba hauetan lortutako emaitzek, nerabezaro garaian larregizko alkohol kontsumoaren ondorioz narriadura kognitibo nabarmena gertatzen dela aditzera eman zuten. Hala ere, ezagutze eta espazial oroimen mailaren berreskurapena behatuz, aberastutako ingurugiroen erabilpena alkoholismoaren tratamenduan tresna baliagarria izan zitekeela iradoki zen.

Rotaroda

Mugimenduen koordinazioa rotarod izeneko aparatuaz burutzen da. Azterketa honen entrenatze prozesuan animaliak abiadura iraunkor batean mantendu behar dira rotarodaren gainean. Proba egunean, berriz, abiadura motel batekin hasi eta pixkanaka abiadura hau areagotzen hasiko zaie saguak aparatutik jausten diren arte. Hemen, zuzenki proportzionalak diren bi parametro neurtuko dira: latentzia, hau da, animaliek aparatuaren gainean irautean duten denbora eta erortze abiadura.

Oreka proba

Proba honen bitartez talde esperimental ezberdinen trebezi maila neurtzen da. Entrenatze prozesuan makila lodi bat erabiltzen da, animaliak alde batetik bestera ahalik eta azkarren pasa daitezen. Proba egunean, ordean, makila estutu eta saguen abilezia neurtuko da latentzia eta behaztopatze mailaren neurketa eginez.

Grafiketan beha daitekeen bezala, alkohol kontsumoak begi-bistako kalteak eragiten ditu bai mugimenduen koordinazioan bai orekan. Hala ere, IAren baldintzek parametro hauetan sortzen dituzten onurak azpimarra beharra dago.

Depresio maila neurtzeko portaera proba

Sei minutuko proba hau depresio egoera eta gelditasun denboraren arteko erlazioan oinarritzen da. Ohitze prozesuan, saguak bi minutuz egongo dira buruz behera hari batetik eskegita. Probak osatzen duen gainontzeko lau minututan, saguek haritik eskegita jarraitzen dutela baliatuz, talde esperimental bakoitzaren gelditasun denbora neurtuko da, egoera depresiboaren islapen gisa. Beraz, zenbat eta tinkoago mantendu, orduan eta egoera depresibo sakonago batean murgilduta aurkituko dira animaliak.

Emaitzek adierazi dutenez, nerabezaroan gehiegizko alkohol kontsumoaren ondorioz ematen den depresioa epe luzean mantentzen den egoera bat da. Ingurune aberastuak, berriz, saguek kontrol egoera arruntera bueltatzeko ahalmena dutela adierazi du.

Estutasun maila neurtzeko argipeko-ilunpeko kutxaren portaera proba

Portaera proba honen bitartez animaliek islatzen duten estutasuna edo estres maila neurtuko dugu. Horretarako, bi zatitan banaturik dagoen kutxa erabiliko da; kutxaren lehenengo zatia ilunpean egongo da eta bestea, berriz, saguentzako estresagarria den argi bizian.

Portaera proba honetan ez dira taldeen arteko ezberdintasun nabarmenik antzeman. Hortaz, nerabezaro garaian alkoholaren kontsumoaren ondorioz eman daitekeen estutasuna, luzarora mantentzen ez den efektua da.

Teknika elektrofisiologikoak

Elektrofisiologiako tekniken bitartez, talde esperimental ezberdinen hipokanpoko neurotransmisioa eta plastikotasunaren ikerketa zertu zen. Zehazki, epe luzeko depresioaren (ELD) plastikotasun motaren azterketa sakona egin zen. Beste behin, aberastutako ingurugiroen ahalmena ikusi zen, non, alkohol kontsumoaren ondoriozko neurotransmisioaren eta ELDren galera berreskuratu egiten zen.

Behin IAK plastikotasunean eragiten dituen aldaketak aztertuta, farmako antagonista ezberdinen erabilpenaz CB₁ hartzailearen, 2-AGren eta AEAREN endokannabinoiden eta mGluR5 eta mGluR1 hartzaile metabotropikoen inplikazioa aztertu zen plastikotasun mota honetan.

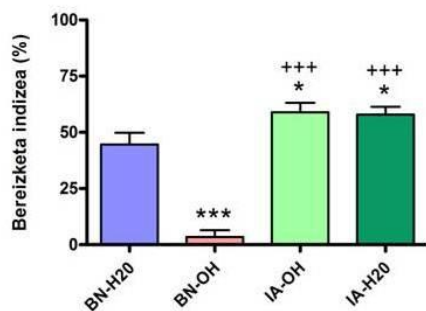
Emaitzek nola CB₁, mGluR5, mGluR1 hartzaileen hala 2-AG endokannabinoiden inplikazio zuzena adierazi zuten behatutako epe luzeko depresioetan. AEAK, berriz, ez zuen inongo eraginik adierazi plastikotasun mota honetan.

4. Ondorioak

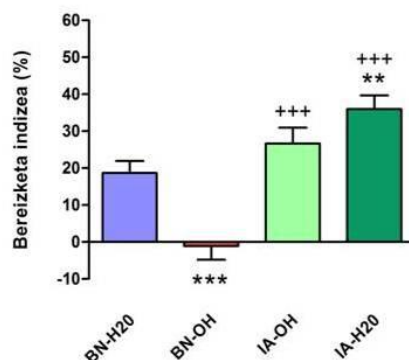
Nerabezaroan alkoholarekin tratatutako animaliek (BN-OH) epe luzeko galera esanguratsua adierazi zuten oroimen probetan, mugimendu koordinazioan eta orekan, urarekin tratatutako animaliekin alderatuz (BN-H₂O). Era berean, BN-OH taldeak egoera depresibo adierazkorrago bat aurkeztu zuen BN-H₂O taldearekin erkatuz. Halere, saguak ingurune aberastuko kaiioletan barneratzean (IA-OH) parametro guzti hauen berreskurapen adierazgarria ikus zitekeen (4. irudia). Bestalde, ez ziren taldeen arteko ezberdintasun esanguratsurik behatu estutasun maila neurtzerakoan.

4. irudia. a) Objektu berrien ezagutze proban eta b) kokaleku berrien portaera proban talde ezberdinek erakutsi dituzten bereizketa indizeak c) Rotarod aparatuan neurtutako latentzien adierazpena d) orekan proban lortutako emaitzen grafika eta talde esperimental bakoitzak aurkeztu dituen e) depresio maila eta f) estutasun mailaren neurketa.

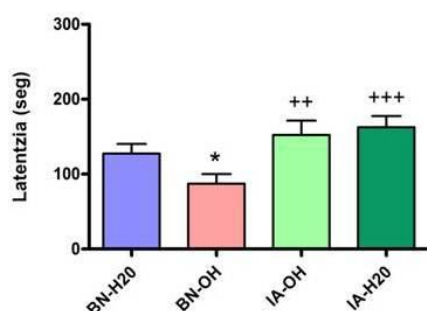
a) Objektu berrien ezagutze proba



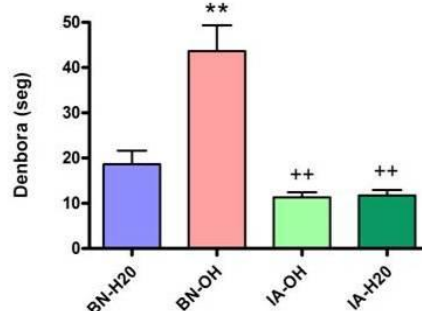
b) Kokaleku berrien portaera proba



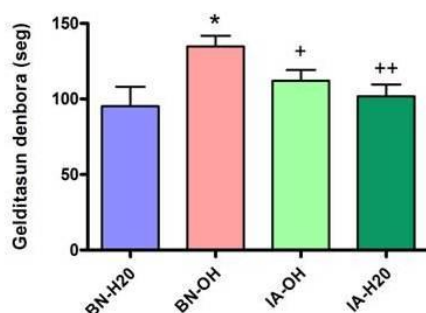
c) Koordinazio motorea



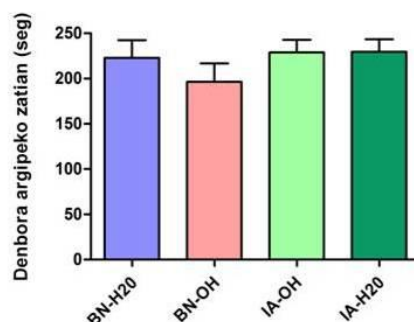
d) Oreka proba



e) Depresio maila

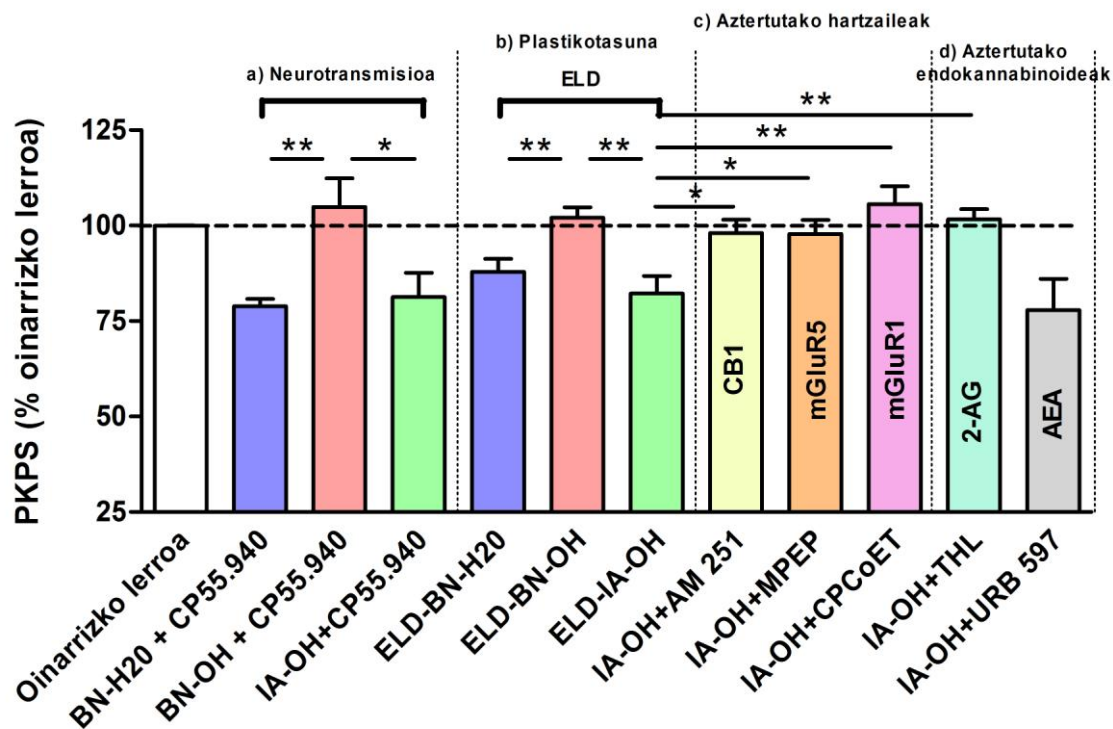


f) Estutasun maila



Ildo hau jarraituz, animalia alkoholikoek, kontrolekin parekatuz CB₁ hartzailearen bitarteko neurotransmisio eta plastikotasunaren gutxipena adierazi zuten hipokanpoan, kontroletan lortutako ELDk deuseztatuz. Harrigarriro, animalia hauek aberastutako kaioretan sartzean CB₁-mendeko-neurotransmisioaren berreskurapena eta mGluR1-mGluR5-CB1-2-AG-mendeko-ELD-ren sustapena ematen zen, kontrol mailako plastikotasuna bermatuz. Bestalde, lortutako emaitzek, aztertutako plastikotasun mota honetan, AEAREN inplikazioa ELD hauetan baztertu zuten (5. irudia).

5. irudia. a) CB₁ hartzailearen bitarteko neurotransmisio sinaptiko kitzikitzailaren azterketa (CP55.940: CB₁ hartzailearen agonista) b) epe luzeko depresioaren (ELD) azterketa c) IA-OH taldeko plastikotasunaren azpian dauden hartzaile ezberdinen inplikazioa (AM 251: CB₁ hartzailearen antagonista; MPEP : mGluR5 hartzailearen antagonista; CPCoET: mGluR1 hartzailearen antagonista) eta d) IA-OH taldeko plastikotasunaren azpian dauden endokannabinoiden ezberdinen inplikazioa (THL: DAGL-ren inhibitzailea; URB 597: FAAH-ren inhibitzailea)



5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

1947. urtean, Donald Hebbek aberastutako ingurugiroen potentzialtasuna deskribatu zuenetik, hainbat eta hainbat ikerketak egiaztatu dituzte IAren baldintzen efektu onuragarriak: odol hodi berrien sorrera (Sirevaag et al., 1988), neurogenesiaren sustapena (During eta Cao, 2006) edo neurotrofinen adierazpena (Pham et al., 2002), esaterako. Beraz, paradigma honen efektu mesedegarri hauek berrestu egin ostean, ez da harritzekoa urtetan zehar, zentzumen anitzeko terapia edo tresna neurobabesle gisa aldarrikatu izana. Izan ere, ezagunak dira dagoeneko Alzheimer (Cracchiolo et al., 2007), Parkinson (Herring et al., 2008) edo Huntington (Nithianantharajah et al., 2008) bezalako gaixotasun neuroendekapenezkoetan IAk eragindako osasun hobekuntzak. Ildo hau jarraituz, IAren erabilpena alkoholismoaren terapian norabide egingarria du. Ikerlan honek sendo aurkeztu ditu paradigma honen onurak, beraz, etorkizunari begira IA tresna baliagarria bilakatu daiteke alkoholismoaren menpe bizi diren edo bizi izan diren pertsonen osasun kalitatea hobetzeko.

6. Erreferentziak

- Clark, D.B., Thatcher, D.L. eta Tapert, S.F. (2008) Alcohol, psychological dysregulation and adolescent brain development, *Alcoholism, clinical and experimental research*, 32, 375-385.
- Cracchiolo, J.R., Mori, T., Nazian, S.J., Tan, J., Potter, H. eta Arendash, G.W. (2007), Enhanced cognitive activity over and above social or physical activity is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Abeta deposition, and increasesynaptic immunoreactivity. *Neurobiology of learning and memory*, 88, 277-294.
- Di Marzo, V. eta Piscitelli, F. (2015), The endocannabinoid system and its modulation by phytocannabinoids, *Neurotherapeutics*, 12, 692-698.
- During, M.J. eta Cao, L. (2006), VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis, *Current alzheimer research*, 3, 29-33.
- Herring, A., Yasin, H., Ambree, O., Sachser, N., Paulus, W. eta Keyvani. K. (2008), Environmental enrichment counteracts Alzheimer's neurovascular dysfunction in Tg-CRND8 mice, *Brain Pathology*, 18, 32-39.
- Iannotti, F.A., Di Marzo, V. eta Petrosino, S. (2016), Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: targets, metabolism and role in neurological disorders, *Progress in lipid research*, 62, 107-128.
- Keshavan, M.S., Giedd, J., Lau, J.Y., Lewis, D.A. eta Paus, T. (2014). Changes in the adolescent brain and the pathophysiology of psychotic disorders, *Lancet Psychiatry*, 1, 549-558.
- Kyzar, E.J., Zhang, H., Sakharkar, A.J. eta Pandey, S.C. (2016), Adolescent alcohol exposure alters lysine demethylase I (LSD I) expression and histone methylation in the amygdale during adulthood, *Addiction Biology*, 1-14.
- Nithianantharajah, J., Barkus, C., Murphy, M. eta Hannan, A.J. (2008), Gene-environment interactions modulating cognitive function and molecular correlates of synaptic plasticity in Huntington's disease transgenic mice, *Neurobiology of disease* 29, 490-504.
- Pham, T.M., Winblad, B., Granholm, A.C. eta Mohammed, A.H. (2002), Environmental influences on brain neurotrophins in rats, *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 73, 167-175.
- Sirevaag, A.M., Black, J.E., Shafron, D. eta Greenough, W.T. (1988), Direct evidence that complex experience increases capillary branching and surface area in visual cortex of young rats, *Brain research*, 471, 299-304.
- Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., Hebert, M. eta Morimoto, H. (1978), Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments, *Brain research*, 153, 563-576.
- Tau, G.Z. eta Peterson, B.S. (2010), Normal development of brain circuits, *Neuropsychopharmacology*, 35, 147-168.
- Vetreno, R.P. eta Crews, F.T. (2015), Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning, *Frontiers in neuroscience* 9, 35.

7. Esker onak

Ikerlan honek Eusko Jaurlaritzako (IT764-13); SAF2015-65034-R (MINECO/FEDER), Euskal Herriko Unibertsitateko (UFI 11/41) eta Red de Trastornos Adictivos-Instituto de Salud Carlos III-ko RD12/0028/0004 diru laguntzen babesa jaso du.

Haur Astinduaren Sindromearen inguruko hausnarketa eta Erizaintzaren esku hartzea

Astoreka Atxikallende, Leire¹ eta Hoyos Cillero, Itziar²

¹Bermeoko Ospitalea. Osakidetza

²Erizaintza Saila I. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea. Euskal Herriko Unibertsitatea
leireas_94@hotmail.com

Laburpena

Haur Astinduaren Sindromea osasun publikoko arazo larri bat da eta ondorio fisiko eta psikologiko zuzen eta larriak dakartza. Haurren segurtasuna arriskuan jartzen duen fenomeno bat denez, eta arrisku faktoreetariko batzuk prebenigarriak direla kontuan izanda, garrantzitsua da gizarte mailan zein osasun sisteman, honen inguruko ezagutzak zabaltzea. Erizaintzako profesionalak honen inguruko formakuntza edukitzea beharrezkoa da detekzio, prebentzio eta deribazio lana modu egokian egin ahal izateko. Berrikuspen bibliografiko honen helburua, sindromearen gaineko hausnarketa bat egitea da, arrisku faktore garrantzitsuenak identifikatuz, ondorioak aztertuz eta erizaintzako profesionalen rol eta eginkizunak zehaztuz.

Hitz gakoak: Haur Astinduaren Sindromea, ondorioak, arrisku faktoreak, erizaintza, prebentzioa, hezkuntza.

Abstract

Shaken Baby Syndrome is a severe problem of public health and it causes straight and critical physical and psychological consequences. As a phenomenon that endangers the security of the children, and considering that some of the danger factors are preventable, it is important to take knowledge about this syndrome at the level of the society and health system. It is necessary that the nursing professionals had knowledge about this to act in an adequate way in its detection, prevention and derivation work. The objective of this bibliographic revision is to make a reflection on the syndrome, studying the most important risk factors, identifying consequences and specifying the role and participation of these professionals.

Keywords: Shaken Baby Syndrome, outcomes, risk factors, nursing, prevention, education.

1. Sarrera eta motibazioa

Haurrenganako tratu txar fisiko edo indarkeria, osasun egoeran zein ongizatean era larrian eragiten duen ohiko arazoa da gaur egungo gizartean (Centers for Disease Control and Prevention, 2010; Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Samaha et al., 2015). Hau horrela izanik, osasun publikoko problematika garrantzitsua ere bada (Walls, 2006; CDC, 2010; Scribano et al., 2013; Hinds et al., 2015; Samaha et al., 2015).

Gurasoen edo haurra zaintzeaz arduratzen diren pertsonen ekintzen ondorioz, haurraren osasun fisikoa eta segurtasuna edo ongizate psikologikoa arriskuan denean esan ohi da tratu txarrak edo gehiegikeriak gertatzen direla. Tratu txarrak ekintzaz edo omisioz eta zabarkeriaz gerta daitezke. Saillkapenik erraz eta operatiboenak ondorengo lau tratu txar mota deskribatzen ditu: tratu txar fisikoa, zabarkeria, sexu abusua eta tratu txar emozionala (Walls, 2006). Tratu txar fisikoa da, ume edo nerabeei gurasoen edo zaintzaileen edozein ekintzaren ondorioz, istripuz gertatutakoak izan ezik, kalte fisikoa edo gaixotasuna eragiten dien hura. Isolatutako ekintza bat edo gertakari errepikarien emaitza izan daiteke eta tratu txar mota honen barnean dago, ingelesez *Shaken Baby Syndrome* (SBS) deritzona, hau da, Haur Astinduaren Sindromea (Walls, 2006; CDC, 2010; Stewart et al., 2011).

Estatu Batuetako Centers for Disease Control and Prevention-ek (CDC) era honetara definitzen du sindrome hori: ume jaioberri batek edo bost urte baino gutxiago dituen haur batek astindu bortitz edo inpaktu sendo baten ondorioz, garunean edo garun barruko edukian jasaten duen lesioa (CDC, 2013). Arrazoi desberdinak direla bide, heldu batek haurra sorbalda, beso edo oinetatik hartu eta astindu egiten du. Astintzeak, azelerazio eta desazelerazio mugimenduen ondorioz haurraren burua aurretik atzera oszilatzea dakar (Goulet et al., 2009; Quintero eta Romero, 2009). Mugimendu honetan sortutako indarrak, garun barneko egituretara transmititu eta arnas gelditze bat eragitera hel daiteke. Apnea egoera horren ondorioz, gorputzeko oxigenazio maila, batez ere garunekoa, jaitsi egiten da eta, kasu askotan, itzulezinak diren lesio hipoxiko-iskemikoak sortzen dira (Walls, 2006; Quintero eta Romero, 2009).

Terminoaren inguruko definizioak

Maila zientifikoan gehien erabiltzen den terminoa *Shaken Baby Syndrome (SBS)* izan arren, 2009. urtean Amerikako Pediatria Akademiak, horren ordeze ingelesezko *Abusive Head Trauma (AHT)* terminoa erabiltzea gomendatu zuen (AAP, 2009). SBS-k ez bezala, termino horrek sindromearen aurkezpen klinikoak, aurkitze erradiologikoak eta ondorioak barnebildu eta sindromearen definizio zehatzagoa ematen du. Bi urte beranduago, 2011. urtean, Ingalaterrako eta Galeseko Koroako Fiskaltza Orokorrak, SBSren ordeze *Non Accidental Head Injury (NAHI)* edota garun lesio traumatiko terminoaren erabilera hobetsi zuen (The Crown Prosecution Service, 2011).

Gaur egun, terminologiari dagokionez, eztabaida ugari dago eta artikuluko zientifikoaren edota informazio iturriaren arabera, definizio bata zein bestea erabiltzen da (Frasier et al., 2014; Hinds et al., 2015). Definizio horiek guztiak sinonimotzat hartzen direnez, lan honetan zehar erabiltzeko *Haur Astinduaren Sindromea* terminoa aukeratu da aurrez aipatutako hiru terminoen artean erabiliena eta ezagunena baita.

Haur Astinduaren Sindromearen intzidentzia

Haur Astinduaren Sindromeaz diagnostikatutako haurrek, istripuz gertatutako garun lesioak jasan dituzten haurrekin alderatuz gero, hiltzeko bost aldiz probabilitate handiagoa izaten dute (Barr, 2014). Gainera, zeinu eta sintomak ez dira beti agerikoak izaten. Hori dela eta, askotan diagnostikatzea zaila izaten da, ez da diagnostikatzeko edota diagnostikatzeko den kasu batzuetan gaizki egiten da (Frasier et al., 2014). Sindrome hau duten haurren heren bat izaten da hasiera batean txarto diagnostikatuak. Honek, lesioa berriz agertzeko arriskua igotzen du eta konplikazio medikoak agertzea dakar (Barr, 2014; Hinds et al., 2015).

Zentralizatutako erregistro edota estatistika irmorik ez dagoenez, Haur Astinduaren Sindromearen inguruko datuak estimazio bat besterik ez dira (CDC, 2010). Populazioaren arabera zifrak aldatu arren, urte bat baino gutxiago duten haurretan intzidentzia tasa 100.000 haurretatik 14-40 haurretakoa dela estimatzen da (Quintero eta Romero, 2009; Hinds et al., 2015). Zelanda Berrian esaterako, 100.000 laktantetatik 14.7-19.6koa zela ikusi zuten sindrome honen intzidentzia (Kelly eta Farrant, 2008) eta Karolina iparraldean 100.000 haurretatik 17 izan ziren tratatu txarren ondoriozko garun lesioz diagnostikatuak (Keenan et al., 2003). Europa mailan, Estonian egindako ikerketa batean, 1997. urtetik 2003. urtera bitartean haurren garun lesio ez traumatikoak izateko intzidentzia tasa 100.000 haurretatik 28.7koa zela ikusi zen. Urte bat baino gutxiago zuten haurrak ziren guztiak (Talvik et al., 2006). Eskozian egindako beste ikerketa batean ere, antzeko datuak lortu ziren. Urte bat baino txikiagoetan 100.000 haurretatik 24.6koa zen tratatu txarren ondoriozko garun traumatismoak izateko intzidentzia tasa (Barlow eta Minns, 2000). Mundu mailan honen gaineko informazioa, hala nola, prebalentzia eta intzidentzien gaineko zenbait datu egon arren, gure inguruan, ez dago sindrome honen inguruko informazio edo protokolo zehatzik osasun arazo hau pairatzen duten haurren kasuak detektatzeko.

Momentuko egoera

Aurrez aipatu bezala, Haur Astinduaren Sindromea osasun publikoko arazo larri bat da. Arlo ezberdinetan eragin eta hainbat ondorio sortzen ditu (CDC, 2010; CDC, 2013; Allen, 2014; Barr, 2014).

Alde batetik, haurrengan eta hauen ingurukoengan eragiten du. Haurrei dagokienez, euren garapen fisiko, sozial eta psikologikoan izaten du eragina. Gaitz konplexua eta aldakortasun handikoa izanik, astindua izan diren hurrez gain euren familietan ere, maila ezberdinetan, ekonomikoan, psikologikoan etab.ean eragin eta inpaktu handia sortzen duela adierazten den arren, ez da ondorio hauek zeintzuk diren ebidentzian jartzen duen informazio zehatzik (CDC, 2010; Allen, 2014; Barr, 2014).

Haurren eta euren senitartekoez haratago, arlo klinikoan ere eragina du sindrome honek. Lehen Mailako Atentzio Pediatrikoetan, denbora, gastu eta errekurso asko kontsumitzeaz gain, haurren ospitaleratze eta ospitalerako bisitak gehitzeko arrazoi ere badela ikusi da (Walls, 2006). Horrez gain, bestelako alderdi batzuen inplikazioa ere eskatzen du, besteak beste, alderdi mediko, sozial, legal eta ekonomikoak aipa daitezke (CDC, 2010; CDC, 2013; Allen, 2014; Barr, 2014).

Haurren segurtasuna arriskuan jartzen duen fenomeno bat denez, ezinbestekotzat jotzen da osasun profesionalek gai honen inguruko ezagutza edukitzea. Azken finean, astintzearen biktima izan ostean, osasun arloko profesionalekin harremana izango dute haur horiek. Hori dela eta, osasun profesionalei dagokienez, astindua izan den haur batek izan ditzakeen manifestazioak antzematen jakitea lagungarria izango da osasun arazo honi aurre egin ahal izateko (Hinds et al., 2015).

Astindua izan den haurraren lesioetariko batzuk itzulezinak direla kontuan hartuta, arlo klinikoan baino gehiago detekzioan eta prebentzioan egin beharko da lan. Zeregin horien barnean, beste osasun profesional batzuekin batera erizaintzako profesionalak egongo dira eta berebiziko papera jokatu dute (CDC, 2010; Hinds et al., 2015). Modu honetan, erizaintzako profesionalei lotuta, detekzio, prebentzio eta deribazio lana egiteaz gain, hezkuntza eta ikerketa arloan jardutea beharrezkoa dela ikusten da. Azken bi eremu hauetan lan egitea lagungarria litzateke sindrome honen kasu gehiago detektatu, informazioa eguneratu, prebalentzia eta intzidentzien gaineko datu zehatzak eskuratu eta etorkizun batean protokolo eta gida egokiak garatzeko. Ikerketen bidez, erizaintzako profesionalek sindrome honetan dituzten rol eta eginkizunak zehaztea ez ezik, hauen lana erraztu eta protokolizatzea lortuko litzateke.

2. Ikerketaren helburuak

Haur Astinduen Sindromearen detekzio eta prebentzio neurriak egokiak izan daitezen, interesgarria eta zentzuzkoa litzateke, gizarte mailan zein osasun sisteman honen inguruko ezagutzak zabaldu eta helaraztea.

Ikerketa lan honen helburua, berrikuspen bibliografiko bat burutzea izan da, osasun arazo honen gaineko hausnarketa eginez eta prebentzioan modu egokian lan egin ahal izateko informazioa eguneratuz.

Horretarako, honako helburu hauek zehaztu dira:

- 1) Haur Astinduen Sindromearekin erlazionatzen diren arrisku faktore garrantzitsuenak deskribatzea.
- 2) Astintze horrek haurrengan nolako inpaktua duen identifikatzea; ondorio fisiko eta psikologikoak aztertuz eta aurkikuntza klinikoetan eta sintomatologian zentratuz.
- 3) Erizainek sindrome honetan dituzten rol eta eginkizunak aztertzea.

3. Ikerketaren muina

Berrikuspen bibliografiko honen helburuei erantzuteko asmoz, 2015eko urritik 2016ko apirilera bitartean, bilaketa bibliografiko ezberdin bi burutu ziren. Alde batetik, bilaketa orokor bat egin zen gaia aztertu eta finkatzeko. Bestalde, berrikuspenerako artikulua lortzeko, bilaketa zehatzago bat egin zen Pubmed, Web of Science, Scopus, Cochrane eta Lilacs datu baseetan. Bigarren bilaketa zehatzago honetan helburuen arabera hitz gako garrantzitsuenak identifikatu ziren eta hiru estrategia erabiliz burutu zen, ondoren azaltzen den bezala. Hiru estrategietarako erabili ziren “shaken baby syndrome [MeSH]” eta “abusive head trauma” hitz gakoak. Lehenengo estrategiarako, bi hitz gako horiez gain,

“risk factors [MeSH]” hitz gakoa erabili zen. Bigarren estrategiarako, horiez gain, “outcomes” hitz gakoa izan zen erabili zena eta hirugarren estrategiarako, hitz gako horiez aparte, “prevention [MeSH]”, “education [MeSH]” eta “nursing [MeSH]” izan ziren erabilitakoak. Onartze eta baztertzeko irizpide sistematikoak kontuan hartu ostean, 17 artikulua eta bi gida kliniko aukeratu ziren. Onartze irizpideak ondorengo baldintza hauetara mugatu ziren; datari dagokionez, 2003. urteaz geroztik argitaratutakoa izatea; hizkuntzari dagokionez, ingelesez edo gaztelaniaz idatzita egotea eta ikerlan motari dagokionez, ikerketa zientifiko, entsegu kliniko, ebidentzian oinarritutako artikulua edo praktika klinikorako gida izatea. Baldintza horiek bete ez zituzten ikerlanak, baztertu egin ziren. Hautatutako ikerlanekin gaia landu zen.

Jasotako emaitza nagusiak hiru ataletan laburbildu dira proposatutako helburuei erantzuteko asmoz. Lehenik eta behin, haur bat astintzera eramaten duten arrisku faktoreak eta eragileak zeintzuk diren aztertu da; bigarrenik, sindromeak haurraren eragiten dituen ondorio fisiko eta psikologiko garrantzitsuenak deskribatu dira, hala nola sortarazten duen klinika eta sintomatologia; eta azkenik, erizainek prebentzio estrategietan betetzen duten funtsezko papera aztertu da.

3.1 Haur Astinduaren Sindromearekin erlazionatzen diren arrisku faktoreak

Lehen atalari dagokionez, Haur Astinduaren Sindromearen arrisku faktoreak guraso, haur eta ingurunearekin erlazionatzen direla deskribatu da.

Gurasoekin erlazionatzen diren arrisku faktoreak, esperientziarik eza, guraso bakarra izatea edota espektatiba irrealak edukitzea dira (Walls, 2006; CDC, 2010; CDC, 2013). Arrisku faktore horiek aztertzen hasiz gero, hauen oinarrian, guraso edo zaintzaileen estres egoeren aurreko maneio okerra dagoela ondorioztatu daiteke. Alderdi psikologikoan estresari aurre egiteko tresna nahikoa ez izateak, egunerokotasuneko zenbait egoeren aurrean gehiegizko eta kasu askotan ulertezina den erantzun bat ematera eramaten du. Kasu honetan haurraren negar kontsolaezinen edota ezgaitasunekin jaio diren haurren aurrean edukitzen diren jokaerak izaten dira horrelakoak. Haur Astinduaren Sindromearen horrelako kasuetan, haurra astintzeko arrazoiak artean ez da inoiz ere eta ezjakintasuna egongo, baizik eta, sarritan, arazo psikologikoak.

Haurrekin erlazionatzen diren arrisku faktoreak edota haur bat astintzera eramaten duten eragile nagusiak, negar jasanezina eta honek gurasoen aurrean sortzen duen estresa direla baieztatu da. Aztertutako artikulua gehienak bat datoz esatean sindrome honen arrisku faktoreak garrantzitsuenak haurren negar kontsolaezina (Walls, 2006; CDC, 2010; CDC, 2013; Allen, 2014; Barr, 2014; Hinds et al., 2015), honek gurasoei eragiten dien estresa (Walls, 2006; CDC, 2010; CDC, 2013; Barr, 2014), haurrak urte bat baino gutxiago izatea (Walls, 2006; CDC, 2013; Allen, 2014; Hinds et al., 2015) eta biktimak zein erasotzailea generoari dagokionez gizonetako (Walls, 2006; CDC, 2010; CDC, 2013; Allen, 2014) izatea direla.

Ingurunearekin eta erasotzailearen perfilarekin erlazionatzen diren arrisku faktoreak artean, besteak beste, substantzia toxikoak kontsumitzea, etxeko indarkeria jasan izana, tratatu txarren biktimak izan izana, maila sozioekonomiko baxua izatea eta laguntzen gabezia pairatzea daude. Faktore hauetariko asko aldatu edo moldatzeko zailak direla ikusi da (Barr, 2014). Arrisku faktore hauek estresarekin duten erlazio zuzenaz gain, normalean erasotzailearen profila konkretua izan ohi dela deskribatzen dute. Kasu askotan tratatu txarren biktimak izan diren haurrak gero erasotzaileak izaten direla ikusi da aztertutako ikerlanetan (Walls, 2006; CDC, 2010; CDC, 2013).

3.2 Haur Astinduaren Sindromearen ondorio fisiko eta psikologikoak, aurkikuntza klinikoak eta sintomatologia

Bigarren atalari dagokionez, aztertu ziren ikerketa gehienak bat datoz esatean epe luzera sindrome honen ondorio benetan larriak ekar ditzakeela baina desadostasun ugari ere badaude, eta ikerketa gehiagoren beharra antzematen da arlo honi dagokionez (Walls, 2006; Allen, 2014; Barr, 2014; Hinds et al., 2015; Samaha et al., 2015). Autore batzuek astindua jasan duten haurren herena hil egingo dela adierazten duten bitartean (Walls, 2006; Deyo et al., 2008; Samaha et al., 2015), Centers for Disease Control and Prevention-aren gidek haur horietatik laurdena izango dela hilko den haurren kopurua adierazten dute (CDC, 2010; CDC, 2013).

Sindrome honek haurraren duen inpaktua zein den ezagutzeko, ondorio fisiko eta psikologikoak, aurkikuntza klinikoak eta sintomatologia aztertu ziren.

Ondorio fisikorik aipatuena ondorio neurologikoak (Walls, 2006; Goulet et al., 2009; Stewart et al., 2011; Hinds et al., 2015; Samaha et al., 2015), ikusmen arazoak (Stewart et al., 2011; Hinds et al., 2015; Samaha et al., 2015) eta ondorio kognitiboak (Goulet et al., 2009; Stewart et al., 2011; Hinds et al., 2015; Samaha et al., 2015) dira.

Aurkikuntza klinikoei dagokienez, autore gehienek bereizgarrienak erretinako hemorragia, hezur luzeen hausturak eta hematoma subduralak direla baieztatzen dute (Quintero eta Romero, 2009; Lopes et al., 2013; Nadarasa et al., 2014).

Sintomatologiari erreferentzia eginez, haurren %91k astinduak izan eta berehala sintomatologiaren bat adierazten dutela deskribatu da (Hinds et al., 2015). Kalte gutxi jasaten duten haurraren, sintoma arinak agertzen dira oro har, haurtzaroko gaixotasun ohikoenen sintoma komunekin nahas genitzakeenak (Walls, 2006). Esaterako, lo-patroia aldatzea, haurra esnatzeko ezintasuna, oka egitea, konbultsioak edo atakeak izatea, suminkortasuna, negar kontsolaezina edota bularra emateko edo jateko ezintasunak (Walls, 2006; Quintero eta Romero, 2009; CDC, 2010; CDC, 2013). Sindromearen kasu larrienen ordea, haurraren erantzun gabezia, kontzientzia galera, arnas arazoak (arnasketa irregularra edo ez arnastea), bradikardia, garun zirkunferentzia handia, hipotermia, fontanela abonatuak eta pulsu gabezia eragin dezake (Walls, 2006; CDC, 2010; CDC, 2013).

Ondorio psikologikoei dagokienez, Haur Astinduaren Sindromea jasan duten hurrek, beharrezkoa izaten dute jarraipen psikiatriko bat eta sarritan psikoterapia jasotzen dute (Lind et al., 2016). Haur gehienak, jokabideari dagozkion ondorioak ere izaten dituzte, hauen artean, suminkortasuna, inpulsibitatea, frustrazioarekiko intolerantzia, asaldura eta amorrualdi kasuak dira aipagarrienak (Allen, 2014; Hinds et al., 2015; Lind et al., 2016).

Hala ere, zeinu eta sintomak ez dira beti agerikoak izaten. Hau dela eta, sindrome honen diagnostiko zailtasunek kasu asko ez detektatzea ekartzen dute eta kasu batzuk soilik detektatzeak, diagnostikoan aurrera egitea zailtzen du (Stewart et al., 2011). Hori horrela izanik, zailtasunak daude gaur egun aurretik aipatutako aurkikuntzak benetan haur astinduaren ondorioz edota istripu traumatiko baten ondorioz gertutakoak diren esaterako orduan (Quintero eta Romero, 2009; Hinds et al., 2015).

Sindrome honek haurraren ez ezik, gurasoengan ere ondorio ugari ekarriko dituela pentsatu arren, ez da hau ebidentzian jartzen duen informazio zehatzik aurkitu (Allen, 2014; Hinds et al., 2015; Lind et al., 2016).

3.3 Erizaintzaren rola eta eginkizunak

Azken atalari dagokionez, osasun alorreko profesionalak, erizaintzakoak barne, astinduak izan diren hurrekin eta hauen senitartekoekin harremana izaten dutenez, arrisku egoerak detektatzeko eta prebentzio jarduerak burutzeko orduan aldeko posizio batean egoten direla deskribatu da aztertutako ikerlanetan (Walls, 2006; Quintero eta Romero, 2009; Allen, 2014; Samaha et al., 2015). Erizaintzako profesionalak erreferentzia eginez, horien lana gehienbat prebentzioan zentratzen dela azpimarratu beharra dago (Quintero eta Romero, 2009; Allen, 2014). Horrek, sindrome honen aurrean funtsezko zeregin bat betetzen dutela adierazten du. Hala ere, prebentzioaren barruan, detekzioa, deribazioa eta prebentzioa bera desberdintzea garrantzitsua da.

Samaha eta taldekideek adierazten duten moduan, detekzio lana erizaintzako profesional guztiek egingo duten arren, zeregin horretan larrialdi zerbitzuetako eta pediatriako erizainen lana izango da garrantzitsuenetakoa (Samaha et al., 2015).

Prebentzioari dagokionez, honako hau gehienbat lehen mailako arretako erizainek eta pediatriako kontsultetakoek egiten dutela deskribatu da (Walls, 2006; CDC, 2013). Honela, prebentzioaren barruan, erizain profesionalen funtzioei dagokienez, osasun hezkuntza egitea berebizikoa da. Hala ere, garrantzitsua da aipatzea kasu honetan prebentzio lana ez dela populazio osoa heztean oinarritzen, baizik eta pertsona egokiei une egokian sindrome honen inguruko informazioa ematea dela (Dias et al.,

2005). Detekzioa egin ostean, jada arazoa agertzean, horren tratamenduan parte hartu beharko da, beharrezkoak diren sendaketak eginez. Kasu batzuetan, deribazioa egitea ere beharrezkoa izango da. Oro har, modu multidisziplinari batean jardun beharko da, sendagile, psikologo, gizarte langile, eta abarrekin.

Lehen mailako prebentzio estrategien barruan, osasun programak aipatzea beharrezkoa da. Aztertu ziren ikerketa gehienek garrantzitsutzat hartzen dute osasun programa hauen ebaluazioa egitea, euren inpaktua aztertzeko eta lehen mailako prebentzioa egiten jarraitzea beharrezkoa den edo ez ikusteko (Deyo et al., 2008; Fujiwara et al., 2012).

Kasu gehienetan, emagin edo eta neonatologiako erizainek jorratutako osasun programak izaten direla ikusi da (Deyo et al., 2008). Gurasoen partetik oro har, %93-%98k emandako informazioa erabilgarria izaten dela adierazi dute burututako ikerketa ezberdinetan (Dias et al., 2005; Deyo et al., 2008; Goulet et al., 2009; Stewart et al., 2011). Interbentzio gehienak erizaintzako profesionalek zuzendutakoak izatea, hauen ardurapean egotea eta gurasoen aldetik harrera ona jasotzea seinale onak dira.

Interbentzioetan parte hartu duten gurasoen kontrol taldeekin konparatuz gero, informazioa azaltzeko eta negarraren gaineko ezagutza eta estresari aurre egiteko teknikak burutzeko gaitasun gehiago erakusten dutela behatu da (Barr et al., 2009; Fujiwara et al., 2012). Aurre egiteko teknika horiei dagokionez, artikuluen artean adostasunik egon ez arren, gehien aipatzen direnak honako hauek dira: haurra ohean jarri eta gelatik ateratzea (Goulet et al., 2009; Meskauskas et al., 2009), familiako kide edo lagunen bati deitzea laguntza eske (Deyo et al., 2008; Goulet et al., 2009; Meskauskas et al., 2009) eta paseo bat ematera irtetea (Deyo et al., 2008; Goulet et al., 2009). Hauek gain abestea, musika jotzea, elikatzea, meditazioa (Deyo et al., 2008) edota laguntzarako telefono-zenbakira deitzea (Meskauskas et al., 2009) bezalakoak ere aipatzen dira.

Artikuluen artean, zenbait limitazio ere aurkitu ziren. Ezagutza eta jarrera aldageta gehienak amei soilik zuzendutakoak ziren eta erasotzaileak kasu gehienetan generoz gizonezkoak izaten direla deskribatu da (Fujiwara et al., 2015). Horrez gain, programa askotan ez zen interbentzio aurretiko ezagutza aztertzen eta horrek ez zuen interbentzioaren eraginkortasuna aztertzeko aukerarik ematen (Goulet et al., 2009). Detekzioari dagokionez, kasu askotan aurkitzen diren zailtasunak, kasu soilak ez detektatzera eramaten dute. Stewart eta taldekideek adierazten dute detekzioa tratatu txarretan aditua den langile batek egin arren, beti geldituko dela kasu soilen bat (Stewart et al., 2011). Honela, kasu askotan, ezin da ziurtasunez programa intzidentzia tasaren murrizketaren arrazoia izan den edo ez adierazi.

4. Ondorioak

Haur Astinduen Sindromearen arrisku faktoreak hurrekin, gurasoen eta ingurumenarekin erlazionatuta daude. Gurasoen erlazionatutako artean, hauen esperientziarik eza, guraso bakarra izatea eta espektatiba irrealak edukitzea dira aipagarrienak. Hurrekin erlazionatutako arrisku faktorerik garrantzitsuenak negar kontsolaezina, honek gurasoei sorrarazten dien estresa, haurrak urte bat baino gutxiago izatea eta biktima zein erasotzailea generoari dagokionez gizonezkoa izatea dira. Erasotzailearen perfilarekin eta ingurumenarekin erlazionatutako arrisku faktoreen artean, substantzia toxikoak kontsumitzea, etxeko indarkeria jasan izana, tratatu txarren biktima izan izana, maila sozioekonomiko baxua eta kanpo laguntzen gabezia daude. Arrisku faktore horietako batzuk prebenigarriak izan daitezke.

Sindrome honek ondorio fisiko eta psikologiko zuzenak eta larriak dakartza. Ondorio fisikoen artean, ondorio neurologikoak, ikusmen arazoak eta ondorio kognitiboak daude. Hauek, aurkikuntza kliniko zehatzekin eta sindromearen zeinu eta sintoma arin zein larriekin erlazionatzen dira. Ondorio psikologikoei dagokionez, ikerketa gehiago beharrezkoak dira ondorio argiagotara ailegatzeko.

Erizainaren rola detekzioa, prebentzioa eta deribazioa egitean oinarritzen da. Detekzioa egin ahal izateko beharrezkoa da sindromearen klinika eta sintomatologia ezagutzea. Prebentzioa ordea, taldean lan egitearekin eta hezkuntzarekin erlazionatuta dago.

Erizaintzaren arloan, hutsune bat antzematen da eta beharrezkoa ikusten da gaiaren inguruan gehiago ikertzea. Detekzioa egin ahal izateko protokoloak eta eraginkortasun maila altua duten osasun programak garatzea ezinbestekoa da osasun arazo honi modu eraginkorrean aurre egin ahal izateko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Sindrome honen inguruko bibliografia nahiko eskasa dela aipatzea garrantzitsua da, erizain profesionalek parte hartu eta zuzendutako osasun programak eta interbentzioak oso eskasak izanik. Horrez gain, ikerketeta gehienak, EEBBtan burututakoak direla ere aipatu beharra dago, agian sindromeak herrialde horretan duen prebalentzia altuagatik.

Erizaintzaren arloan, gaiaren inguruan gehiago ikertzea beharrezkoa ikusten da, alde batetik, agertzen diren desadostasunak argitu eta hutsuneak hobetzeko asmoz. Hauen artean, sindromearekin erlazionatzen diren sintomatologia eta ondorio psikologikoak dira batez ere desadostasun edo hutsune gehien dauden atalak. Bestetik, osasun arazo hau pairatzen duten haurren kasuen detekzioa egin ahal izateko gure ingururako baliogarriak diren osasun programa protokolizatuak garatzea ere beharrezkoa ikusten da osasun arazo honi modu eraginkorrean aurre egin ahal izateko. Era orokor batean, osasun profesionalei eta hauen artean larrialdi edota pediatria bezalako arlo zehatzetan lanean diharduten erizaintzako profesionalei, formakuntza sendoa eta egokia ematearen beharra nabaritzen da detekzioan eta prebentzioan, modu egokian lan egin dezaten.

Era berean, erizaintzako funtzioen artean osasun hezkuntzaren garrantzia azpimarratzea ezinbestekoa da. Honela, familien artean, interbentzio programetan frogatutako eta eraginkorrak diren gomendioak eta aholkuak sustatzearen beharra dago, gurasoak biak barnebilduz, ez soilik ama.

Mundu mailan gaiaren gaineko informazioa eguneratua egotea seinale ona da, honen gainean adituek ikertzen dihardutela adierazten baitu. Halere, aipatutako hutsune eta informazio gabeziari dagokionez, gehiago ikertzearen beharra dago, batez ere gure inguruan. Erizaintzako profesionalen ikuspegitik, detekzio eta prebentzio lanetan betetzen duten funtsezko papera ikusita, beharrezkoa ikusten da ikerketa gehiago burutzea, informazio gehiago eskuratu, osasun programa eta protokolo egokiak diseinatu, hala nola, eraginkorrak diren interbentzioak garatu eta frogatu ahal izateko. Gure ingurunean antzematen diren hutsuneak hobetzeko asmoarekin, eremu honetan ikertzeak berebiziko garrantzia dauka, erizainak programa eta ikerketa lerroetan arduradunak izatearen garrantzia azpimarratuz.

6. Erreferentziak

- Allen, K.A. (2014). The Neonatal Nurse's Role in Preventing Abusive Head Trauma. *Advances in neonatal care: official journal of the National Association of Neonatal Nurses*, 14(5), 336-342.
- American Academy of Pediatrics [webgunea]. (2009). [sarrera 2015eko abenduaren 5a]. Abusive Head Trauma: A New Name for Shaken Baby. Eskuragarri: <https://www.aap.org/en-us/about-the-aap/aap-press-room/Pages/Abusive-Head-Trauma-A-New-Name-for-Shaken-Baby-Syndrome.aspx>
- Barlow, K.M. eta Minns, R.A. (2000). Annual incidence of shaken impact syndrome in young children. *Lancet*, 356(9241), 1571-1572.
- Barr, R. G. (2014). Crying as a trigger for abusive head trauma: a key to prevention. *Pediatric radiology*, 44(4), 559-564.
- Barr, R.G., Barr, M., Fujiwara, T., Conway, J., Catherine, N., Brant, R. (2009). Do educational materials change knowledge and behaviour about crying and shaken baby syndrome? A randomized controlled trial. *CMAJ: Canadian Medical Association journal*, 180(7), 727-733.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010). A Journalist's guide to shaken baby syndrome; a preventable tragedy. Atlanta.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). Preventing shaken baby syndrome; a guide for health departments and community-based organizations.
- Deyo, G., Skybo, T., Carroll, A. (2008). Secondary analysis of the “Love Me... Never Shake Me” SBS education program. *Child abuse & neglect*, 32(11), 1017-1025.
- Dias, M.S., Smith, K., DeGuehery, K., Mazur, P., Li, V., Shaffer, M.L. (2005). Preventing Abusive Head Trauma Among Infants and Young Children: A Hospital-Based, Parent Education Program. *Pediatrics*, 115(4), 470-477.
- Frasier, L.D., Kelly, P., Al-Eissa, M., Otterman, G.J. (2014). International issues in abusive head trauma. *Pediatric radiology*, 44(4), 647-653.
- Fujiwara, T. (2015). Effectiveness of public health practices against shaken baby syndrome/abusive head trauma in Japan. *Public health*, 129(5), 475-482.
- Fujiwara, T., Yamada, F., Okuyama, M., Kamimaki, I., Shikoro, N., Barr, R.G. (2012). Effectiveness of educational materials designed to change knowledge and behaviour about crying and shaken baby syndrome: A replication of a randomized controlled trial in Japan. *Child abuse & neglect*, 36(9), 613-620.
- Goulet, C., Frappier, J.Y., Fortin, S., Déziel, L., Lampron, A., Boulanger, M. (2009). Development and Evaluation of a Shaken Baby Syndrome Prevention Program. *Journal of obstetric, gynecologic and neonatal nursing:JOGNN/NAACOG*, 38(1), 7-21.
- Hinds, T., Shalaby-Rana, E., Jackson, A.M., Khademian, Z. (2015). Aspects of Abuse: Abusive Head Trauma. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 45(3), 71-79.
- Keenan, H.T., Runyan, D.K., Marshall, S.W., Nocera, M.A., Merten, D.F., Sinal, S.H. (2003). A population-based study of inflicted traumatic brain injury in young children. *JAMA*, 290(5), 621-626.
- Kelly, P. eta Farrant, B. (2008). Shaken baby syndrome in New Zealand, 2000-2002. *Journal of paediatrics and child health*, 44(3), 99-107.
- Lind, K., Toure, H., Brugel, D., Meyer, P., Laurent-Vannier, A., Chevignard, M. (2016). Extended follow-up of neurological, cognitive, behavioral and academic outcomes after severe abusive head trauma. *Child abuse & neglect*, 51, 358-367.
- Lopes, N.R., Eisenstein, E., Williams, L.C. (2013). Abusive Head Trauma in Children: A Literature Review. *Jornal de pediatria*, 89(5), 426-433.
- Meskauskas, L., Beaton, K., Meservey, M. (2009). Preventing Shaken Baby Syndrome. A Multidisciplinary Response to Six Tragedies. *Nursing for women's health*, 13(4), 325-330.
- Nadarasa, J., Deck, C., Meyer, F., Willinger, R., Raul, J.S. (2014). Update on injury mechanisms in abusive head trauma – shaken baby syndrome. *Pediatric radiology*, 44(4), 565-570.
- Quintero, D.S. eta Romero, H.R. (2009). Efecto de una intervención educativa dirigida a cuidadores de niños menores de dos años sobre la prevención del síndrome del niño sacudido. *Investigación en Enfermería: Imagen y Desarrollo*, 12(1), 43-58.
- Samaha, D., Barnard, S., Valdez, A.M. (2015). Handle With Care: Preventing Abusive Head Trauma. *Journal of emergency nursing*, 41(4), 350-352.
- Scribano, P.V., Makoroff, K.L., Feldman, K.W., Berger, R.P. (2013). Association of perpetrator relationship to abusive head trauma clinical outcomes. *Child abuse & neglect*, 37(10), 771-777.
- Stewart, T.C., Polgar, D., Gilliland, J., Tanner, D.A., Girotti, M.J., Parry, N., Fraser, D.D. (2011). Shaken Baby Syndrome and a Triple-Dose Strategy for Its Prevention. *The journal of trauma*, 71(6), 1801-1807.
- Talvik, I., Metsvaht, T., Leito, K., Poder, H., Kool, P., Vali, M., Talvik, T. (2006). Inflicted traumatic brain injury (ITBI) or shaken baby syndrome (SBS) in Estonia. *Acta paediatrica*, 95(7), 799-804.
- The Crown Prosecution Service [webgunea]. (2011). [sarrera 2016ko urtarrilaren 25a]. Non Accidental Head Injury Cases (NAHI, formerly referred to as Shaken Baby Syndrome [SBS]). Eskuragarri: http://www.cps.gov.uk/legal/l_to_o/non_accidental_head_injury_cases/
- Walls, C. (2006). Shaken Baby Syndrome Education: A Role for Nurse Practitioners Working With Families of Small Children. *Journal of pediatric health care: official publication of National Association of Pediatric Nurse Associates & Practitioners*, 20(5), 304-310.

Euskal Herriko Unibertsitateko ikasleek dietan haragia eta honen eratorriak sartzeak dituen ondorioak berotegi gasen isurketan

Telleria-Aramburu Nerea¹; Bermúdez-Marín Nerea¹; Encinas Dolores²; Rocandio Ana María^{1,3}; Telletxea Saioa⁴; Basabe Nekane⁴; Rebato Esther⁵; Arroyo-Izaga Marta^{1,3}

¹Farmazia eta Elikagaien Zientziak Saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, ²Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren Ingeniaritza, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, ³BIOMICS Ikerketa Taldea, Lascaray Ikergunea, UPV/EHU, ⁴Gizarte Psikologia eta Portaeren Zientzien Metodologia, Farmazia Fakultatea, UPV/EHU, ⁵Gizarte Psikologia Ikerketa Taldea: Kultura, Kognizioa eta Emozioa, ⁵Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalia Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, UPV/EHU

Kontakturako e-posta: marta.arroyo@ehu.eus

Laburpena

Ikerketa honen helburu nagusia haragia eta honen eratorriekin erlazionatutako berotegi efektuko gasen isurtzea eta hauen kontsumoari lotutako faktoreak aztertzea da Euskal Herriko Unibertsitateko ikasleen dietan. Ikerketa hau 560 ikasleko lagin batean egin zen. Ingestio dietetikoa eta bere ingurumen-inpaktua, aldagai demografikoak eta sozioekonomikoak, bizimoduak, elikadurari lotutako jarrerak, sinesmenak eta jakintzak aztertu, eta antropometriako neurriak hartu ziren. Sexu diferentziak aipatutako hainbat aldagaian eta haragi kontsumoan aurkitu ziren. Gure emaitzek haragi kontsumoa eta haragiarekiko ditugun jarrerak eta gehiegizko gorputz gantza positiboki erlazionatuta daudela adierazten dute, eta gainera, kontsumo hau berotegi-efektuko gasen isurtzearekin lotuta dago.

Hitz gakoak: haragi kontsumoa, berotegi-efektuko gas isurtzea, unibertsitateko ikasleak, dieta jasangarria

Abstract

The objective of this study was to analyze the greenhouse gas emissions related to meat and derivatives and the factors associated to this intake, in students of the University of the Basque Country. We analyzed data from a random sample of 560 students. Dietary intake and its environmental impact, demographic and socioeconomic variables, lifestyles, attitudes, beliefs and knowledge on nutrition and anthropometric measurements were taken. Sex differences were found in most of these variables and in meat intake. Our results show a positive relationship between meat intake and attitudes on nutrition and body fat, and, moreover, meat intake is related to greenhouse gas emissions.

Keywords: meat intake, greenhouse gas emissions, university students, sustainable diet

1. Sarrera

Haragiak balio biologiko handiko proteinak, burdina, potasioa, fosforoa eta zink-a ditu (Dapcich et al., 2007). Baina gehiegizko kontsumoak gantz azido saturatuak, kolesterola, haragia prestatzerakoan sortzen diren sustantzia kartzinogenikoak (World Cancer Research Fund eta American Institute for Cancer Research, 2007) eta gehitutako sodioa eta nitrito asko hartzea ere suposatzen du. Horregatik, gehiegizko haragi kontsumoa gaitz kronikoekin erlazionatu da (Daniel et al., 2011), gaixotasun kardiobaskularrekin, diabetesarekin (Micha et al., 2010), koloneko minbiziarekin (World Cancer Research Fund eta American Institute for Cancer Research, 2007), gehiegizko pisuarekin eta buruko isuriarekin (Hodgson et al., 2007; Vergnaud et al., 2010), besteak beste. Gaur egun, minbizia prebenitzeko *World Cancer Research Fund*-ren gomendioa haragia eta horien eratorrientzako 500 g/astekoa da (World Cancer Research Fund eta American Institute for Cancer Research, 2007).

Honez gain, haragi gehiegi jateak berotegi-efektuko gas gehiago isurtzea suposatzen du (Steinfeld et al., 2006; Carlsson-Kanyama eta González, 2009) eta baita energia (Wallén et al., 2004) eta ur (Vanham eta Bidoglio, 2013) gehiago erabiltzea ere bere ekoizpenerako. Saxek egiaztatu zuen bezala dietako haragi kantitatea murrizteak ingurumenerako eta sozioekonomikoki onurak dakartza (Saxe, 2014).

2. Arloko egoera eta helburua

Azken urteetan, elikagai jasangarriak eskaintzen duten programak sustatu dituzten Unibertsitateak badira, bere komunitatearen osasuna eta ongizatea hobetzeko helburuarekin (Oxford Brookes University. 2013; Red Valenciana de Universidades Públicas Saludables. 2014). Baina kontuan hartu

behar da, hainbat faktore direla elikagaien aukeraketan eragina dutenak (biologikoak, ekonomikoak, fisikoak, sozialak eta determinatzaile psikologikoak eta nutrizioarekiko jarrerak, sinesmenak eta jakintzak, besteak beste) (Bellisle, 2005). Gainera, bizimoduek, ohitura dietetikoek, ariketa fisikoa (AF), alkohola, tabakoa eta beste batzuk, elkartzeko joera dute (Tobias et al., 2002; Moreno-Gómez et al., 2012). Faktore hauei buruzko ikerketak Unibertsitateko ikasleen populazioan eskasak dira (Moreno-Gómez et al., 2012) eta gure ezaguera arte dieta jasangarriarekin erlazioa duten faktoreen ikerketarik ez dago populazio honetan.

Ikerketa honen helburu nagusia haragia eta horien eratorriei erlazioatutako berotegi efektuko gasen isurtzea Euskal Herriko Unibertsitateko ikasleen dietan analizatzea da, eta baita elikagai kontsumo honi lotutako faktoreak aztertzea ere.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

3.1 Metodoa

Ikerketaren diseinua

Ikerketa hau, EHU12/24 behakuntza kohorte ikerkuntza bezala diseinatutako, eta obesitatea eta erlazioatutako morbiditateen etiologia ikertzen duen proiektuaren barne dago.

Lagina

EHU12/24 proiektuaren lagina 2013-2014ko kurtsoa UPV/EHUko matrikula zerrendatik atera zen (Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU, 2014). Gehiegizko pisua eta obesitatearen prebalentzia %20,6koa zela kontuan hartuta (Ruiz et al., 2013), lagina %3,5ko zehaztasunarekin eta %95ko konfidantzarekin 500koa izan behar zela estimatu zen EPIDAT programarekin (Programme for the epidemiologic analysis of tabulated data vs.3.1).

Aukeraketa zorizkoa eta laginketa polietapikoa egin zen, adina, sexua eta jakintza arloen arabera geruzatuta, Espainiako Hezkuntza, Kultura eta Kirol Ministerioak proposatutako irizpidean oinarrituta (Hezkuntza, Kultura eta Kirol Ministerioa, Espainiako Gobernua, 2012-2013). Aurrerago, jakintza arloa 2 kategoriatan banatu zen: osasun zientziak edo ez-osasun zientziak. Jarraitutako inklusio irizpideak hurrengoak izan ziren: 18 eta 32 urte bitartean edukitzea; metabolismoari, pisuari edo gorputz konposizioari eragina dion gaixotasun kronikorik ez jasatea edo egoera berezirik ez izatea (atleta izatea); familia harremanik ez izatea partaideen artean eta azkenik, emakumeen kasuan, haurdun edo edoskitzaroan ez egotea.

Datu guzti hauek ikasleen azterketa denboraldiaz kanpo jaso ziren, 2014-15, 2015-16 eta 2016-17 ikasturteetan, ohiko bizimoduetak aldaketak saihesteko. Ikerketa hau 560ko ikasleko lagin batean egin zen (%65 emakumeak ziren). Aldagai garrantzitsuetan datuak ez zuten ikasleak analisi estatistikoetatik kanpo utzi ziren. EHU-ko Gizakiekin lotutako Ikerketarako Etika Batzordearen irizpena aldekoa zuen ikerketak eta parte-hartzaile guztiek idatzizko onespren informatua sinatu zuten.

Ingestio dietetikoa

Ingestio dietetikoa baloratzeko balioztatutako elikagaien maiztasun galdetegi egokitua erabili zen (Rodríguez et al., 2008). Galdetegia populazio honetara egokitzeko, 24 orduko oroipeneko galdetegiarekin balioztatu zen lagin txiki batean. Elikagaien maiztasun galdetegiak 70 item ditu eta parte-hartzaileak elikagai bakoitza zenbat aldiz egunean, astean edo hilean jaten zuen erantzun behar zuen. Datu guzti hauek aurrez aurreko elkarriketa bidez erregistratu ziren eta ikasleek galdetegian ez zeuden elikagaiak aipatzeko aukera zuten.

Elikagaien maiztasun galdetegiko erantzunak prozesatzeko anoak erabili ziren (Carbajal eta Sánchez-Muniz, 2003). Elikagai bat baino gehiago zeuden item-etan, elikagai bakoitzaren ekarpena, ohiko ingesta datuetatik ateratako pisu koefizienteekin estimatu zen (Elika, 2008). Ingesta dietetikoaren datuekin haragi txuria, haragi gorria eta horien eratorrien gramoak kalkulatu ziren eta dentsitate kaloriko bezala adierazi zen (haragi kontsumoa/1000 kcal/egun). Aldagai hau 2 kategoriatan sailkatu zen mediana ebaki puntu bezala erabiliz: maila baxua edo moderatua (<58,2 g/1000kcal/egun, n=280), eta maila altua (≥58,2 g/1000kcal/egun, n=280). Elikagai item guztiak DIAL 2.12 (2011 ALCE INGENIERA) nutrizio softwarean prozesatu ziren. Energia eta nutrienteen batezbestekoa eta desbideratze tipikoa (DT) kalkulatu ziren. Makronutrienteak energia guztiarekiko portzentaje bezala adierazi ziren.

Honez gain, bizilekuaren informazioa ere bildu zen (erantzunak: gurasoeekin, bikotearekin, beste senideekin, lagun edo pisukideekin, ikasle-egoitza, bakarrik edo besterik), Benassar Veny-k garatutako galdetegiaren bitartez (Bennassar Veny, 2012). Informazioa errazteko eta deskribatzeko helburuarekin, aldagai hau berriz elkartu zen: gurasoak edo besterik.

Ohitura dietetikoaren ebaluaketa ingurugiro iraunkortasunaren ikuspuntutik

Artikulu honetan, ingurumenarekiko dieta jasangarriak ingurugiroan duen inpaktua adierazten du, hau da, elikadurari lotutako berotegi-efektuko gasek duten efektua klima aldaketan. Pubmed-en 2000. urtetik gaur arte publikatutako artikuluen azterketa egin zen, ohitura dietetikoekin erlazionatutako berotegi-efektuko gasen isurtzea ebaluatzeko erabili zitekeen metodologia aukeratzeko. Erabilitako hitz gakoak hurrengoak izan ziren “greenhouse gas emissions”, “food consumption”, “sustainable diet”, “lifecycle”, “carbon footprint”, “cultivated planet” eta “environmental impact”. Oinarritzko operadoreak, “eta” eta “edo”, erabili ziren hitz gako horiekin. Berotegi-efektuko gasak eCO_2kg /elikagai kg bezala zuten artikulua bakarrik aztertu ziren. Datuak aukeratzeko orduan hurbiltasun geografikoa kontuan hartu zen eta posible izanez gero iturri desberdinetako informazioa erkatu zen. Guztira, 100 artikulua eskuratu ziren, eta behin irakurrita eta aukeraketa irizpidea ezarrita, 30 artikulua erabili ziren.

Produktu guztien bizi-zikloaren azterketa datuak bateratzeko helburuarekin, etxerako garraio edo sastarren datuak falta zuten elikagaietan zuzenketa faktoreak ezarri ziren. Etxerako garraioaren data Nilsson eta Lindberg (Nilsson eta Lindberg, 2011) eta Sonesson *et al*-enak erabili ziren (Sonesson *et al.*, 2005). Bestalde, sastarrak kontuan hartzeko Nazio Batuen Elikadura eta Nekazaritza Erakundearen datuak erabili ziren (Gustavsson *et al.*, 2011).

Koaldagaiak

Aldagai demografikoak (adin dezimala -ebaluaketa dataren eta jaiotze dataren arteko diferentzia dezimalean- eta sexua, barne), maila sozioekonomikoa (gurasoen hezkuntza maila) eta tabako eta alkohol kontsumoa Espainiako Osasun Inkesta erabilita lortu ziren aurrez aurreko elkarrikitak bitartez (Instituto Nacional de Estadística, 2006). Alkohol kontsumoa kalkulatzeko Edari Unitate Estandarraren (EUE) kontzeptua erabili zen, non edari unitate bat 10 gramo etanol puru da.

Jarduera fisikoaren datuak neurtzeko, IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) galdeketa nazionala (bertsio motza) erabili zen (International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), 2000). Gidetak irizpideak jarraituz, IPAQ-eko datuak 3 mailetan banatu ziren: jarduera fisiko baxua, moderatua eta altua (International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), 2000).

Deskribatzeko helburuarekin eta erraztearren, aldagai sozioekonomikoa hurrengo eran sailkatu zen berriz: gurasoen ikasketak maila (batek behintzat Unibertsitate ikasketak edukiitzea edo bietako inork ez edukiitzea). Bizimoduak dagokienez, datuak horrela sailkatu ziren: jarduera fisiko (baxua edo moderatua; altua), tabakoa (erretzaileak; ez-erretzaileak edo erretzaile-ohiak) eta alkohola (kontsumo baxua edo moderatua, gizonetan 2 EUE/egunean baino gutxiago eta emakumeen kasuan 1 baino gutxiago/egunean; kontsumo altua, gizonetan 2 EUE baino gehiago/egunean eta emakumetan 1 baino gehiago/egunean). Elikadurarekin lotutako jarrerak eta sinesmenak ere aztertu ziren ikerketa honetan Hollis *et al*-ek garatutako eta egokitutako galdetegiaren bidez (Hollis *et al.*, 1986). Artikulu honek haragia gogokoa izatearen faktorea bakarrik hartu zuen kontuan; faktore honek 4 item zituen (puntuazio tarteak 0 eta 16 bitartekoa) eta haragiak otordu gehienetako plater garrantzitsuenak izan behar zela adierazten zuen.

Nutrizioari buruzko jakintzak *The Consumer Nutrition Knowledge Scale* (CoNKS) galdetegiarekin aztertu ziren. Galdetegi honek, galdetzerako orduan kontsumitzaileen hizkuntza erabiltzen zuen eta 20 item zituen hurrengo arlotan banatuta: kaloria eta nutrienteak, elikagaien arteko konparaketak, elikagai taldeek dieta osasuntsu batean duten garrantzia, gantzen garrantzia eta fruta eta barazkien onurak (Dickson-Spillman *et al.*, 2011). Horrez gain, ondo entrenatutako antropometrista batek parte-hartzaileen neurriak hartu zituen: pisua, altuera eta larruazalpeko izurrak *International Society for the Advancement of Kinanthropometry* (ISAK) protokoloa jarraituz (Marfell-Jones *et al.*, 2006). Pisua 0,1kg-ko zehaztasuna zuen balantzarekin neurtu zen (Añó-Sayol; Atlántida, Barcelona, Spain). Altuera mm 1eko zehaztasuna zuen tallimetroarekin neurtu zen (Holtain Ltd, Crymych, Wales, UK). Datu hauekin eta pisua (kg) / altuera² formularekin Gorputz Masaren Indizea (GMI) kalkulatu zen.

Larruazalpeko izurrak (bizipitala, trizipitala, subeskapularra eta suprailakoa) mm 1eko zehaztasuna zuen Holtain kaliperrarekin neurtu ziren (Holtain Ltd, Crymych, Wales, UK). Gorputzeko gantz masaren portzentaia (GG%) larruazalpeko izurren datuekin eta Durninek eta Womerslevek (Durnin eta

Womersley, 1974) eta Sirik (Siri, 1961) proposatutako adin eta sexu berariazko ekuazioarekin kalkulatu zen. Obesitatea sailkatzeko Bray *et al*-ek erabilitako irizpidea jarraituz parte-hartzaileen GG% sailkatu zen (Bray et al., 1998). GMI sailkatzeko Munduko Osasun Erakundeak obesitate eta gehiegizko pisua sailkatzeko erabiltzen dituen kategoriak ezarri ziren (World Heart Organization, 2000).

Analisi estatistikoa

Datuen analisi estatistikoa SPSS 22.0 bertsioarekin egin zen (SPSS Inc., Chicago, IL) eta emaitzak batezbestekoa, desbideratze tipikoa eta maiztasun moduan aurkeztu ziren. Datu kuantitatiboan normaltasun analisia Kolmogorov–Smirnov–Lilliefors probarekin aztertu zen. Aldagaien sexu desberdintasunak Student-en *t* probarekin kalkulatu ziren (bi banaketak normalki banatzen zirenean) edo Mann-Whitney U probarekin (bi banaketak normalki banatzen ez zirenean). Aldagai kualitatiboak Chi karratu probarekin aztertu ziren. Haragi kontsumoari lotutako faktoreen analisia sexuari doitutako erregresio logistiko ordinalen ereduarekin egin ziren. Eredu hauetan, hurrengo aldagaiak kontuan hartu ziren haragi kontsumoari lotutako faktore bezala: sexua, GMI, GG eta nutrizioarekiko jarrerak. Azkenengo ereduari haragi kontsumoari lotutako faktore guztiak barne zeuden eta emaitzak odd ratio-ak (OR) eta %95 konfiantza bitarteko (KB) moduan aurkeztu ziren. Esangura maila proba guztietan $P < 0,05$ izan zen (proba bilateralak).

4. Emaitzak eta eztabaida

Ikertutako laginaren ezaugarri orokorren arabera, batezbesteko adina 20,8(2,4) urtekoa izan zen. Sexuaren arabera diferentziak aurkitu ziren hurrengo aldagaietan: ezagutza arloa, gurasoen ikasketa maila, GMI sailkapena, AF, tabako eta alkohol kontsumoa eta bizilekua ($P < 0,05$). Gure laginan, emakume gehiagok ikasten zuen osasun zientzietako graduak (emakumeak, %25,5; gizonak, %13,3; $P = 0,011$), eta emakumeen portzentaje, zeinen gurasoetako inork ez zuen Unibertsitateko ikasketak, gizonena baino altuagoa izan zen (emakumeak, %60,7; gizonak, %49,5; $P = 0,011$). GMI-ren sailkapenari dagokionez, neurrizko pisuan emakumeen portzentaje gizonena baino altuagoa izan zen (emakumeak, %89,8; gizonak, %78,6; $P < 0,001$). AF baxua/moderatu egiten zuen emakumeen portzentaje gizonena baino altuagoa izan zen (emakumeak, %87,6; gizonak, %61,7; $P < 0,001$); emakumeek gizonak baino gehiago erretzen zuten (emakumeak, %22,3; gizonak, %14,8; $P = 0,034$) eta emakume gehiago aurkitzen ziren alkohol kontsumo altuan gizonak baino (emakumeak, %33,8; gizonak, %13,8; $P < 0,001$). Horrez gain, etxetik kanpo bizi ziren emakumeen portzentaje gizonena baino altuagoa izan zen (emakumeak, %55,5; gizonak, %43,4; $P = 0,006$). Ezagutza arloari, GMI-ren sailkapenari, AF-ari eta tabako kontsumoari buruzko emaitza hauek Espainiako eta Europako beste Unibertsitateetako datuekin bat datoz (Wanden-Berghe et al., 2015; García-Meseguer et al., 2014; Moreno-Gomez et al., 2012). Hala ere, alkohol kontsumoaren emaitza Europan egindako beste ikerketa batzuen kontrako da (El Ansari, W et al., 2013; Wicki et al., 2010; Stock et al., 2009), eta baliteke desberdintasun hau guk erabilitako sailkapenarengatik izatea, emakumeen kasuan, arriskuko kontsumoa EUE 1/egun jartzen zuelako ebaki puntu bezala (Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC), 2011).

Lehenengo taulan, haragi kontsumoaren datuak (haragi txuriak, gorriak eta horien eratorriak), elikagai ingesta orokorraren eta haragien berariazko berotegi-efektuko gasen isurtzearen emaitzak eta baita nutrizioarekiko jarreraren (haragia gogokoa izatea) eta jakintzen emaitzak aurkezten dira. Aipatzekoa da aldagai guztietan sexuen arteko diferentziak aurkitu zirela. Gizonak emakumeek baino haragi kontsumo altuagoa zuten hainbat ikerketetan bezala (Maguire eta Monsivais, 2015; Meier eta Christen, 2012; Wang et al., 2010). Sexu desberdintasun hau azaltzen saiatzen diren bi teoria ditugu; alde batetik, emakumeak osasuna eta animalien ongizateaz gehiago arduratzen direla (Clonan et al., 2015) eta bestetik, gizonen haragi kontsumoa eta maskulinitasunaren arteko erlazioa dugu (Wang et al., 2010). Dietaren eta haragiaren berotegi-efektuko gasen isurtzean aurkitu ziren sexu desberdintasunak haragi kontsumoarekin lotuta daude, haragia elikagai taldeetatik gehien isurtzen duen elikagaia delako (gure laginan totalaren %33,1), gai honi buruz egindako hainbat ikerketetan egiaztatuta gelditu den bezala (Temme et al., 2014; Werner et al., 2014). Horregatik, gizonen berotegi-efektuko gasen isurtzea bai dieta orokorrean bai haragia berariazko aztertu zenean altuagoa izan zen, Frantzia egin zuten beste ikerketa batean bezala (Vieux et al., 2012).

Nutrizioarekiko jarreran, haragia gogokoa izatearen atalean gizonen emaitzak emakumeenak baino altuagoak izan ziren, aurretik azaldu den bezala, emaitza hau gizonak haragia balore maskulino bezala nabarmentzearen ondorio izan daitekeelako (Ruby eta Heine, 2011). Nutrizioarekiko jakintzei dagokionez, gizonen puntuazioak (12,9(2,7)) emakumeenak baino altuagoak izan ziren (12,1(3,1))

($P=0,007$), espero zenaren kontrako emaitza, beste ikasle taldeetan emakumeek gizonek baino emaitza altuagoak lortu zituztelako (Yahia et al., 2016). Dena dela, ez zen galdetegi berdina erabili, hori dela eta, emaitzak desberdinak izan daitezke.

1. taula. Haragi kontsumoa, gogokoa eta sortutako berotegi-efektuko gasen isurpenak Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) ikasleen artean, sexuaren arabera

Aldagaiak, batezbestekoa DT	Lagin osoa (n=560)		Gizonak (n=196)		Emakumeak (n=364)		P*
Haragi kontsumoa [†] /egun, g	131,1	77,6	157,7	92,4	116,8	64,1	<0,001
Haragi kontsumoa/egun, g/1000 kcal	61,1	31,6	68,0	34,9	59,0	29,2	0,014
Nutrizioarekiko jarrerak							
Haragia gogokoa izan (0-16)	6,6	2,5	7,4	2,6	6,1	2,3	<0,001
Nutrizioarekiko jakintzak (0-20)	12,4	3,0	12,9	2,7	12,1	3,1	0,007
Haragi kontsumoaren berotegi-efektuko gasen isurtzea, eCO ₂ kg/pertsona/egun	1,7	1,1	2,2	1,2	1,5	0,9	<0,001
Haragi kontsumoaren berotegi-efektuko gasen isurtzea, eCO ₂ kg/1000 kcal/egun	0,8	0,5	0,9	0,5	0,8	0,4	<0,001
Haragi kontsumoaren berotegi-efektuko gasen isurtzea, isurpen totalaren %	33,1	12,9	37,2	12,0	30,8	12,8	<0,001
Dietaren berotegi-efektuko gasen isurtzea, eCO ₂ kg/1000 kcal	2,4	0,6	2,5	0,7	2,4	0,6	<0,001

DT, desbideratze tipikoa; *Sexu desberdintasunak; [†]Haragi kontsumoa, haragi gorria eta zuria, eta horien eratorriak

Bigarren taulan, energia eta nutrienten datu deskriptiboak haragi kontsumoaren arabera aurkezten dira. Gantz azido saturatuak aldagaian izan ezik, beste guztietan diferentziak aurkitu ziren haragi kontsumoaren arabera ($P<0,01$). Haragi kontsumo altuko taldeak gantz eta proteina portzentaje altuagoa zuen, eta karbohidrato eta azukre portzentaje, zuntza, fruta eta barazki kontsumo baxuagoa. Emaitza hauek zentzuzkoak dira eta beste ikerketa batzuekin bat datoz (Scarborough et al., 2014; Martins de Carvalho et al., 2012).

Haragi kontsumoaren sailkapenaren arabera, haragi kantitate gehiago jaten zutenek GMI altuagoa zuten (haragi kontsumoaren maila altua, 22,5(3,0) kg/m²; maila baxua edo moderatua, 21,9(2,5) kg/m²; $P=0,027$), eta gorputzeko gantz kantitate gehiegizkoaren portzentaje altuagoa zen talde honetan (maila altua, %17,5; maila baxua edo moderatua, %10,7; $P=0,021$). Emaitza hauek Ipar Ameriketako NHANES ikerketarekin bat datoz, ikerlan honetan haragia eta obesitatearen arteko asoziazio positiboa egiaztatu zutelako (Wang eta Beydoun, 2009) eta baita EPIC ikerketan ere (Vergnaud et al., 2010). Nutrizioarekiko jarreraren emaitzak altuagoak izan ziren talde honetan ere (maila altua, 6,2(2,4); maila baxua edo moderatua, 6,9(2,6); $P=0,003$), eta posible izan daiteke emaitza hau haragi kontsumo altuko taldean gizonezko gehiago egotearen ondorio izatea eta lehen aipatutako haragia eta maskulinitasunaren arteko erlazioaren ondorio. Erregresio analisisien eredu sinplearen emaitzek GMI-aren, gorputz gantzaren eta nutrizioarekiko jarreraren asoziazioa haragi kontsumo altuarekin egiaztatu zuten ($P<0,05$). Eta azkeneko erudian, haragi gogokoa izatea atalean puntuazio altuak eta gehiegizko gorputz gantz edukitzea haragi kontsumoarekin lotu zuten (gehiagizko gorputz gantza OR ajustatuak=1,77; %95 KB, 1,05-3,01; $P=0,034$; nutrizioarekiko jarrerak OR ajustatuak=1,13; %95 KB, 1,05-1,21; $P=0,001$).

2. taula. Energia eta nutrienten datu deskriptiboak haragi kontsumoaren arabera

Aldagaiak, batez bestekoa DT	Haragi kontsumoa [†]				P [*]
	Maila baxua edo moderatua (n=280)		Maila altua (n=280)		
Gantzak, energiaren %	37,8	6,1	39,7	6,5	<0,001
Gantz azido saturatuak, energiaren %	12,9	3,2	13,2	3,0	0,146
Proteinak, energiaren %	14,0	2,1	16,3	2,7	<0,001
Karbohidratoak, energiaren %	43,4	5,7	39,7	5,7	<0,001
Azukreak, energiaren %	11,1	5,2	9,1	4,0	<0,001
Zuntza, g/egun	24,4	9,3	22,0	8,8	0,001
Frutak eta barazkiak, ano/egun [‡]	3,4	1,9	3,1	1,9	0,007

DT, desbideratze tipikoa; [†]Haragi kontsumoa, haragi gorria eta txuria, eta horien eratorriak; Maila baxua edo moderatua (<58,2 g/1000 kcal/egun), maila altua (≥58,2 g/1000 kcal/egun); [‡]Anoa: frutak, zitrikoak (laranja, mandarinak...) 225 gramo; beste frutak (udarea, sagarra, platanoa, melokotoia...) 200 gramo; fruta-kontserbak (marmelada, fruta almibarretan...) 15 gramo; mahaspasa, aranpasa, pikupasa, datilak 40 gramo eta fruta zuku naturalak 200 gramo. Barazkiak, entsalada (letxuga, tomatea, eskarola...) 100 gramo; lekak, zerbak, espinakak 200 gramo; guarnizio barazkiak (berenjena, txanpiñoak, piperrak...) 50 gramo; tipula 50 gramo; ^{*}Haragi kontsumoan desberdintasunak

5. Ondorioak

Ondorio gisa esan daiteke, gure emaitzek haragi kontsumoa eta haragiarekiko ditugun jarrerak eta gehiegizko gorputz gantza positiboki erlazionatuta daudela adierazten dute. Datu hauek bat datoz haragia gutxitzeko gomendioekin biztanleriaren osasuna hobetzeko alde batez, eta bestetik, berotegi-efektuko gasen isurtzea murrizteko.

6. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Faktore hauek kontuan hartu beharko lirateke Unibertsitate ikasleentzako osasuna eta dieta jasangarriak sustatzeko estrategiak diseinatzerako orduan.

7. Erreferentziak

- Bellisle, F. (2005): “*The Determinants of Food Choice*”. EUFIC Review 04/2005. [<http://www.eufic.org/article/en/expid/review-food-choice>]
- Bennassar Veny, M. (2012): “*Estilos de vida y salud en estudiantes universitarios: la universidad como entorno promotor de la salud*”. PhD Thesis, University of the Balearic Islands.
- Bray, G.; Boucard, C.; James W.P.T. (1998): *Handbook of obesity*, Marcel Dekker, New York.
- Carbajal, A. eta Sánchez-Muniz, F.J. (2003): *Nutrición y dietética*, Secretariado de Publicaciones y Medios Audiovisuales, Leon.
- Carlsson-Kanyama, A. eta González, A.D. (2009): “Potential contributions of food consumption patterns to climate change”. *Am J Clin Nutr* 89, 1704S–1709S.
- Clonan, A.; Wilson, P.; Swift, J.A.; Leibovici, D.G.; Holdsworth, M. (2015): “Red and processed meat consumption and purchasing behaviours and attitudes: impacts for human health, animal welfare and environmental sustainability”. *Publ Health Nutr* 18, 2446–2456.
- Daniel, C.R.; Cross, A.J.; Koebnick, C.; Sinha, R. (2011): “Trends in meat consumption in the USA”. *Public Health Nutr* 14, 575–583.
- Dapeich, V.; Salvador, G.; Ribas, L.; Pérez, C.; Aranceta, J.; Serra, L. (2007): “*Consejos para una Alimentación Saludable*”. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) eta Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria, Madrid.
- Dickson-Spillman, M.; Siegrist, M.; Keller, C. (2011): “Development and validation of a short, consumer-oriented nutrition knowledge questionnaire”. *Appetite* 56, 617–620.
- Durnin, J.V.G.A. eta Womersley, J. (1974): “Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years”. *Br J Nutr* 32, 77–79.
- El-Ansari, W.; Sebens, R.; Stock, C. (2013): “Socio-demographic correlates of six indicators of alcohol consumption: survey findings of students across seven universities in England, Wales and Northern Ireland”. *Arch Public Health* 71, 29–42.
- Elika (2008) *Estudio cuantitativo del consumo de alimentos en la CAPV*. Nekazaritza, Arrantza eta Elikagaien Politika Saila, Eusko Jaurlaritza, Vitoria-Gasteiz.
- Estatistikako Institutu Nazionala (2006): “*Encuesta Nacional de Salud*”. Statistikako Institutu Nazionala [<http://www.ine.es/metodologia/t15/t1530419cues06.htm>] [<http://www.ine.es/metodologia/t15/t1530419cues06.htm>]
- García-Meseguer, M.J.; Burriel, F.C.; García, C.V.; Serrano-Urrea, R. (2014): “Adherence to Mediterranean diet in a Spanish university population”. *Appetite* 78, 156–164.
- Gustavsson, J.; Cederberg, C.; Sonesson, U. (2011): “*Global food losses and food waste*”. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma.
- Hezkuntza, Kultura eta Kirol Ministerioa (2012-2013): “*Estadísticas de Universidades, Centros y Titulaciones*”. Espainiako Gobernua, Madril. [<http://www.mecd.gob.es/educacion-mecd/areas-educacion/universidades/estadisticas-informes/estadisticas/universidades-centros-titulaciones.html>]
- Hodgson, J.M.; Ward, N.C.; Burke, V.; Beilin, L.J.; Puddey, I.B. (2007): “Increased lean red meat intake does not elevate markers of oxidative stress and inflammation in humans”. *J Nutr* 137, 294–303.
- Hollis, J.F.; Carmody, T.P.; Connor, S.L.; Fey, S.G.; Matarazzo, J.D. (1986). The Nutrition Attitude Survey: Associations with dietary habits, psychological and physical well-being, and coronary risk factors. *Health Psychol* 5, 359–374.

- International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) (2000): “*Guidelines for Data Processing and Analysis of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)*”. [http://www.institutferran.org/documentos/Scoring_short_ipaq_april04.pdf]
- Maguire, E.R. eta Monsivais, P. (2015): “Socio-economic dietary inequalities in UK adults: an updated picture of key food groups and nutrients from national surveillance data”. *Br J Nutr* 113, 181–189.
- Marfell-Jones, M.J.; Olds, T.; Stewart, A.; Carter, L. (2006) *International Standards for Anthropometric Assessment*. International Society for the Advancement of Kinanthropometry (ISAK), Potchefstroom (Hego Afrika).
- Martins de Carvalho, A.; César, C.L.; Fisberg, R.M.; Marchioni, D.M. (2012): “Excessive meat consumption in Brazil: diet quality and environmental impacts”. *Public Health Nutr* 16 (10), 1893–1899.
- Meier, T. eta Christen, O. (2012): “Gender as a factor in an environmental assessment of the consumption of animal and plant-based foods in Germany”. *Int J Life Cycle Assess* 17, 550–564.
- Micha, R.; Wallace, S.K.; Mozafarian, D. (2010): “Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis”. *Circulation* 121, 2271–2283.
- Moreno-Gómez, C.; Romaguera-Bosch, D.; Tauler-Riera, P.; Bennasar-Veny, M.; Pericas-Beltrán, J.; Martínez-Andreu, S. et al. (2012): “Clustering of lifestyle factors in Spanish university students: the relationship between smoking, alcohol consumption, physical activity and diet quality”. *Public Health Nutr* 15 (11), 2131–2139.
- Nilsson, K. eta Lindberg, U. (2011) “Klimatpaverkanikylkedjan - franlivsmedelsindustri till konsument”. National Food Agency. Sweden: Livsmedelsverket.
- Oxford Brookes University (2013): “*Sustainable food and fair trade policy 2013*”. Oxford Brookes University, Oxford (Britainia Handia) [<https://www.brookes.ac.uk/about-brookes/sustainability/get-involved/purchasing-and-fairtrade/>]
- Red Valenciana de Universidades Públicas Saludables (2014): “*Guía de alimentación saludable y sostenible*”. Red Valenciana de Universidades Públicas Saludables, Espainia. [http://www.uv.es/cdciencia/Dia_Saludable/Guia_Alimentacio_Saludable_Sostenible_sp.pdf]
- Ruby, M. eta Heine, S.J. (2011): “Meat, morals, and masculinity”. *Appetite*. 56, 447–450.
- Ruiz, E.; Del Pozo, S.; Valero, T.; Ávila, J.M.; Varela-Moreiras, G. (2013): “*Estudio de hábitos alimentarios y estilos de vida de los universitarios españoles*”. Fundación Española de la Nutrición. Espainia. [<http://www.munideporte.com/imagenes/documentacion/ficheros/00DA422F.pdf>]
- Saxe, H. (2014): “The New Nordic Diet is an effective tool in environmental protection: it reduces the associated socioeconomic cost of diets”. *Am J Clin Nutr* 99 (5), 1117–1125.
- Siri, W.E. (1961): *Techniques for Measuring Body Composition*, National Academy of Sciences, Washington, DC.
- Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) (2011): “Objetivos nutricionales para la población española”. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 17, 178–199.
- Scarborough, P.; Appleby, P.N.; Mizdrak, A.; Briggs, A.; Travis, R.C.; Bradbury, K.E. et al. (2014): “Dietary greenhouse gas emissions of meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans in the UK”. *Climatic Change* 125, 179–192.
- Sonesson, U.; Antesson, F.; Davis, J.; Sjöden, P.O. (2005): “Home transport and wastage: environmentally relevant household activities in the life cycle of food”. *Ambio* 34, 371–375.
- Steinfeld, H.; Gerber, P.; Wassenaar, T.; Castel, V.; Rosales, M.; Haan, C. (2006): “Livestock’s long shadow—environmental issues and options”. Food and Agriculture Organization (FAO), Erroma.
- Stock, C.; Mikolajczyk, R.; Bloomfield, K.; Maxwell, A.E.; Ozcebe, H.; Petkeviciene, J. et al. (2009): “Alcohol consumption and attitudes towards banning alcohol sales on campus among European university students”. *Public Health* 123, 122–129.
- Temme, E.; Toxopeus, I.B.; Kramer, G.F.; Brosens, M.C.; Drijvers, J.M.; Tyszler, M. et al. (2014): “Greenhouse gas emission of diets in the Netherlands and associations with food, energy and macronutrient intakes”. *Public Health Nutr* 18 (13), 2433–2445.
- Tobias, M.; Jackson, G.; Yeh, L.C.; Huang, K. (2002): “Do healthy and unhealthy behaviours cluster in New Zealand?” *Aust N Z J Public Health* 31, 155–163.
- Trinidad Rodríguez, I.; Fernández, J.; Cucó, G.; Biarnés, E.; Arija, V. (2008): “Validación de un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario corto: reproducibilidad y validez”. *Nutr Hosp* 23 (3), 242–252.
- Universidad del País Vasco, UPV/EHU (2014): “Evolución del alumnado matriculado”. Euskal Herriko Unibertsitatea, Euskadi. [<http://www.ehu.eus/zenbakitan/es/node/34.html>]
- Vanham, D. eta Bidoglio, G. (2013): “A review on the indicator water footprint for the EU28”. *Ecol Indic* 26, 61–75.
- Vergnaud, A.C.; Norat, T.; Romaguera, D.; Mouw, T.; May, A.M.; Travier, N. et al. (2010): “Meat consumption and prospective weight change in participants of the EPIC-PANACEA study”. *Am J Clin Nutr* 92, 398–407.
- Vieux, F.; Darmon, N.; Touazi, D.; Soler, L.G. (2012): “Greenhouse gas emissions of self-selected individual diets in France: changing the diet structure or consuming less?” *Ecol Econ* 75, 91–101.

- Wallén, A.; Brandt, N.; Wennersten, R. (2004): “Does the Swedish consumer’s choice of food influence greenhouse gas emissions?” *Environ Sci Policy* 7, 525–535.
- Wang, Y. eta Beydoun, M.A. (2009): “Meat consumption is associated with obesity and central obesity among US adults”. *Int J Obes* 33 (6), 621–628.
- , (2010): “Trends and correlates in meat consumption patterns in the US adult population”. *Publ Health Nutr* 13, 1333–1345.
- Werner, L.B.; Flysjö, A.; Tholstrup, T. (2014): “Greenhouse gas emissions of realistic dietary choices in Denmark: the carbon footprint and nutritional value of dairy products”. *Food Nutr Res* 58, 20687. doi: 10.3402/fnr.v58.20687
- Wicki, M.; Kunstche, E.; Gmel, G. (2010): “Drinking at European universities? A review of students' alcohol use”. *Addict Behav* 35, 913–924.
- World Cancer Research Fund eta American Institute for Cancer Research (2007): “*Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*”. Washington, DC.
- World Heart Organization (2000): “*Obesity: preventing and managing the global epidemic*”. WHO Technical Report Series no. 894. Genova.
- Wanden-Berghe, C.; Martín-Rodero, H.; Rodríguez-Martín, A.; Novalbos-Ruiz, J.P.; Martínez de Victoria, E.; García-González, A. et al. (2015): “Calidad de vida y sus factores determinantes en universitarios españoles de Ciencias de la Salud”. *Nutr Hosp* 31 (2), 952-958.
- Yahia, N.; Brown, C.A.; Rappley, M.; Chung, M. (2016): “Level of nutrition knowledge and its association with fat consumption among college students”. *BMC Public Health* 16, 1047.

8. Eskerrak

Ikerketa hau UPV/EHU-ko Ikasleen, Enpleguaren eta Gizarte Erantzukizunaren arloko Errektoreordetzaren eta Eusko Jaurlaritzaren Iraunkortasunaren arloko Berrikuntzarako laguntzari (2016ko deialdia) eta Euskara eta Eleaniztasun Errektoreordetzaren Tesiak Euskaraz egiteko doktorego aurreko ikertzaileak prestatzeko kontratazioari (2015. urteko deialdia) esker egin da, eta Euskal Herriko Unibertsitateak finantzatu du (EHU12/24).

Edizio genikoan oinarritutako garapena intzidentzia txikiko gibleko gaixotasunen tratamendurako: I. motako hiperoxaluria primarioa

Barberia Urteaga M.¹; Zabaleta Lasarte N.¹; Prosper Cardoso F.²; González-Asegunolaza G.¹ eta Rodríguez-Madoz JR.²

¹*Terapia genikoa eta geneen espresioaren erregulazioa, CIMA (Centro de Investigación Médica Aplicada), Nafarroako Unibertsitatea, Nafarroa*

²*Terapia zelularra programa, CIMA (Centro de Investigación Médica Aplicada), Nafarroako Unibertsitatea, Nafarroa
mbarberiau@unav.es*

Laburpena

I. motako Hiperoksaluria primarioa (PH1), gaixotasun metaboliko autosomiko errezesiboa da, gibleko alanina-glioxilato aminotransferasa (AGT) entziman sortutako mutazioen ondorioz sortzen dena. Mutazioaren ondorioz, oxalatoaren gehiegizko produkzioa ematen da, kaltzioarekin batzen dena eta kaltzio oxalatoa (CaOx) ematen duena, giltzurrunetan pilatuz eta giltzurrun kalteak eraginez. Tratamendu sendagarri bakarra giltzurrun/gibel transplante konbinatua da. Ikerketa honetan tratamendu alternatibo bat ikertu da, CRISPR-Cas9 sistema erabiliz. Hidroxiazido oxidasa 1 (*Hao1*) genearen espresioa murriztea izan da helburu nagusia, oxalatoaren produkzioa murrizteko. Ikerketa honek *Hao1* genearen espresioa efikazia handiaz murriztea lortu du, gaixotasunaren adierazpen fenotipikoa zuzendua izan delarik.

Hitz gakoak: I. motako hiperoxaluria primarioa, edizio genikoa, CRISPR-Cas9, gibleko gaixotasuna, birus adenoasoziatuak.

Abstract

Primary hyperoxaluria type 1 (PH1) is an autosomal recessive, metabolic disorder caused by mutations in alanine-glyoxylate aminotransferase (AGT) coding gene, an hepatic enzyme involved in the detoxification of glyoxylate. Because of the mutations, the oxalate is overproduced and Calcium Oxalate (CaOx) is synthesized which accumulates in kidneys, leading to kidney damage. The unique curative treatment is the double liver/kidney transplant. In this research, we have analyzed an alternative treatment based on CRISPR-Cas9. The main objective has been to reduce the expression of Hydroxy acid oxidase 1 (Hao1) to reduce the production of oxalate. This investigation has achieved an effective reduction of Hao1 gene expression which corrects the phenotypic expression of the disease.

Keywords: Primary Hyperoxaluria type I, gene editing, CRISPR-Cas9, liver diseases, adeno-associated virus.

1. Sarrera eta motibazioa

I. motako hiperoxaluria primarioa (*ingelesez Primary hyperoxaluria type I, PH1*) gaixotasun arraro bat da, herentzia autosomiko errezesiboa duena eta giblean oxalatoaren gehiegizko produkzioa eragiten duena. PH1, alanina/glioxilato aminotransferasa (AGT) entzimaren ausentziak, urritasunez edo lokalizazio ezegokiaz sortzen da. Entzima hori peroxisoman aurkitzen da, eta *AGXT* geneak kodifikatzen du (Dutta C, 2016).

Urritasun guzti hauek, oxalatoaren gehiegizko produkzioa eragiten dute. Oxalatoa konposatu oso disolbagaitza da (Cochat P, 2016), organismoak detoxifikatu ezin duena. Hori dela eta,

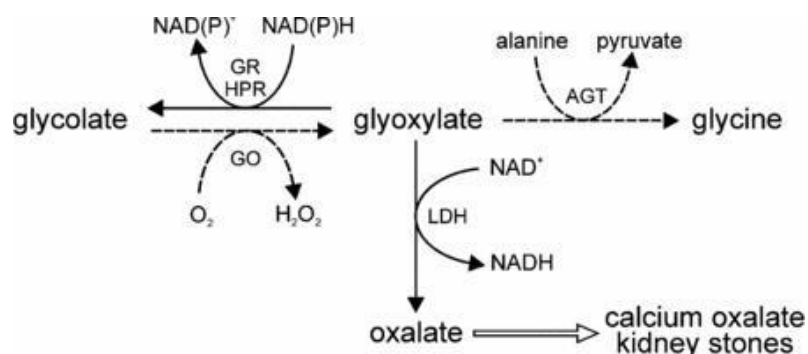
genuaren bitartez kanporatzen da (Lorenzo V, 2014). Oxalatoa kontzentrazio handitan aurkitzen denean, kaltzioarekin elkartzen da, kaltzio oxalatoa (*ingelesez Calcium oxalate, CaOx*) eratuz eta giltzurrunetan kalte ezberdinak eraginez, hala nola, nefrolitiasisa, nefrokaltzinosia eta egoera larriagoetan, giltzurrun gutxiegitasuna eta oxalosi sistemikoa (Bhasin B, 2015 eta Cochat P, 2012), tratatu ezean hilkorra dena (Oppici E, 2015).

PH1-ak munduan duen prebalentzia estimatua 1-3 kasu/milioi pertsona artean aurkitzen da (Cochat P, 2016).

Gizakitan, *AGXT* genea, AGT proteina kodetzen duena, 2. kromosoman aurkitzen da. Hamaika exoiek kodetzen dute eta 1,7kb inguruko RNA kodetzen du. AGT entzima, protei na homodimerikoa da eta gibelko zelulen peroxisoman aurkitu behar da funtzionamendu egokirako (Oppici E, 2015 eta Purdue PE, 1990).

Ehun eta berrogeita hamar mutazio baino gehiago deskribatu dira *AGXT* genean. Gaixotasuna 4 mekanismoen bitartez sortzen da: i) lokalizazio mitokondrial aberrantea ii) agregazio proteikoa iii) defektu katalitikoak eta iv) sintesi-defektuak (Leumann E, 2001). AGT entzimaren funtzionamendu ezaren ondorioz, glioxilatoa gibelko zeluletan metatzen da, laktato deshidrogenasa (LDH) entzimaren bitartez oxalatora oxidatzen dena, gaixotasunaren agerpena emanez (1.Irudia).

1.Irudia. Glioxilatoaren katabolismoa (Behman et al, 2006)



Tratamenduei dagokionez, oraindik ez da tratamendu estandar eraginkorrik existitzen (Hoppe B, 2006). Konposatu kimikoak erabili dira oxalatoaren disolbagarritasuna emendatzeko, ortofosfatoa kasu (Leumann E, 2001). Bestetik ere, tratamendu biologiko ezberdinak planteatu dira, hala nola, *Oxalobacter formigenes* bakteriararen erabilera. Bakteria honek, oxalatoa energia iturri moduan erabiltzen du, hesteetako oxalatoaren kontzentrazioa murriztuz (Cochat P, 2016).

Tratamendu hauek erabili arren, ez dira espezifikoak eta zenbait kasutan ez dute gaixotasuna hobetzen (Hoppe B, 2006). Azken ikerketei dagokionez terapia genikoa aztertu da tratamendu alternatibo moduan, mutatua dagoen genearen kopia egokia gibelko zeluletara bideratzeko proposatu dena (Salido E, 2011). Horretarako, bektore seguru eta efikaz baten beharra dago, guztien artean, bektore adenoasoziatuak (*ingelesez adeno-associated vector, AAV*) egokienak izan direlarik gaixotasun honen tratamendurako (Cochat P, 2016).

Bektore hauen abantaila, gizakietan gaixotasunak sortzen ez dutela eta epe luzerako espresioa dutela da, gainera, beste birus batzuek baino erreakzio immunologiko txikiagoa sortarazten dute (Vassalli G, 2003). AAV serotipo ugari existitzen dira eta serotipo bakoitza organo jakin bat infektatzeko tropismo jakina du, birusaren kapsidean agertzen diren proteinen arabera (Verma IM, 2005).

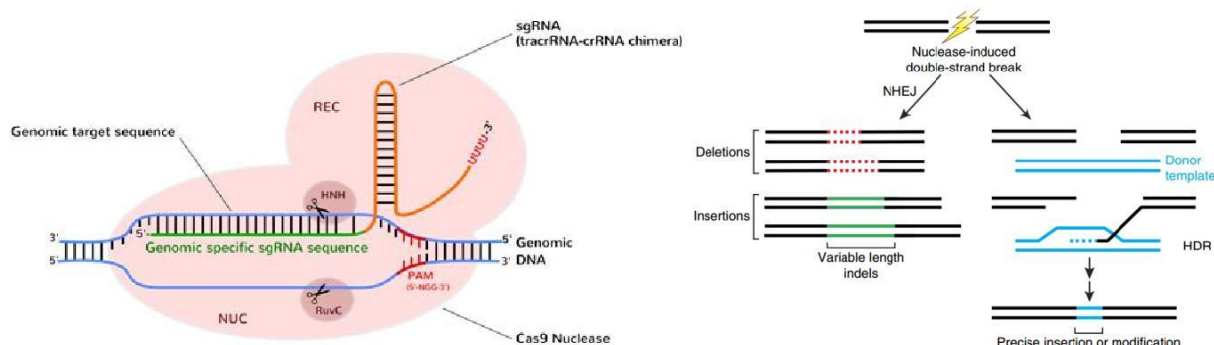
Azken hilabeteetan, estrategia berri bat proposatu da PH1-ren tratamendurako, zeinetan *HAO1* geneak kodifikatzen duen Glikolato Oxidasa (GO) entzimaren aktibitatearen inhibizioan oinarritzen den. GO proteinaren sintesia inhibituz, glioxilatoaren produkzioa murrizten da eta beraz, baita oxalatoaren produkzioa ere, glikolatoaren kontzentrazioa handitzen delarik. Glikolatoa molekula oso disolbagarria da eta genuaren bitartez kanporatua izan daiteke

kontzentrazio oso handitan, giltzurrunetan kalterik edota bestelako efektu kaltegarriak eragin gabe (1. Irudia) (Martin-Higueras C, 2016).

Datu hauek kontutan hartuz, estrategia berri bat garatu nahi izan da, GO -ren espresioaren isilarazpenean oinarritzen dena.

Azken urteetan, zelularen genoma modu espezifikoan editatzeko tresnak garatu dira. Tresna hauen artean, efikazia handia aurkeztu duena CRISPR-Cas (*Ingelesatik Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat -associated Cas nuclease*) izan da (Qi L, 2013). CRISPR-Cas sistema zenbait bakterio eta arkeen immunitate sistema osatzen du. Gida RNA (gRNA) batez eta Cas proteina batez eratuta dago, gRNA-k sekuentzia genomiko jakinak ezagutzen dituelarik eta behin ezagumendua eman delarik, Cas proteinak DNA-n helize bikoitzaren mozketa bat burutzen du. Behin mozketa eman delarik, zelulak duen DNA konponketa mekanismoak esker, mozketa hori bi mekanismoen bitartez konpondu daiteke: alde batetik, NHEJ (*ingelesez, Non-Homologous End-Joining*) eta bestetik, HDR (*ingelesez, Homologous Directed Repair*). NHEJ-ren bitartez, insertzioak eta delezioak (*ingelesez indel-ak*) sortzen dira gidak ezagutu dituen genoma sekuentzia jakinetan eta azken hauek, proteina modu egokian espresatzea ekiditen dute, kodoi irakurketa aldatzen dutelako (Bhaya D, 2011) (2.Irudia).

2.Irudia. CRISPR-Cas9 endonukleasa modifikatua gRNA espezifikoarekin programatua eta DNA konponketa mekanismoak (NHEJ eta HDR). A) DNA sekuentziaren ezagumendua gRNA-ren bitartez. <http://www.ozbiosciences.com/>. B) konponketa mekanismoak (Nature Biotechnology, 2013).



Beraz guzti hau kontutan izanik, estrategia berri baten garapena proposatu da. Terapia genikoa tradizionala erabiliz, gibleko zelulak infektatu nahi izan dira, eta bertan CRISPR-Cas9 sistema espresatzeko *mHao1* (*ingelesez mouse Hao1*) genearen sekuentzia genomikoaren aurka, GO proteinaren espresioa murrizteko eta oxalatoaren produkzioa murrizteko. Horretarako, serotipo 8-dun AAV bat erabiliko da, diseinatutako gida RNA eta Cas9 endonukleasa eramango duena.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Ikerketa zientifiko honen helburua edizio genikoan oinarritutako tekniken garapena da, estrategia berriak garatu ahal izateko I.motako Hiperoxaluria Primarioaren tratamendu durako. CRISPR-Cas9 sistemaren bitartez, *in vivo* PH1 saguen gibleko GO entzimaren produkzioa murriztea edo blokeatzea da helburu nagusia, glioxilatoaren produkzioa murriztu ahal izateko eta ondorioz oxalatoaren erapena eta metaketa murrizteko.

Helburu hori lortzeko, hurrengo azpi-helburuak planteatzen dira:

- 1) *Staphylococcus aureus*-aren (*S. aureus*) CRISPR-Cas9 sistema espresatzen duen AAV bektore batean, *Hao1* sekuentzia kodifikatzailearen aurkako RNA giden diseinua eta bektorearen produkzioa.
- 2) Mozketa eta edizio genikoaren efizientziaren analisia *in vivo* eta ebaluazioa *mHao1* genean eta bere efektua proteinaren espresioan.

- 3) Edizio genikoaren efektu terapeutikoaren ebaluazioa *in vivo*, ahotik etilenglikol (EG) gainkarga eman ostean.

3. Ikerketaren muina

Ikerketa honetan, esan bezala, terapia genikoa eta edizio genikoaren konbinaketaren efizientzia aztertu nahi izan zen, PH1-rentzat tratamendu alternatibo bat aurkitzeko.

Esperimentua burutu ahal izateko, 4 talde ezberdinetan banatu ziren PH1 saguak. Kontrol moduan, Wild Type (WT) sagu normalak (gaixotasunarik gabekoak) erabili ziren ere. PH1 animalien kasuan, bi kontrol ezarri ziren, PBS (birusarik ez zeraman taldea) eta AAV8.SaCas9 (gidarik gabeko birusa zeraman taldea). Beste bi taldeak, benchling programa (www.benchling.com) bitartez diseinatutako bi gida ezberdinak (gRNA1 eta gRNA2) zeramatzaten birusen efizientzia konparatzeko banatu ziren. Eratatutako taldeak hurrengo eskeman laburtzen dira (1.Taula):

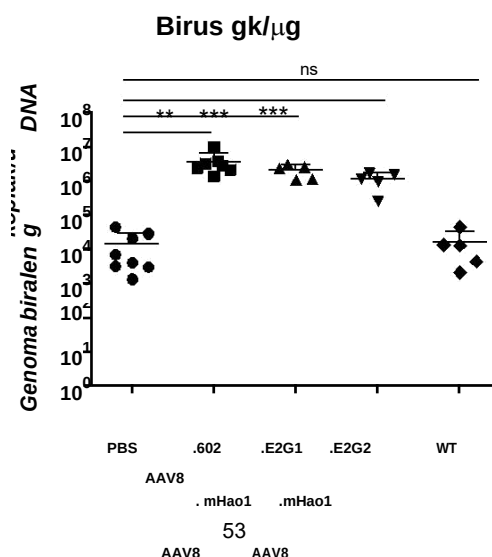
1.Taula. Animalien taldekatzea, animalia kopurua, tratamendua eta AAV dosia (genoma biralak/animaliako, gb/animaliako).

Taldea	Animalia	Animalia kopurua	Tratamendua	Dosia (gb/animaliako)
1	AgxtKO (PH1)	8	PBS (Phosphate Buffered Saline)	-
2	AgxtKO (PH1)	7	AAV8.SaCas9	1×10^{11}
3	AgxtKO (PH1)	5	AAV8.SaCas9.ex2.gRNA1	1×10^{11}
4	AgxtKO (PH1)	5	AAV8.SaCas9.ex2.gRNA2	1×10^{11}
5	WT	5	-	-

Behin birusak sintetizatuak izan zirela, saguei injektatu aurretik, gernu basala hartu zitzairen. Ondoren birusak intrabenosoki injektatu zitzairen, 21 egun itxaron zirelarik birusak gibleko zelulen gehiengoaren infekzioa lortzeko. Behin 21 egun igarota, saguei etilenglikol (EG) konposatua ematen hasi zitzairen, edateko uran %0,5-eko kontzentrazioan aste batez. EG konposatuak, oxalatoaren bide metabolikoa gainkargatzen du, oxalatoaren produkzioa areagotuz. Bitartean, 3. eta 7. egunetan, gernuko oxalato balioak neurtu ziren, gainkarga eman bitartean tratamenduaren eragina aztertu ahal izateko. EG-a aste batez eman ondoren saguak hil eta gibela erauzi ostean, analisi ezberdinak burutu ziren.

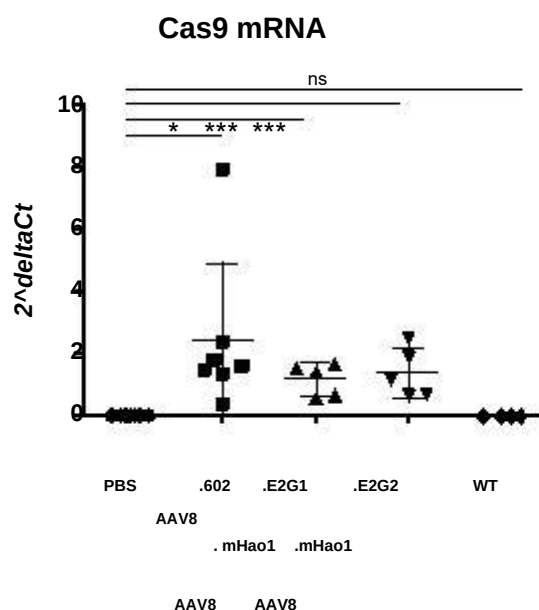
Hasteko, infekzioa modu egokian eman zela ziurtatzeko, gibleko zeluletan zeuden genoma biralen presentzia aztertu zen, birus genoma kopiak μg DNA-ko ($\text{gk}/\mu\text{g}$) analizatuz. 3. irudian aztertu daitekeen moduan, infekzioa modu egokian eman zen birusak injektatu ziren taldeetan, genoma biralen presentzia ezberdintasun adierazgarriak ikusi zirelarik PBS animaliekin konparatuz ($p < 0.01$ (**)) eta $p < 0.001$ (***), ns: ez adierazgarria).

3. Irudia. Genoma biralen kuantifikazioa gibleko zeluletan, AAV-arekin tratatutako saguetan eta kontrol saguetan.



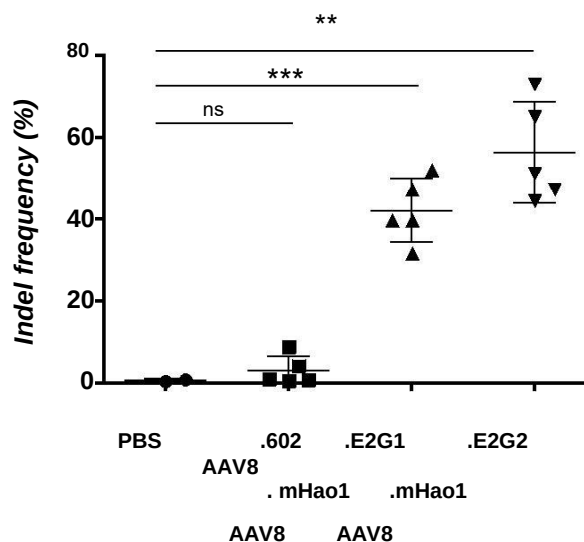
Behin infekzioa modu egokian eman zela ikusita, birusak Cas9 endonukleasaren espresioa burutzen duen edo ez aztertu zen. Horretarako Cas9 proteinaren mRNA-ren presentzia aztertu zen. 4. irudian aztertu daitekeen moduan, birusekin infektatutako sagu talde guztietan Cas9 mRNA-ren presentzia estatistikoki adierazgarria izan zen, birusak geneen transdukzioa modu egokian burutu zuelarik ($p < 0.1$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) ns: ez adierazgarria).

4. Irudia. Cas9 proteinaren espresioaren analisia mRNA-ren adierazpenaren bitartez gibleko zeluletan.



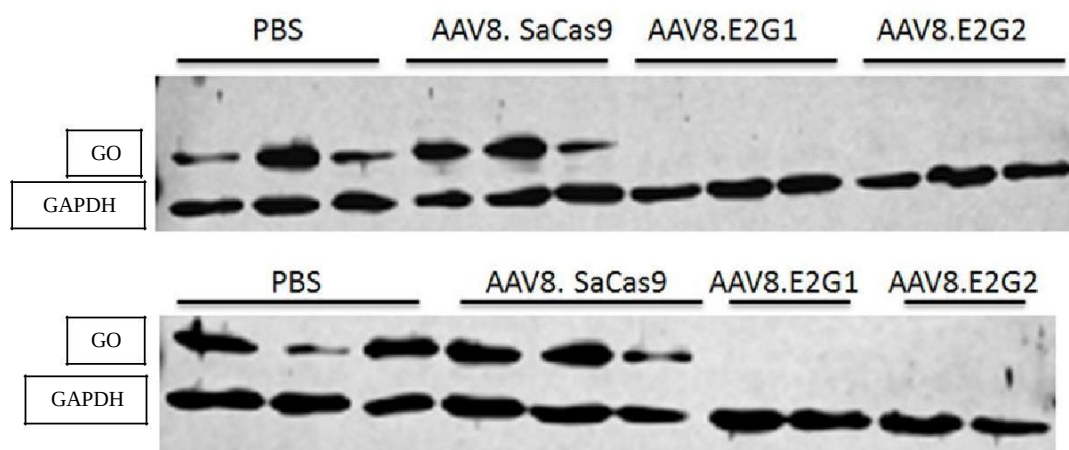
Cas9 proteinaren espresioa baieztatuta, *mHao1* genean sortutako *indel*-en frekuentzia aztertu zen. Horretarako, gibleko zelulen DNA erazuta, sekuentziatzera bidali zen. Behin sekuentziak edukita, TIDE programa (www.tide.nki.nl) erabiliz, sekuentziak konparatuak izan ziren. 5. irudian ikus daitekeen moduan, gidak erabili ziren taldeen kasuan, *indel*-en frekuentzia estatistikoki adierazgarria izan zen PBS taldearekin konparatuz gero, gidek DNA-n mozketak efizientea eratu zuelarik ($p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) ns: ez adierazgarria).

5. Irudia. Indel-en frekuentziaren analisia talde ezberdinetan



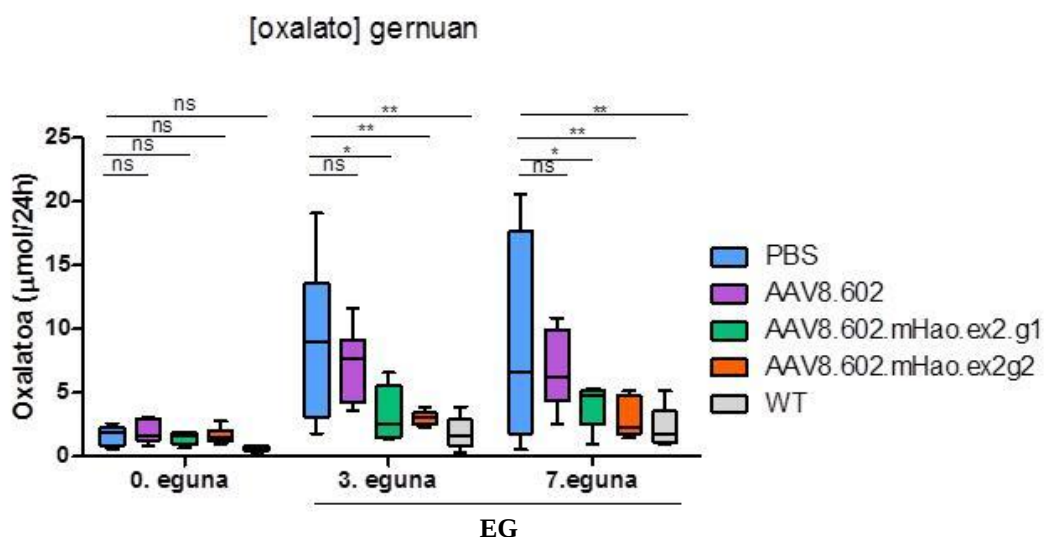
Indel-ak eratu zirela konfirmatuta, GO proteinaren espresioa Western blot bitartez aztertua izan zen, GO proteinaren murrizpena konfirmatzeko. Gidak erabili ziren bi taldeetan, GO proteinaren sintesiaren murrizpen argia lortu zen, sortutako *indel*-en ondoriozkoa izan zelarik (6. Irudia).

6.Irudia. Go proteinaren espresioaren analisia Western blot bitartez (AAV8.E2G1=AAV8.ex2gRNA1; AAV8.E2G2=AAV8.ex2gRNA2).



Azkenik, tratamenduak zuzenketa fenotipikoa izan duen ikusi ahal izateko, oxalatoaren kontzentrazioaren determinazioa burutu zen saguen gernuan. Gernuetako oxalatoaren balio basalak berdintsuak izan ziren PH1 eta WT animalien kasuan. Behin EG-a ematen hasi zitzaizenean, talde guztiek oxalatoaren eskrezioan emendapen bat azaldu zuten, oxalatoaren bide metabolikoaren gainkarga zela eta. Hala ere, gidekin tratatutako saguen kasuan, oxalatoaren eskrezioa murriztagoa izan zen 3. eta 7. egunetan PBS taldearekin konparatuz gero,emaitzak estatistikoki adierazgarriak izan zirelarik ($p < 0.01$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) , ns: ez adierazgarria) (7. Irudia).

7.Irudia. Gernuko oxalato kontzentrazioaren neurpena talde eta egun ezberdinetan.



4. Ondorioak

Aurkeztutako lanetik hainbat ondorio atera daitezke. Lehenik eta behin, terapia genikoaren efizientzia altua dela. Gibeledako zelula proportzio handia infektatzea lortu da. Bestetik edizio genikoaren efizientzia oso altua izan da. Diseinatutako gidek, GO sekuentzia genomikoan eratutako indelen %-a nahikoa izan da GO proteina kantitatearen murrizpena ikusi ahal izateko eta honekin batera, tratamenduaren efektu terapeutikoa ikusi ahal izateko, gernuko oxalato kontzentrazioaren murrizpena eman baita. Beraz, tratamendu alternatibo on baten aurrean egon gaitezke, nahiz eta ikerketa gehiago behar dituen esperimentu honek.

5. Etorkizunerako planteatzeko den norabidea

Lan honetatik abiatuta, oraindik badira zenbait puntu analizatzeko daudenak. Hala nola, gibeledako eta giltzurrunetako histologia aztertu beharra dago. Izan ere, giltzurrunetan pilatzen den CaOx analizatzeko egokia izango litzateke, gaixotasunaren ondorio bat delako. Bestetik ere, CRISPR-Cas sistemak denbora luzean duen eragina ere aztertzea komenigarria litzateke, ondorio kaltegarriren bat ote duen ikusteko, etengabe espresatzen baitago. Azkenik, metodoaren segurtasuna dela eta, bestelako organo eta ehunetan CRISPR-Cas sistema espresatzen den edo ez aztertu beharko litzateke, gibelaren beste ehunetan espresatzen eta eraginik (*Off-target*-ak) ditugun edo ez ziurtatzeko.

6. Erreferentziak

Bhasin B, Urekli HM, Atta MG. (2015): Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma. *World J Nephrol.*, 235-44.

Bhaya D, Davison M, Barrangou R. (2011): CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet.*;45:273-97.

Cochat P, Hulton SA, Acquaviva C, Danpure CJ, Daudon M, De Marchi M, et al. (2012): Primary hyperoxaluria Type 1: indications for screening and guidance for diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant.*, 27(5):1729-36.

Cochat P, Rumsby G. (2016) Primary Hyperoxaluria. *N Engl J Med.*, 369(7):649-58.

Dutta C, Avitahl-Curtis N, Pursell N, Larsson Cohen M, Holmes B, Diwanji R, et al. (2016): Inhibition of Glycolate Oxidase With Dicer-substrate siRNA Reduces Calcium Oxalate Deposition in a Mouse Model of Primary Hyperoxaluria Type 1. *Mol Ther.*, 24(4):770-8.

Hoppe B, Beck B, Gatter N, von Unruh G, Tischer A, Hesse A, et al. (2006): Oxalobacter formigenes: a potential tool for the treatment of primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.*, 70(7):1305-11.

Leumann E, Hoppe B. (2001): The primary hyperoxalurias. *J Am Soc Nephrol.*, 12(9):1986-93.

Lorenzo V, Torres A, Salido E. (2014): Primary hyperoxaluria. *Nefrologia.*, 34(3):398-412

Martin-Higueras C, Luis-Lima S, Salido E. (2016): Glycolate Oxidase Is a Safe and Efficient Target for Substrate Reduction Therapy in a Mouse Model of Primary Hyperoxaluria Type I. *Mol Ther.*, 24(4):719-25.

Oppici E, Montioli R, Cellini B. (2015): Liver peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase and the effects of mutations associated with Primary Hyperoxaluria Type I: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.*, 1854(9):1212-9.

Purdue PE, Takada Y, Danpure CJ. (1990): Identification of mutations associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of alanine:glyoxylate aminotransferase in primary hyperoxaluria type 1. *J Cell Biol.*,111(6 Pt 1):2341-51.

Qi L, Larson M, Gilbert L, Doudna J, Weissman J, Arkin A, et al. (2013): Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell.*, 152(5):1173-83.

Salido E, Rodriguez-Pena M, Santana A, Beattie SG, Petry H, Torres A.(2011): Phenotypic correction of a mouse model for primary hyperoxaluria with adeno-associated virus gene transfer. *Mol Ther.*, 19(5):870-5

Vassalli G, Büeler H, Dudler J, von Segesser LK, Kappenberger L. (2003): Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo: a comparative study with adenovirus vectors. *Int J Cardiol.*,90(2-3):229-38.

Verma IM, Weitzman MD.(2005): Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem.*, 74:711-38.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi nituzke batez ere Nereari, bere tesian tartetxo bat edukitzen uzteagatik, pazientziagatik eta irakatsi didan guztiagatik, etorkizunean oso baliogarria izango baitzaidalako.

Bestetik Gloriari, bere laborategian hartu izanagatik, hasieratik nigan konfiantza izateagatik eta aukera on hau emateagatik. Baita Juanrori, gainean egoteagatik eta emandako irakaspenagatik.

USP1 deubikitinasa pankrea-minbiziaren aurkako itu terapeutiko gisa

Olazabal-Herrero Anne¹; Sendino Maria¹; Peters Godefridus J²; Giovannetti Elisa^{2,3};
Rodríguez Jose Antonio¹

¹Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), ²VU University
Medical Center (Amsterdam), ³University of Pisa (Italy)

ane.olazabal@ehu.eus

Laburpena

Ubikitinazio-deubikitinazio prozesuen arteko oreka ezinbestekoa da zelularen ingurunea osasuntsu mantentzeko. Oreka honetan deubikitinasa oso garrantzitsuak dira. Izan ere, oreka honen erregulazioaren galera hainbat gaixotasunekin erlazionatu da, hauen artean minbizia. Hori dela eta, USP1 giza deubikitinasa oso erakargarria da minbiziaren kontrako itu terapeutiko moduan, DNA-kaltearen aurkako erantzunean jokatzeko duen paper kritikoaengatik. USP1en inhibitzailea den ML323 konposatuak biriketako minbizian garatzen den zisplatinoarekiko erresistentzia gainditzeko duela erakutsi da. Dena den, USP1ek beste minbizi motetan jokatzeko duen papera guztiz ezezaguna da. Ikerketa honetan, USP1ek pankrea-minbiziari aurre egiteko itu terapeutiko gisa duen ahalmena aztertzen da.

Hitz gakoak: USP1, UAF1, ML323, DNA-kaltea, pankrea-minbizia.

Abstract

The dynamic balance between ubiquitination and deubiquitination determines the final ubiquitination status of the substrate, ensuring a healthy cellular homeostasis. Deubiquitinases are important in this balance. Thus, dysregulations in the ubiquitination-deubiquitination machinery are highly related to human diseases, particularly tumor development. In this regard, targeting human deubiquitinase USP1, a known regulator of the DNA damage response (DDR) may constitute a promising anticancer target to improve the efficacy of the conventional drugs. ML323, the most specific USP1 inhibitor to date, was shown to reverse the resistance of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells to the conventional therapeutic agent cisplatin. Nevertheless, there is no information to date about the potential effects of USP1 in other cancer types. In an attempt to extend these findings to other cancer types, we aimed to analyze the potential of USP1 as a novel target in pancreatic cancer.

Keywords: USP1, UAF1, ML323, DNA damage response, pancreatic cancer.

1.Sarrera eta motibazioa

Denbora luzez, proteina intrazelular gehienek bizitza oso luzea zutela pentsatu zen. Sineskera horrek bere horretan jarraitu zuen 1980ko hamarkadan, ubikitina izeneko proteina (Goldstein et al., 1975) eta ubikitinazio prozesuak (Hershko et al., 1983) aurkitu ziren arte.

Zelula batek bere ingurunea konstante eta egoera osasuntsu batean mantentzeko proteina-mailen erregulazio egokia ezinbestekoa da. Erregulazio horren erantzule diren mekanismoen artean ubikitinazio prozesua aurkitzen dugu. Ubikitinazioaren funtzio ezagunena proteinen batez besteko bizitza eta adierazpenaren maila erregulatzea da. Horretarako, proteinak ubikitina molekula batekin markatzen dira eta marka hori suntsipen seinale bat izango da zelulak proteina hori degradatu behar duela jakiteko. Horretaz aparte, ubikitinazioak beste hainbat funtzio ez degradatiboetan parte hartzen du: DNA-kaltearen aurkako erantzunean eta ziklo zelularren erregulazioan, besteak beste (Chen eta Sun, 2009).

Proteinen ubikitinazioa, beste proteinen eraldaketa batzuk bezala, itzulgarria da. Proteina ituei ubikitina molekula kentzeaz arduratzen diren entzimek deubikitinasa deritze (Reyes-Turcu et al., 2009). Ubikitinazio-deubikitinazio prozesuen arteko orekak proteinaren ubikitinazio maila zehazten du, zelularen egoera osasuntsua mantentzea bermatuz. Hori dela eta, ubikitinazio-deubikitinazio makineriaren erregulazio-galera hainbat giza gaixotasunekin erlazionatu da, bereziki gaixotasun

nerodegeneratibo (Atkin eta Paulson, 2014) eta tumoreen garapenarekin (Satija et al., 2013). Zentzu honetan, ubiquitinazio-deubikitinazio prozesuetan parte hartzen duten proteinak itxaropen handiko ituak dira minbiziaren aurkako terapian (Hoeller eta Dikic, 2009).

Ubikitinazio-deubikitinazio prozesuan parte hartzen duten proteinen artean, DNA-kaltearen aurkako erantzunean dihardutenak dira erakargarrienak minbiziaren aurkako terapiaren ikuspuntutik. Minbiziaren aurkako tratamendu gehienak, erradioterapia eta kimioterapia barne, DNAr kaltea egitean oinarritzen dira, ondorioz zelulen heriotza eraginez. Tratamendu hauen arazo larrienetako bat minbizi zelulek terapiaren aurka garatu dezaketen erresistentzia da. Hori dela eta, terapia konbinatuetara jotzen da askotan. Ubikitinazio-deubikitinazio prozesuak DNA-kaltean daukan paper garrantzitsua gero eta nabarmenagoa (Ulrich eta Walden, 2010) denez, prozesu honetan parte hartzen duten proteinak interesgarri bilakatu dira ohiko terapien aurkako erresistentzia gainditzeko. Ubikitinazio prozesuan parte hartzen duten proteinak asko aztertu izan dira minbiziaren aurkako terapiaren ikuspuntutik (Mattern et al., 2012). Deubikitinazio prozesuan parte hartzen duten proteinen (deubikitinasen) azterketa ordea, askoz ere motelago doa.

USP1 deubikitinasa DNAr aurkako kaltearen erregulatzaile garrantzitsu bat da (Huang et al., 2006; Nijman et al., 2005). Beraz, itu interesgarria izan daiteke minbiziaren aurkako terapiaren ikuspuntutik. USP1 proteinak beste proteina baten laguntza behar du bere funtzioa bete ahal izateko: UAF1 proteinarena. Izan ere, UAF1 USP1i lotzen zaionean USP1en aktibitatea 30 aldiz igotzen da (Cohn et al., 2007; Faesen et al., 2001; Yin et al., 2015). USP1 proteinaren inhibizioa etorkizun handiko hurbilketa terapeutikoa izan daitekeela pentsatzeko arrazoi asko daude: batetik, USP1ek paper kritikoa jokatzeko DNA kaltearen aurkako erantzunean; bestetik, USP1 proteinaren desagerpenak, agente kimioterapeutikoekiko sentikortasuna igoarazten du (Kim et al., 2009; Murai et al., 2011); eta azkenik, USP1 proteina gainadierazita agertzen da hainbat tumoreetan. Arrazoi hauen ondorioz, USP1en kontrako hainbat inhibitzaile garatu dira azken urteotan (Chen et al., 2011; Liang et al., 2014). Gaur egun ezagutzen den USP1en inhibitzaile espezifikoena ML323 da (Dexheimer et al., 2014). ML323k biriketako minbizian garatzen den zisplatinoarekiko (ohiko terapia) erresistentzia gainditzea eragiten duela erakutsi da (Dexheimer et al., 2014), USP1ek itu terapeutikotzat duen garrantzia azpimarratuz. Hala ere, USP1en inhibizioak beste minbizi motetan duen efektua aztertzeke dago oraindik.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Pankrea minbiziak oso pronostiko txarra du eta oso aukera terapeutiko mugatuak ditu. Sarreran aipatu bezala, USP1ek minbiziaren aurkako itu terapeutiko gisa daukan ahalmena ezaguna izan arren, bere efektuak biriketako minbizian bakarrik frogatu dira. Aurkikuntza hauek beste minbizi mota batzuetara zabaltzeko asmoz, USP1ek pankrea-minbiziaren aurkako itu terapeutiko berri gisa duen ahalmena aztertzea hartu dugu helburu nagusitzat.

3. Ikerketaren muina

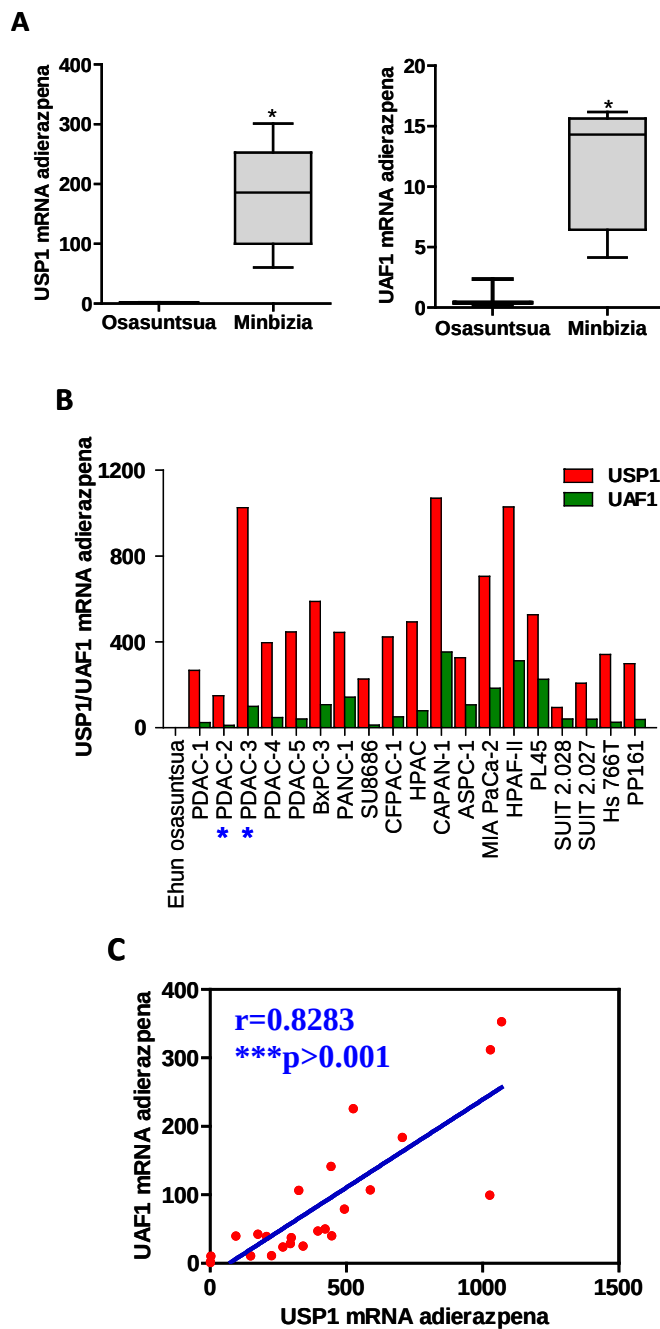
USP1 eta UAF1en mRNAk gainadierazita daude pankrea-minbizian

Giza deubikitinasa geneetan mutazioak ez dira maiz gertatzen minbizian. Deubikitinasen mRNA mailen alterazioak ordea, askotan ikusten dira (Sacco et al., 2010). Zentzu honetan, Oncomine Research Edition datu baseak minbizi mota askotan USP1en mRNA mailetan alterazioak ematen direla erakusten du (Rhodes et al., 2007).

USP1 eta bere aktibatzailea den UAF1en mRNA mailak pankrea-minbizian neurtzeko asmotan *RT-PCR kuantitatiboa* erabili zen. Alde batetik, USP1 eta UAF1en mRNA mailak erkatu ziren ehun osasuntsu eta pankrea minbizi ehunen artean (1. irudia A). Beste aldetik, USP1 eta UAF1-en mRNA mailak neurtu ziren 19 pankrea minbizi lerro zelularretan (1. irudia B). Pankrea-tumore zein pankrea-tumoreetatik eratorritako lerro zelularretan, USP1 eta UAF1en mRNA mailak emendatuta agertu ziren

lagin osasuntsuekin konparatuz. Horretaz gain, USP1 eta UAF1en mRNAen artean, korrelazio sendoa aurkitu zen (1. irudia C). Emaita hauek ikusita, bi lerro zelular aukeratzea erabaki genuen hurrengo esperimentuatarako (izartxo urdinak) USP1/UAF1en mRNA adierazpenean oinarrituta: PDAC2 (USP1/UAF1 adierazpen baxua) eta PDAC3 (USP1/UAF1 adierazpen altua).

1. irudia: USP1 eta UAF1 gainadierazita daude pankrea minbizian. A. USP1 eta UAF1-en mRNA mailak ehun osasuntsu (n=3) eta pankrea-minbizi ehunean (n=5). Errore barrek SEM adierazten dute. * $p > 0.05$ (Student t-test) B. USP1 eta UAF1en mRNA mailak lagin osasuntsuan eta pankrea-minbiziko lerro zelularretan. USP1 berdez eta UAF1 gorri adierazita. Izartxo urdinek hurrengo esperimentuatarako aukeratutako zelulak (PDAC2 eta PDAC3) adierazten dituzte. C. Pankrea minbizian USP1 eta UAF1en mRNA mailen arteko korrelazioa adierazten duen Scatter-plota. pearson $r = 0.8283$ eta *** $p > 0.001$ (Student t-test).

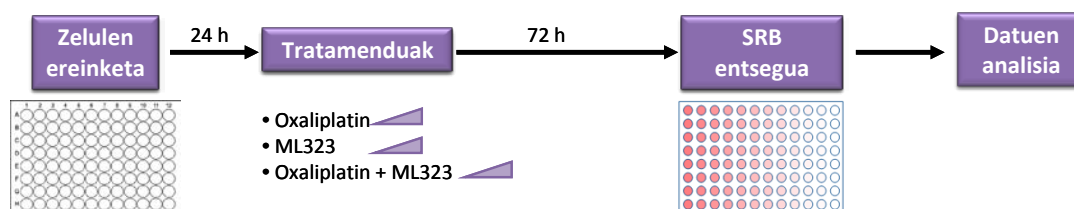


ML323 USP1en inhibitzaileak efektu sinergikoa dauka oxaliplatinoarekin konbinatuta PDAC2 pankrea minbizi lerro zelularrean

Esan bezala, ML323 inhibitzaileak, zisplatinoarekiko erresistentzia gaindiazten du biriketako minbizian (Dexheimer et al., 2014). Behaketa honek, USP1ek minbiziaren aurkako terapian izan dezakeen garrantzia agerian uzten du.

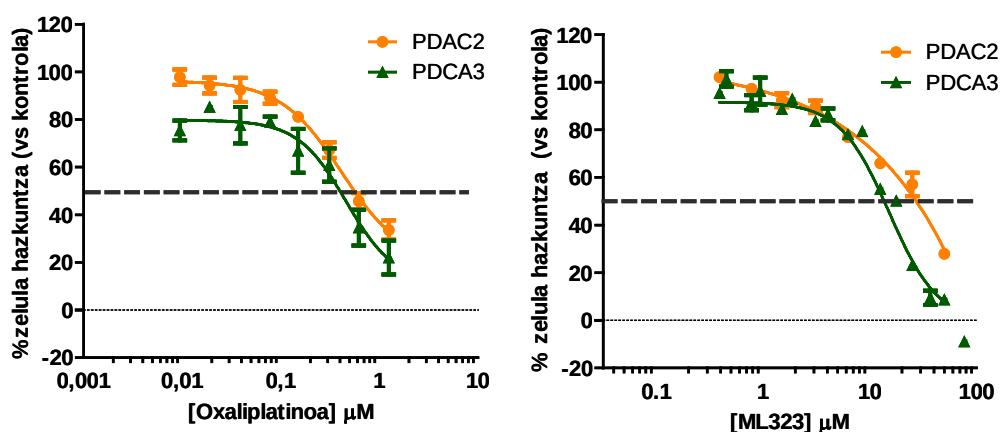
Pankrea-minbizian USP1ek itxaropen terapeutiko bezala duen potentziala aztertzeko, lehenengo ML323 eta ohiko terapia den oxaliplatinoaren efektua ikertu zen aukeratutako pankrea-minbizi zeluletan (PDAC2 eta PDAC3). Horretarako, *Sulforhodamine B* (SRB) entsegua erabili zen 2. irudian azaldutako lan fluxua jarraituz. SRB proteinei lotzeko ahalmena daukan koloratzaile arrosa da, zeina espektrofometriaren bidez neurtu daitekeen. Horrela, proteina kopurua neurtuz, zelula kopurua, eta beraz, zelulen hazkuntza, ondorioztatu dezakegu.

2. irudia: Sulforhodamine B (SRB) entsegua lan fluxua. Esponentzialki hazten dauden zelulak 96 putzutako plaketan ereiten dira eta tratamendu ezberdinekin inkubatzen dira kontzentrazio gorakorrek erabiliz. Konposatuekin 72 orduz tratatu ondoren SRB entsegua burutzen da.



SRB entsegutik lortutako datuetatik, hazkuntza inhibizioaren kurbak sortu ziren konposatu bakoitzaren IC_{50} parametroa (zelulen hazkuntzaren %50a inhibitzeko behar den droga kontzentrazioa) kalkulatu ahal izateko (3. irudia).

3.irudia: PDAC2 eta PDAC3 lerro zelularren hazkuntza inhibizioaren kurbak. Lerro etenak %50eko hazkuntza adierazten du.



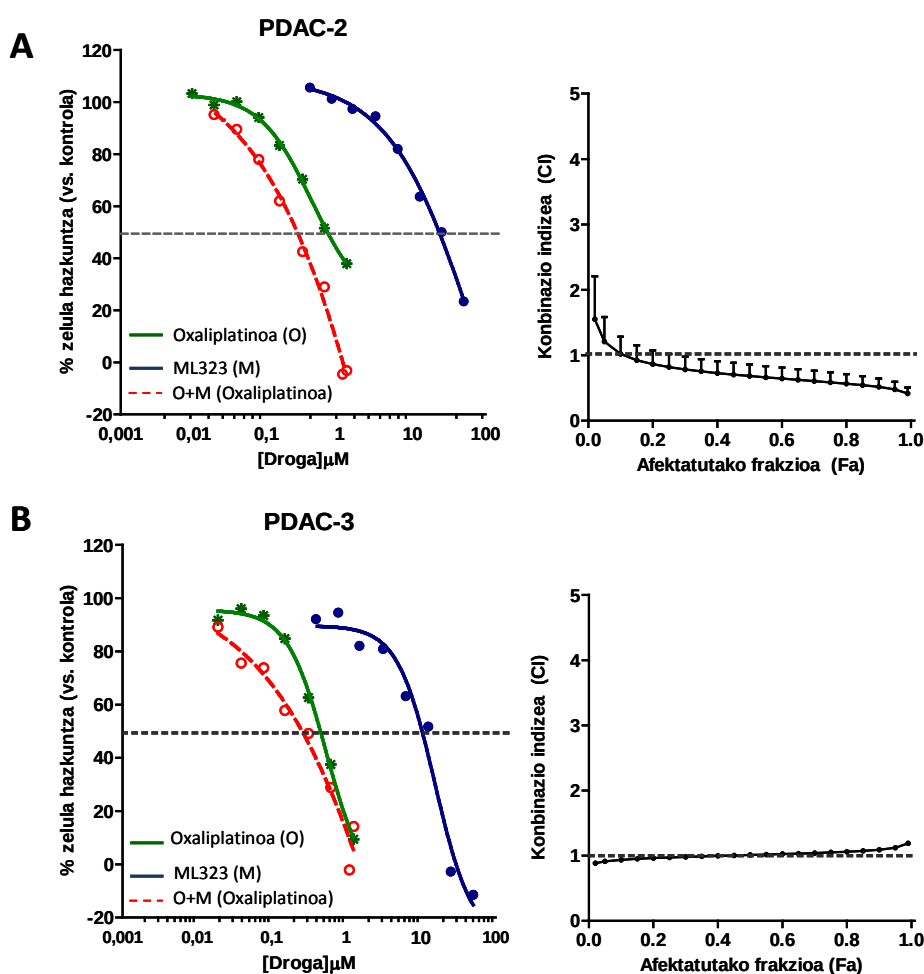
1. taulako lehenengo zutabeak oxaliplatino eta ML323 tratamenduekin lortutako IC_{50} ak laburbiltzen ditu. Balio hauetatik, PDAC2 lerro zelularra bi tratamenduekiko PDAC3 baino erresistenteagoa dela (IC_{50} altuagoa erakusten duelako) ondorioztatzen da

1. taula: USP1/UAF1en ML323 inhibitzailea eta oxaliplatino agente kimioterapeutikoaren efektua PDAC2 eta PDAC3 lerro zelularretan.

Lerro zelularra	Oxaliplatino	ML323
	IC ₅₀ (mM)	IC ₅₀ (mM)
PDCA-2	0.55	24.6
PDCA-3	0.43	15.16

Ondoren, ML323 eta oxaliplatinoaren arteko konbinazioaren efektua aztertzeko helburuarekin, SRB entsegua burutu zen zelulak oxaliplatino eta ML323 (O:M) ratio finko batekin tratatuz. Ratio hau monoterapietatik lortutako IC₅₀etan oinarritu zen. 4. irudiak hazkuntza inhibizioaren kurba adierazgarriak aurkezten ditu oxaliplatino, ML323 eta bien konbinazio tratamenduak erabilia. Konbinazioarekin lortutako IC₅₀ak 2. taulan laburbiltzen dira. PDAC2 lerro zelularrean oxaliplatinoaren IC₅₀a erdira jaisten da, PDAC3 lerro zelularrean IC₅₀aren aldaketa txikiagoa den bitartean.

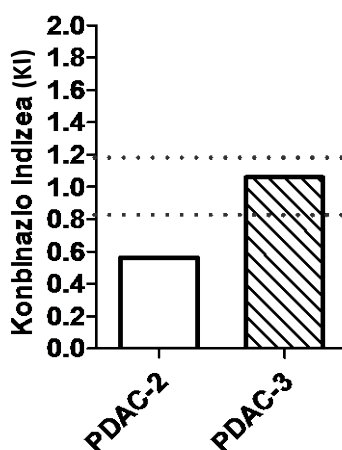
4. Irudia: Oxaliplatino-ML323 konbinazioarekin tratatutako PDAC2 eta PDAC3 lerro zelularren hazkuntza inhibizioaren kurbak eta efektu farmakologikoaren medianaren plota. A eta B ezkerrekoa: Hazkuntza inhibizioaren kurbak. Lerro etenak %50eko hazkuntza adierazten du. A eta B eskuinaldea: Calcsyn programa erabilia, O(+M) konbinazioaren efektua konparatu zen monoterapia bakoitzaren efektuarekin eta konbinazio indizea (CI) kalkulatu zen afektatutako frakzioaren (Fa) tarte batean. Lortutako CI balioak Fa-ren kontra irudikatu ziren eta efektu farmakologikoaren medianaren plota adierazi zen zelula lerro bakoitzarentzat. Puntutxoak lerroak CI=1 balioa adierazten du.



Ondoren, oxaliplatino eta ML323aren arteko erlazioa sakonago analizatu zen eta droga dosiarekin afektatutako frakzioa (Fa) eta konbinazio indizea (KI) kalkulatu ziren Calcsyn (Chou, 2010) programa erabilita. Datu hauekin droga efektu-mediana plotak irudikatu ziren (4. irudia).

Bukatzeko, KI balioen batezbestekoa kalkulatu zen Fa 0.5, 0.75 eta 0.9 balioetan. Batezbesteko hori terapia konbinatuaren eragina aztertzeko erabili zen (5. irudia) (2. taula). 1.2 baino KI balio handiagoek efektu antagonistikoa adierazten dute (konbinazioarekin ohiko drogaren efektua txikitzen da), 0.8 eta 1.2 arteko KI balioek efektu aditiboa (konbinazioarekin ohiko drogaren efektua berdintzen da) eta 0.8 baino baxuagoa den KI balioek efektu sinergistikoa (konbinazioarekin ohiko drogaren efektua handitzen da) (Chou, 2010) (2. taula).

5. irudia: Oxaliplatino-ML323 konbinazioarekin tratatutako PDAC2 eta PDAC3 lerro zelularren konbinazio indizeen (KI) batezbestekoak Fa 0.5, 0.75 eta 0.9 balioetan. 1.2 baino KI balio handiagoek efektu antagonistikoa adierazten dute; 0.8 eta 1.2 arteko KI balioek efektu aditiboa eta 0.8 baino baxuagoa den KI balioek efektu sinergistikoa (Chou, 2010).



2. taula: USP1/UAF1en ML323 inhibitzailea eta oxaliplatino agente kimioterapeutikoaren arteko efektua eta efektuaren esanahia PDAC2 eta PDAC3 lerro zelularretan.

Ratioa M:O	O(+M)	C.I.	Efektua
	IC ₅₀ (mM)		
1:45	0.24	0.56	Sinergismoa
1:35	0.31	1.06	Aditiboa

5. irudian, efektu sinergistiko sendoa ikusten da oxaliplatino eta ML323 tratamenduak konbinatuz PDAC2 zeluletan. PDAC3 zeluletan ordea, terapia konbinatuaren efektua aditiboa da. PDAC2 zeluletan aurkitutako efektu sinergistikoak, pankrea minbizi eredu prekliniko batzuetarako USP1en inhibizioa terapia konbinatu interesgarria izan daitekeela iradokitzen du.

4. Ondorioak

Ikerketa honetan USP1ek pankrea-minbiziaren kontrako itxura terapeutiko gisa daukan garrantzia erakusten dugu. Lehenik eta behin ikusi da, USP1 eta bere aktibatzaile den UAF1en mRNAk gainadierazita daudela pankrea-minbizi ehunetan eta pankrea-minbizi zelula lerroetan. Honek USP1en inhibizioa pankrea-minbiziaren aurkako terapia moduan erabiltzea estrategia ona dela ematen du aditzera. Zentzu horretan, ML323 USP1en inhibitzailea eta ohiko terapia den oxaliplatinoaren artean efektu sinergistikoa aurkitzen dugu PDAC2 lerro zelularrean. Honek ML323 tratamenduak oxaliplatinoaren efektua areagotzen duela esan nahi du. Laburbilduz: USP1en inhibizioa terapia konbinatu interesgarria da pankrea minbiziko eredu prekliniko hauetan.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Behin USP1ek pankrea-minbizian jotzen duen paper garrantzitsua ikusita, interesgarria litzateke ML323 eta oxaliplatinoaren efektu sinergistikoaren mekanismo funtzionala aztertzea. Horrela, terapia konbinatuak USP1 eta UAF1en mRNA eta proteina mailan duen efektua ikertzea interesgarria izan daiteke. Horretaz gain, terapia konbinatuak DNAr kalte gehiago egiten dion begiratu genezake edo terapia konbinatuaren eraginez zelula gehiago hiltzen diren. Bukatzeko, oxaliplatino-ML323 konbinazio terapiaren arteko sinergia beste minbizi motetan ere ematen den aztertzea interesgarria izango litzateke.

6. Erreferentziak

- Atkin G eta Paulson H (2014): "Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease", *Front Mol Neurosci*, 8;7:63
- Chen ZJ eta Sun LJ (2009): "Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling", *Mol Cell*, 13;33(3):275-86
- Chen J, Dexheimer TS, Ai Y, Liang Q, Villamil MA, Inglese J, Maloney DJ, Jadhav A, Simeonov A, Zhuang Z (2011): "Selective and cell-active inhibitors of the USP1/ UAF1 deubiquitinase complex reverse cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells", *Chem Biol*, 18(11):1390-400
- Chou TC (2010): "Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method", *Cancer Res*, 70(2):440-6
- Cohn MA, Kowal P, Yang K, Haas W, Huang TT, Gygi SP, D'Andrea AD (2007): "A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway", *Mol Cell*, 28(5):786-97
- Dexheimer TS, Rosenthal AS, Luci DK, Liang Q, Villamil MA, Chen J, Sun H, Kerns EH, Simeonov A, Jadhav A, Zhuang Z, Maloney DJ (2014): "Synthesis and structure-activity relationship studies of N-benzyl-2-phenylpyrimidin-4-amine derivatives as potent USP1/UAF1 deubiquitinase inhibitors with anticancer activity against nonsmall cell lung cancer", *J Med Chem*, 57(19):8099-110
- Faesen AC, Luna-Vargas MP, Geurink PP, Clerici M, Merks R, van Dijk WJ, Hameed DS, El Oualid F, Ovaa H, Sixma TK (2011): "The differential modulation of USP activity by internal regulatory domains, interactors and eight ubiquitin chain types", *Chem Biol*, 18(12):1550-61
- Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA (1975): "Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells", *Proc Natl Acad Sci*, 72(1):11-15
- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A (1983): "Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown", *J Biol Chem*, 258(13):8206-14
- Hoeller D eta Dikic I (2009): "Targeting the ubiquitin system in cancer therapy", *Nature*, 458:438-444
- Huang TT, Nijman SM, Mirchandani KD, Galardy PJ, Cohn MA, Haas W, Gygi SP, Ploegh HL, Bernards R, D'Andrea AD (2006): "Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage", *Nat Cell Biol*, 8(4):339-47
- Kim JM, Parmar K, Huang M, Weinstock DM, Ruit CA, Kutok JL, D'Andrea AD (2009): "Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype", *Dev Cell*, 16(2):314-20
- Liang Q, Dexheimer TS, Zhang P, Rosenthal AS, Villamil MA, You C, Zhang Q, Chen J, Ott CA, Sun H, Luci DK, Yuan B, Simeonov A, Jadhav A, Xiao H, Wang Y, Maloney DJ, Zhuang Z (2014): "A selective USP1-UAF1 inhibitor links deubiquitination to DNA damage responses", *Nat Chem Biol*, 10(4):298-304

- Mattern MR, Wu J, Nicholson B (2012): "Ubiquitin-based anticancer therapy: carpet bombing with proteasome inhibitors vs surgical strikes with E1, E2, E3, or DUB inhibitors". *Biochim. Biophys. Acta* 1823:2014–2021
- Murai J, Yang K, Dejsuphong D, Hirota K, Takeda S, D'Andrea AD (2011): "The USP1/UAF1 complex promotes double-strand break repair through homologous recombination", *Mol Cell Biol*, 1(12):2462-9
- Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD, Bernards R (2005): "The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway", *Mol Cell*, 17(3):331-9
- Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD (2009): "Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes", *Annu Rev Biochem*, 78:363-97
- Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Varambally R, Yu J, Briggs BB, Barrette TR, Anstet MJ, Kincaid-Beal C, Kulkarni P, Varambally S, Ghosh D, Chinnaiyan AM (2007): "Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles", *Neoplasia*, 9(2):166-80
- Sacco JJ, Coulson JM, Clague MJ, Urbé S (2010): "Emerging roles of deubiquitinases in cancer-associated pathways" *IUBMB Life*, 62(2):140-57
- Satija YK, Bhardwaj A, Das S (2013): "A portrayal of E3 ubiquitin ligases and deubiquitylases in cancer", *Int J Cancer*, 133(12):2759-68
- Ulrich HD eta Walden H (2010): "Ubiquitin signalling in DNA replication and repair", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 11: 479–489
- Yin J, Schoeffler AJ, Wickliffe K, Newton K, Starovasnik MA, Dueber EC, Harris SF (2015): Structural Insights into WD-Repeat 48 Activation of Ubiquitin-Specific Protease 46", *Structure*, 23(11):2043-54

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa honen emaitzak Amsterdameko VU University Medical Center institutuan egindako estantziaren ondorio dira. Anne Olazabalek UPV/EHU-ko diru laguntza predoktorala jaso du. Maria Sendinok Eusko Jaurlaritzako diru laguntza predoktorala jaso du. Jose Antonio Rodriguezek Espainiako Jaurlaritzako (Ministerio de Ciencia e Innovación) eta UPV/EHU-ko (UFI11/20) diru laguntzak jaso ditu (BFU2009-13,245).

Tumoreak, estres sozialak eta estresari aurre egiteko estrategiek jokabide depresiboan eta garunaren aktibitatean duten eragina.

Olatz Goñi-Balentziaga, Oscar Vegas, Ainitze Labaka eta Larraitx Garmendia
Psikobiologia arloa. Oinarrizko Psikologia Prozesuak eta Garapena Saila,
Psikologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea.
Kontakturako posta: olatz.goni@ehu.eus

Laburpena

Depresioak lotura estua du minbiziarekin eta estres sozialarekin, baina harreman hori eragiten duten mekanismoen inguruko informazioa ez dago erabat osatuta. Hori dela eta, tumoreek eta estresak garunaren aktibitatean duten eragina aztertzea du helburu ikerketa honek. Horretarako, OF1 sagu arrei B16F10 melanoma zelulak inokulatu eta azpitalde bati estres soziala eragin zaio. Tumoreak garuneko serotonina maila murriztu eta 3-HK neurotoxikoaren maila handitu du. Azken efektu hori estresari aurre egiteko strategi pasiboak dituzten saguetan ere azaldu da. Jokaerari dagokionez, tumoreak sakarosarekiko preferentzia txikitu eta eremu irekiko frogan gelditasuna handitu ditu. Ondorioz, tumoreak bide toxikoa aktibatu eta jokaera depresiboak areagotu dituela adierazten dute datuek.

Hitz gakoak: jokaera depresiboa, estresa, tumorea, serotonina, saguak.

Abstract

Depression is associated with both, cancer disease and social stress, but mechanisms underlying this relation are still inconclusive. Therefore, this study analyses the effects of tumor and stress on brain activity. OF1 male mice were inoculated with B16F10 melanoma tumor cells and a subgroup was exposed to social stress. Results indicate that tumor reduces brain serotonin level and rises neurotoxic 3-HK level. This effect is also seen in mice using passive coping strategy. Furthermore, tumor decreases the preference of sucrose and increases immobility in the open field test. This data indicate that the neurotoxic pathway of the kynurenine may be activated by tumor which could contribute to the appearance of depressive-like behaviour.

Keywords: depressive-like behavior, stress, tumor, serotonin, mice.

1. Sarrera eta motibazioa

XXI. mendeko buru nahasterik ohikoena depresioa da. Bizi erritmo frenetikoak eta gizarte eskakizun altuek depresio nahasteen areagotzea eragin dute herritarrengan. Osasunaren Munduko Erakundearen azken datuen arabera, 2015ean munduko biztanleriaren %4,4k depresio nahasteren bat zuen. Gainera, ugaritzen doan nahastea da, 2005etik %18,4 hazi baita prebalentzia eta datozen urteetan joerak gorantz jarraituko duela uste da. Ezintasun kasuei dagokienean, Europar bigarren postuan dago, eta Ameriketako dagoeneko lehenengo lekua hartu du (World Health Organization, 2017a).

Garai bereko gaitz bat aipatzekotan berriz, minbizia nabarmenduko genuke. Munduan hildako gehien eragiten dituen bigarren gaitza da. 2015ean 8,8 milioi heriotza eragin zituen, hau da, 6 heriotzatik 1 kantzerak eragin zuen. Gainera datozen bi hamarkadetan, kasu berrien kopurua %70 haziko omen da (World Health Organization, 2017b).

Bi nahasteek harreman estua dute. Hainbat ikerketen arabera, nahaste depresiboan prebalentzia hirukoitza da minbizia igaro duten gaixoetan (Linden, Vodermaier, Mackenzie eta Greig, 2012). Hori azaltzen duten hainbat aldagai daude. Alde batetik, ezin da ahaztu kantzer diagnosiak eragindako estres egoerak depresio jokabidea garatzeko aukerak areagotu egiten dituela, baina badira beste arrazoi biologiko batzuk. Kantzer gaixoei gaitza garatzeko beharrezkoak diren hanturazko zitokina maila altuak dituzte, eta horiek depresio nahasteetan duten garrantzia nabarmena da (Jehn et al., 2006). Horregatik, depresio nahasteen hanturazko hipotesia da gure aztergaia.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Depresioa nahasteak DSM-5 eskuliburuko kategoria nagusi bat osatzen dute, eta bertan, honako sintomak aipatzen dira diagnosia burutzeko: gogo aldarte deprimitua egunaren zati handienez, pisu galtze edo irabazte nabarmena, insomnioa edo hipersomnia, nekea edo energia galera, pentsatzeko eta arreta mantentzeko gaitasunen beherakada, plazeraren eta interesaren beherakada nabarmena (anhedonia), eta abar (American Psychiatric Association, 2013).

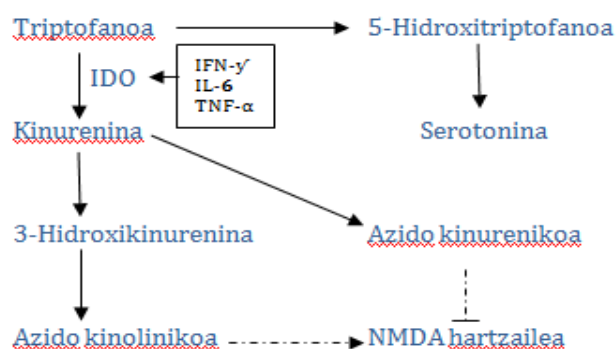
Azken hamarkadetan, depresioaren inguruko ikerketak ugaritu arren, nahastearen etiologiaren inguruko datuak osatugabeak dira oraindik. Hipotesi nagusienetarikoa bat, hanturazko hipotesia da (Maes, 1995), eta hanturazko zitokinek sintoma depresiboen garapena bultzatuko luketela dio. Zitokinek molekula mezulariak dira, gorputzeko periferian izandako hantura prozesuen inguruko informazioa garunera helarazten dutenak. Baina funtzio horrez gain, hainbat prozesu fisiologikotan eta neurokimikotan ere parte hartzen dute (Curf, Meis eta Hoogkamp-Korstanje, 1997).

Hainbat ikerketek hantura faktoreen eta depresioaren larritasunaren arteko korrelazioa antzeman dute (Hiles, Baker, Del Malmanche eta Attia, 2012). Gainera, hanturazko prozesuak garatzen dituzten gaitzek (minbiziak, besteak beste), depresio nahasteekin intzidentzia handiagoa dutela ikusi da (Evans et al., 2005). Estresaren eta depresioaren arteko harremana ere oso estua da, batez ere, estres soziala bada. Hainbat autorek diotenaren arabera estres egoeretan askatutako glukokortikoiden erregulazio okerra gauzatzean, depresio jokabidea eragingo luketen prozesu biologikoak areagotu egiten dira (Gómez-Lázaro et al., 2011). Hala ere, estres egoeren aurrean ez dugu denok berdin erantzuten, eta norbanakoen estrategia ezberdinek uste duguna baino zerikusi handiagoa izan dezakete gure garunean, estresak eragiten dituen ondorioak baldintzatu baititzakete (Bartolomucci et al., 2001).

Zitokinek bide ezberdinetatik eragin ditzakete jokabide aldaketak:

- Hipotalamo-Pituitario-Adrenal (HPA) ardatza: HPA ardatzaren jardura handia atzeman da depresio nahastea duten pertsonengan. Zitokinek ardatzaren aktibitatea handitu eta honen funtzionamendu okerra eragiten dute. Gainera, bertan jariatzen den kortikotropina askatzailearen hormona depresio nahasteekin erlazionatuta dago, eta antsietatea areagotzea, erantzuteko gaitasun murrizketa, alterazio psikomotorak, loan aldaketak, apetitu eta libido galerak, eta narriadura kognitiboa eragiten ditu (Gold eta Chrousos, 2002).
- Neurotransmisioa: depresioaren inguruko lehen ikerketek, depresioa setononina mailaren beherakadak eragiten zuela ondorioztatu zuten (Schildkraut, 1965). Aurrerago burututako beste ikerketak, ordea, neurotransmisore honen hartzaile eta garraiatzaileei egotzi zieten jokaera aldaketen ardura (Arango et al., 2001). Horien ondorioz, serotonina eta bere aurrendari den triptofanoaren maila baxuagoak atzeman dira depresioa nahastea duten pertsonengan (Maes eta Meltzer, 1995). Zitokinek eragin zuzena dute serotoninaren gutxitzean, molekula horiek indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) entzima aktibatuz (Dantzer et al., 2008), triptofanoa kinureninaren deribatueta degradatzea eragiten baitu (Widner, Ledochowski eta Fuchs, 2000). Hortaz, triptofano kopuru murriztagoa izango da serotonina sintetizatzeke, serotoninaren beheraka eraginez.
- Neurotoxizitatea: aurreko atalean aipatu bezala, zitokinek IDO aktibatzean kinureninaren deribatuen produkzioa areagotu egiten da. Bi dira kinureninaren deribatuak (Maes, Leonard, Myint, Kubera eta Verkerk, 2011): funtzio babeslea duen azido kinurenikoa eta neurotoxikoa den azido kinolinikoa. Azken honek garunaren neurodegenerazioan eragina du, jokabide aldaketak eraginez (Haroon, Raison eta Miller, 2012).

1.irudia. Triptofanoaren degradazio prozesuak. Iturburua: Jin eta Fall (2013).



Hanturazko zitokinen eta depresioaren arteko harremana baieztatzen duten datuak izan arren, depresioaren kontrako hainbat farmakok ez dute sustantzia hori ardatz hartzen. Norabide honetan esku hartuko luketen farmako berriak aurkitzeko zailtasun nagusia, zitokinek depresioa eragiteko dituzten prozeduren inguruko informazio osatua falta dela da. Hori dela eta, mekanismo hauen inguruko ikerketa gehiago behar lirateke.

2.1 Ikerketaren helburuak

Aurretikoak kontuan hartuta, ikerketa honek tumoreak eta estres sozialak depresio jokabidean dituzten eraginak aztertzea du helburu. Gainera, aldagai horiek garunean eragiten dituzten aldaketak eta hauek jarraituko duten bidea zehaztu nahi da. Horretarako, ondorengo helburu zehatzak landuko dira:

- Melanoma tumoreak (B16F10) eta estresak jokabide depresiboarengan dituzten ondorioak aztertzea. Jokabide depresiboa sakarosarekiko preferentzia testaren (Sucrose Preference Test: SPT), eremu irekiko frogaren (OFT: Open Field Test) eta behartutako igeriketa frogaren (Forced Swim Test: FST) bidez zehaztuko da.
- Zitokinek depresioan eragiteko erabiltzen dituzten mekanismoak aztertzea: horretarako, hipokanpoko eta nukleo estriatuko serotonina (5-HT), haren aurrendaria den triptofanoa (TRIP), eta hauen metabolitoak; azido 5-hidroxiindoleazetikoa (5-HIAA), kinurenina (KIN) eta 3-hidroxikinurenina (3-HK) zehaztea da helburua.
- Estres egoeran erabilitako estrategien arabera, bi talde osatzea: jokaera aktiboa edo pasiboa desberdinduz.
- Estrategia ezberdinen arabera, jokabide depresiboan eta garun aldaketetan dituzten desberdintasunak aztertzea.

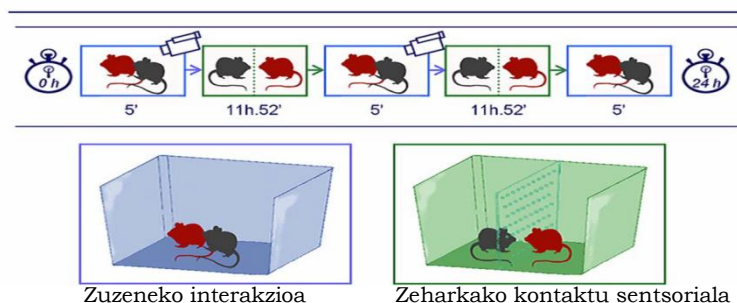
3. Ikerketaren muina

3.1 Ikerketaren diseinua

Ikerketa aurrera eramateko, honako esperimientua gauzatu zen:

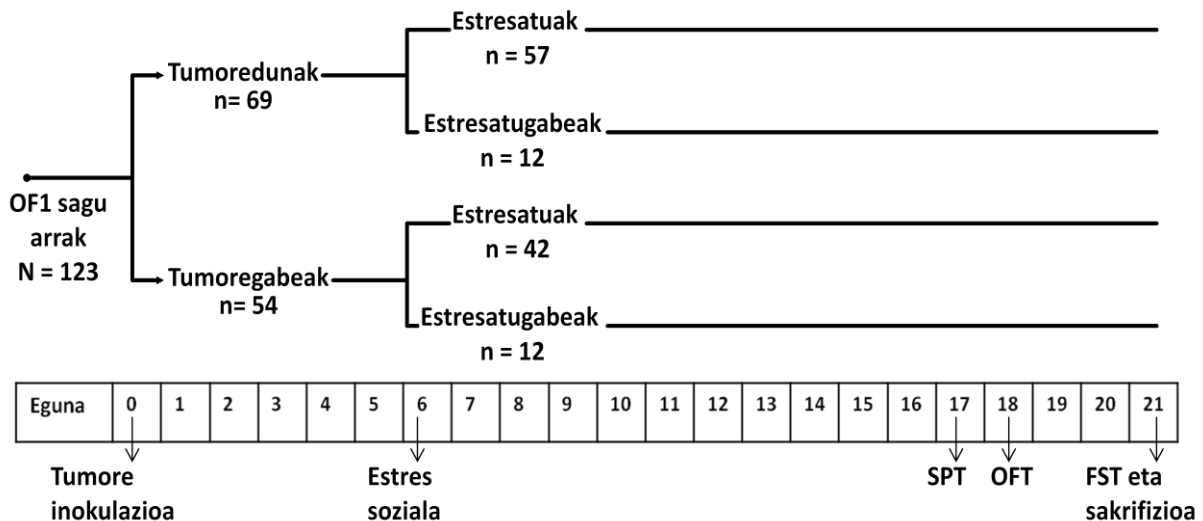
OF1 sagu arren talde bati B16F10 melanoma tumore zelulak inokulatu zitzaizkion eta 6 egun geroago, azpitalde bati estres soziala eragin zitzaion kontaktu sensorialaren eredu bidez. Horretarako, saguak agresibitate maila altuko beste sagu baten kaxan sartu ziren 24 orduz. Denbora horretan, zuzeneko interakzioa jasan zuten 5 minutuko 3 saiotan, eta saio batetik besterako tartean, eraso fisikoetatik babestuta egon ziren zulatutako metakrilatozko bereizle batekin, honek kontaktu sensoriala mantentzea ahalbidetu zuen. Gainera, saguen arteko elkarrekintzak grabatu ziren, haien jokabidea ebaluatu eta saguak talde aktibo edo pasiboetan sailkatzeko.

2.irudia. Sagui estres soziala eragiteko kontaktu sensorialaren eredua.



Inokulazio egunetik 17 egunera, jokabide depresiboa neurtzeko frogak hasi ziren. Lehenengo SPT froga pasa zitzaien, anhedonia maila neurtzeko. 24 orduz sakarosa eta ur botila batetik nahi adina edateko aukera izan zuten, eta epe horretan kontsumitutakoa neurtu zen. Hurrengo egunean, OF testaren bidez, eremu irekian esploratzen (mugimenduan) edo geldirik iragandako denbora neurtu zen, eta 21. egunean uretan igerian edo geldik iragandako denborak eskuratu ziren, FST frogaren bidez. Segidan, saguak sakrifikatu ziren, odola eta garuneko hipokampo eta nukleo estriatua eskuratzeko. Erresoluzio altuko kromatografia likido (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) bidez garuneko 5-HT, TRIP, 5-HIAA, KIN, 3-HK mailak neurtu ziren.

3.irudia. Ikerketaren kronograma.



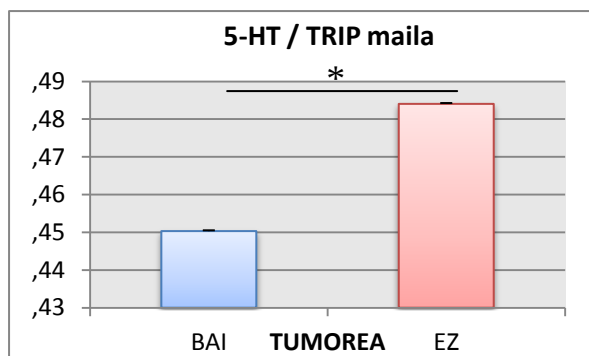
Emaizten analisi estatistikoak SPSS 22.0 edizioa erabiliz burutu ziren. $p < 0,05$ esangura-maila ezarri zen, eta analisiak 2 faktorezko ANOVA eta analisi unibariatu bidez gauzatu ziren.

3.2 Emaizak

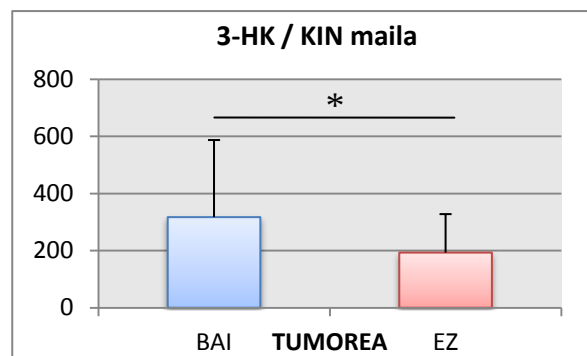
Tumorea inokulatu zitzaizen saguek 5-HT/TRIP ratio baxuagoa ($F=4,291$; $p=0,040$) eta 3-HK/KIN ratio altuagoa ($F=6,100$; $p=0,015$) zuten hipokanpoan.

Gainera estresaturiko saguen artean tumorea zutenek sakarosarekiko preferentzia baxuagoa ($F=5,147$; $p=0,026$) azaldu zuten. Ereku irekiko frogan berriz, estresa jasan ez zuten saguen artean tumoredunek denbora gehiago iragan zuten geldirik ($F=4,364$; $p=0,048$).

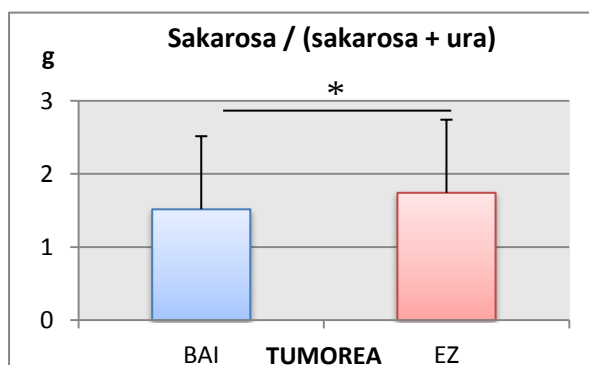
1.grafikoa. Hipokanpoko 5-HT/TRIP maila. * $p<0,05$.



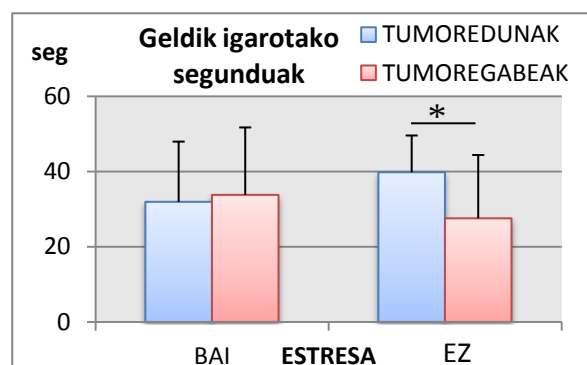
2.grafikoa. Hipokanpoko 3-HK/KIN maila. * $p<0,05$.



3.grafikoa. Sakarosarekiko preferentzia sagu estresatuetan. * $p<0,05$.

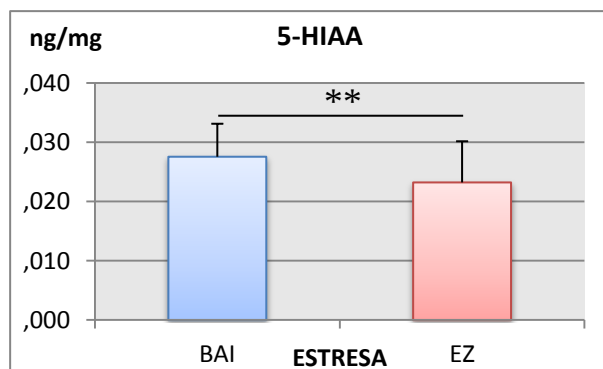


4.grafikoa. Ereku irekiko frogan geldirik igarotako denbora. * $p<0,05$.



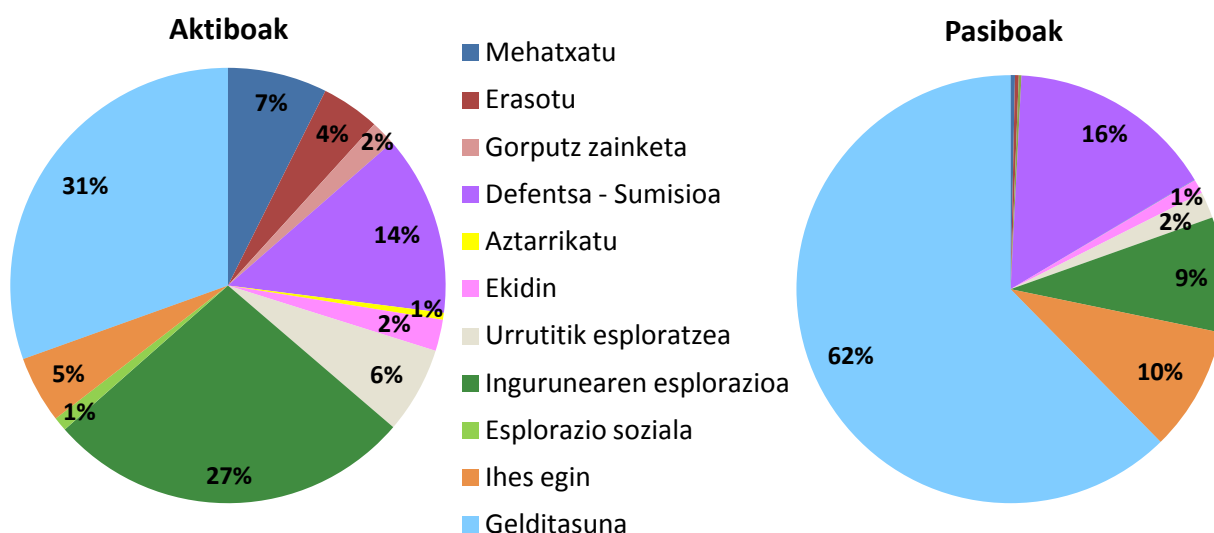
Estresak bere aldetik, hipokanpoko serotoninaren aktibitatean izan du eragina. Sagu estresatuak serotoninaren metabolito den 5-HIAA maila altuago zuten hipokanpoan ($F=11,305$; $p=0,001$).

5.grafikoa. Hipokanpoko 5-HIAA maila. $**p<0,001$.



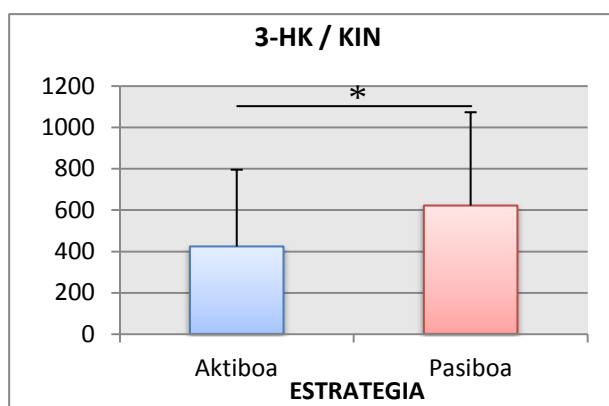
Estresaren aurrean erabilitako estrategien arabera bi talde osatu ziren. Ingurunea gehiago esploratu eta aurkaria gehiago mehatxatu zuten saguek talde aktiboa osatu zuten, talde pasiboa aldiz, geldik eta defentsa–sumisio jokaeretan denbora gehiago iragan zuten saguez osatu zen.

6. eta 7. grafikoak. Sagu aktibo eta pasiboen jokaerak ehunekotan.



Estresari aurre egiteko estrategien artean ere desberdintasun esanguratsuak aurkitu ziren. Hala, sagu pasiboek nukleo estriatuan 3-HK/KIN ratio altuagoa ($F=5,789$; $p=0,017$) zuten sagu aktiboekin alderatuz.

8.grafikoa. Estriatuko 3-HK/KIN maila. $*p<0,05$



4. Ondorioak

Emaitzen arabera, tumoreak aldaketak eragingo lituzke serotoninaren sintesian. Tumoredun saguek triptofano gutxiago erabili dute hipokanpoan serotoninaren sintesirako, eta honen azalpena triptofanoa kinureninaren bidetik degradatu izana litzateke. Gainera, ondorengo emaitzek hipotesi hau indartuko lukete. Tumoredun subjektuek tumoregabeek baino azido kinolinikoaren aurrendari den 3-HK maila altuagoa dutenez, tumoreak kinureninaren bide toxikoa aktibatu duela ondoriozta genezake. Eskuratutako emaitzek bide hori iradokitzen duten arren, azido kinolinikoaren inguruko datuak beharko genituzke hipotesia baieztatzeko. Jokaerari dagokionez, aldaketa biologikoek jokabide depresiboaren ezaugarri diren jokamoldeak bultzatu dituztela esan genezake. Alde batetik, tumoredun saguek anhedoniaren sintoma litzatekeen sakarosarekiko preferentzia txikiagoa azaldu dute, eta bestetik, estresaturik ez zeuden subjektuen artean, tumoredunek denbora gehiago igaro dute geldirik. Hortaz, tumoredun saguek depresioaren sintoma diren jokabide gehiago azaldu dituzte.

Estresak berriz, hipokanpoko serotoninaren metabolitoen (5-HIAA) maila handitu duenez, bertan serotonina aktibitatea areagotu egin duela esan genezake. Estresak berak, aldiz, ez du jokaera mailan aldaketarik eragin, baina estresaren aurrean izandako jokaerak, hau da, sagu aktibo edo pasibo izateak, eragina izan du estriatuko 3-HK/KIN ratioan. Sagu pasiboek 3-HK maila altuagoa azaldu dute KIN mailarekiko, eta horrek, tumoreak bezala, estrategia pasiboa izateak bide toxikoa aktibatu duela adierazten du. Hortaz, jokaera aktiboagoak garunean neurotoxizitate maila baxuagoa izatea eragingo luke.

5. Etorkizunerako planteatzan den norabidea

Tumore zein estresak garunean eragindako aldaketa batzuk aztertu ostean, garuneko estruktura hauetan eta odolean zitokina mailak zehaztea da hurrengo urratsa, datorren hilabeteetan burutuko duguna. Horrekin, zitokinek garunean zein jokabidean ikusitako aldaketekin duten erlazioa aztertu ahal izango dugu.

Gainera, tumorea garunean aldaketa neurokimikoak eta jokaera mailako aldaketak eragiteko gai den arren, minbizia duten guztiek ez dute depresio nahastea garatzen. Hortaz, gaixotasuna izanda ere, subjektuen arteko desberdintasunek depresio jokaerak garatzea edo ez garatzea eragin dezakete. Hori horrela izanik, subjektuen banakotasunak jokaera depresiboaren garapenean duen eraginean sakontzea litzateke beste urrats garrantzitsu bat. Hau da, buru nahasteak garatzeko aukerak areagotzea edo murriztea zein ezaugarri eragingo luketen aztertzea.

6. Erreferentziak

- American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. (DSM-5®) American Psychiatric Pub.
- Arango, V., Underwood, M. D., Boldrini, M., Tamir, H., Kassir, S. A., Hsiung, S., eta Mann, J. J. (2001). Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology*, 25(6), 892-903.
- Bartolomucci, A., Palanza, P., Gaspani, L., Limioli, E., Panerai, A.E., Ceresini, G., et al., 2001. Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependent. *Physiol. Behav.* 73, 401–410.
- Curfs, J. H., Meis, J. F., eta Hoogkamp-Korstanje, J. A. (1997). A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 742-780.
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., eta Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1), 46-56.
- Evans, D. L., Charney, D. S., Lewis, L., Golden, R. N., Gorman, J. M., Krishnan, K. R. R., . . . Coyne, J. C. (2005). Mood disorders in the medically ill: Scientific review and recommendations. *Biological Psychiatry*, 58(3), 175-189.
- Gold, P., eta Chrousos, G. (2002). Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: High vs low CRH/NE states. *Molecular Psychiatry*, 7(3), 254-275.
- Gómez-Lázaro, E., Arregi, A., Beitia, G., Vegas, O., Azpiroz, A., & Garmendia, L. (2011). Individual differences in chronically defeated male mice: Behavioral, endocrine, immune, and neurotrophic changes as markers of vulnerability to the effects of stress. *Stress*, 14(5), 537-548.
- Haroon, E., Raison, C. L., & Miller, A. H. (2012). Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: Translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 137-162.

- Hiles, S. A., Baker, A. L., de Malmanche, T., eta Attia, J. (2012). A meta-analysis of differences in IL-6 and IL-10 between people with and without depression: Exploring the causes of heterogeneity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(7), 1180-1188.
- Jehn, C. F., Kuehnhardt, D., Bartholomae, A., Pfeiffer, S., Krebs, M., Regierer, A. C., . . . Flath, B. C. (2006). Biomarkers of depression in cancer patients. *Cancer*, 107(11), 2723-2729.
- Jin, C. eta Fall, D.J. (2013). Neuroimmunology: A comprehensive Strategy for Assessment of Patients with Sickness Behaviors. *BA, NeuroScience Inc.*
- Linden, W., Vodermaier, A., MacKenzie, R., eta Greig, D. (2012). Anxiety and depression after cancer diagnosis: Prevalence rates by cancer type, gender, and age. *Journal of Affective Disorders*, 141(2), 343-351.
- Maes, M. (1995). Evidence for an immune response in major depression: A review and hypothesis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 19(1), 11-38.
- Maes, M., Leonard, B., Myint, A., Kubera, M., eta Verkerk, R. (2011). The new '5-HT' hypothesis of depression: Cell-mediated immune activation induces indoleamine 2, 3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(3), 702-721.
- Maes, M., eta Meltzer, H. (1995). The serotonin hypothesis of major depression. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, 10, 933-934.
- Schildkraut, J. J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *American Journal of Psychiatry*, 122(5), 509-522.
- Widner, B., Ledochowski, M., eta Fuchs, D. (2000). Interferon gamma induced tryptophan degradation neuropsychiatric and immunological consequences. *Current Drug Metabolism*, 1(2), 193-204.
- World Health Organization. (2017a). *Depression and Other Common Mental Disorders. Global Health Estimates*. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- World Health Organization. (2017b). *Cancer*. WHO 2017. [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/]

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzaren Ikertzaileak Prestatzeko Doktoretza-aurreko bekari (PRE_2015_1_0085) eta Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioaren proiektuari (PSI2015-63658-R) esker burutu da. Egileek UPV/EHU-ko SGikerren giza babes eta teknika eskertzen dute.

Ikerkuntza lagundu duten Garikoitz Beitia, Eneritz Gómez-Lázaro, Arantxa Azpiroz, Amaia Arregi eta Joana Pérez-Tejadari gure eskerrik beroenak.

Venlafaxinaren eragina ezegonkortasun sozial kronikoa jasandako sagu emeen sistema serotoninergiko zentrolean eta jokabidean

Ainitze Labaka, Eneritz Gómez-Lázaro, Olatz Goñi-Balentziaga, eta Larraitx Garmendia.
Oinarrizko prozesu psikologikoak eta haien garapena, Psikologia fakultatea EHU, Donostia.
ainitze.labaca@ehu.eus

Laburpena

Bi bider ohikoagoa da depresio diagnosia emakumeetan gizonezkoetan baino, eta ondorioz, baita farmako antidepresiboen erabilera ere. Hala ere, estresarekin lotutako nahasteen eta haien tratamenduaren inguruko ikerketa gehienak animalia arretan egiten dira, eta ikerketetako emaitzak gizon nahiz emakumeetara orokortu gero. Ildo horretatik, antsietate eta depresioaren aurkako tratamenduen eraginkortasuna sexuaren arabera da, berezitasun biologikoak izaki. Hori dela eta, lan honek ezegonkortasun sozial kronikoaren estresa bizi duten sagu emeen jokabidean eta garuneko bide serotoninergikoan venlafaxinak –serotonina eta noradrenalinaren birkaptazioaren inhibitzailea– duen eragina du aztergai.

Hitz gakoak: emeak, estresa, jokabidea, venlafaxina, antsietatea, depresioa.

Abstract

Women are twice as likely as men to develop depression, being the population that receives antidepressant treatment more frequently. This sexual disparity is also observable in effectiveness of treatments. Despite this fact, most of studies that have used animal models for determinate the physiological mechanisms implicated in depression and to develop specific drugs for their treatment have been performed in males. The aim of this study was to analyze the effects of the serotoninine and noradrenaline reuptake inhibitor venlafaxine in behavioral and central serotoninergic pathway of female mice subjected to chronic social instability stress.

Key words: female, stress, behavior, venlafaxine, anxiety, depression

1. Sarrera eta motibazioa

Emakumeen depresio prebalentzia tasa bikoitzari entzungor eginez, gaiaren inguruko ikerlanen ia %60 animalia arreakin soilik egiten da (Johnson et al., 2014). Beste horrenbeste gertatzen da biomedikuntzako beste alorrekin; Medline datu basean egindako lan baten arabera, 2010 eta 2011ean publikaturiko 443 artikulutatik %28ak soilik erabili zituen sagu emeak eta 2015ean minari buruzko Pain aldizkarian argitaratutako 71 artikulutatik 56k ez zuen emerik erabili (Mogil, 2016). Baina ar eta emeen fisiologia ezberdina da, eta arretan jasotako emaitzak emakumei orokortzeko praktika zabal hori medio, emakumeek farmakoen ondorio kaltegarriak jasateko %50-75 arrisku handiagoa dute (Shah, McCormack, eta Bradbury, 2014).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Estresari lotutako nahasteak animalia eredu bidez luze ikertu badira ere, datu gutxi dago egun emeen inguruan. Baliteke hutsune horrek ziklo estralari egotzitako aldakortasunarekin zerikusia izatea (Prendergast, Onishi, eta Zucker, 2014), edota emeean estres soziala aplikatzeko prozedura finkaturik ez dagoelako izatea. Izan ere, sagu emeak ez dira territorialak, eta arretan estres soziala eragiteko baliagarri diren lehiakortasun territorialaren prozedurek ez dute emeean estres erantzuna pizten. Ildo horretatik, Herzog eta lankideek (2009) arratoietan eta Schmidt eta lankideek (2010) saguetan proposatutako ezegonkortasun sozial kronikoaren estres ereduak egokiagoa dirudi sagu emeentzat.

Bestetik, neurotransmisioak depresioan duen eragina kontuan izanda, ikerlan askok serotoninaren (5HT) gutxiegitasuna azpimarratu dute estresaren ondorio eta jokabide depresiboaren bitartekari gisa (Hirschfeld, 2000). Hala ere, oraindik argitzeke dago nola

erantzuten duen neurotransmisore honek jokabidea modulatzeko duten egitura ezberdinetan estresaren aurrean. Era berean, serotonina birkaptazioaren inhibitzaileak depresioaren aurka eraginkorrak direla ikusi bada ere, eragin hori ezberdina izan daiteke dosiaren, sexuaren eta aztertutako egitura eta jokabideen arabera (Xing et al., 2013).

Hori guztia dela eta, lan honek bi helburu nagusi ditu:

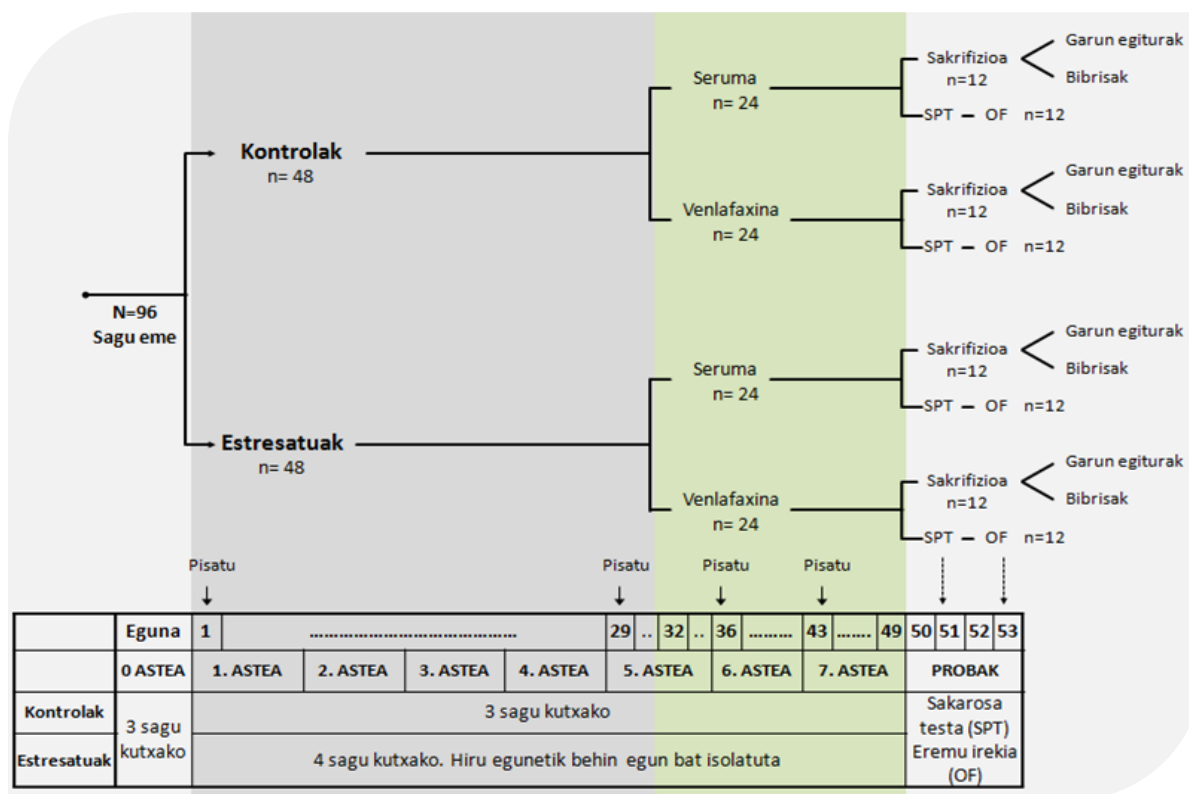
Batetik, ezegonkortasun sozial kronikoaren estresak sagu emeen gorputz pisuan, aktibitate serotonergiko zentrolean (5HT eta bere 5HIAA metabolitoan) eta jokabidean sortzen dituen aldaketak aztertzea.

Bestetik, asaldura horiek venlafaxina farmako antidepressiboarekin hobera egiten duten behatzea.

3. Ikerketaren muina

3.1 Diseinu esperimental

Laurogeita hamasei sagu eme hirunaka jarri genituen astebetez laborategiko baldintzetara ohi zitezten. Ondoren, saguen erdiak (n=48) hirunaka jarraitu zuen kontrol taldea osatzeko eta beste erdiari (n=48) ezegonkortasun sozial kronikoa aplikatu zitzaion: Hiru egunez saguak launaka jarri ziren, eta laugarrenean isolatuta, eta horrela behin eta berriz. Launaka jartzen diren bakoitzean, ezezagunak zaizkien kutxakideak egokitzen zaizkie. Era honetan, emeek ezin dute sare sozial egonkor bat osatu. Ondoren 32. egunetik hasita, kontrol zein estresatuaren erdiari (n=24) venlafaxina farmakoa txertatu zitzaion (20 mg/kg, peritonio barnean) egunero hiru astez, eta beste erdiari serum fisiologikoa. Azkenik, azpitalde bakoitzeko 12na saguk jokabide testak egin zituen eta gainerakoak parametro biologikoak neurtzeko sakrifikatu ziren (1. Irudia).



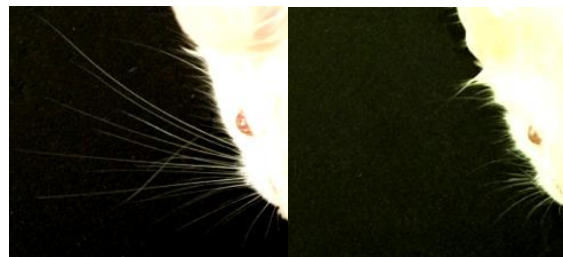
1. irudia. Animalien ongizaterako Euskal Herriko Unibertsitateko Batzorde Etikoaren (CEBA) onespenu du esperimentu honek.

3.2 Jokabide probak

Hiru jokabide mota aztertu ziren esperimentu honetan. Lehenik, anhedonia jokabidea behatu zen. Anhedonia plazera sentitu ezinari deritzo, berez atseingarri diren estimuluaren aurrean jazotako interes ezari. Depresio sintomatizat jotzen da, eta animalietan sakarosen lehenestea (sucrose preference test, SPT) behatuz aztertzen da. Saguei bi edalontzi jartzen zaizkie aukeran, bata azukredun urarekin eta bestea ur hutsarekin. Depresio zantzua duten saguek gutxiago edan ohi dute ur gozotik.

Bigarrenik, *barbering* jokabidea aztertu zen. Jokabide honek saguek bata bestearen muturreko bibrisak hortzekin moztean datza. Saguen muturreko bibote edo bibrisek berebiziko garrantzia dute saguen bizirauteko, haien bidez inguruko bibrazioak jaso eta inguruko informazioa jasotzen baitute. Barbering jokabidea antsietatearekin eta hierarkia soziala finkatzeko lehiarekin erlazionatu da sagu emeean.

Hirugarrenik, eremu irekiko proban (open field, OF) saguek kutxa zabal batean gauzatutako lokomozioa neurtzen da. Froga honetan, ibilgetasuna depresioarekin lotu izan da, eta kutxako ertzetan soilik ibiltzea antsietatearekin.



2. irudia. Ezkerrean, bibrisak osorik dituen sagua. Eskubian, bibrisak moztu dizkieten sagua.

3.3 Analisi estatistikoak

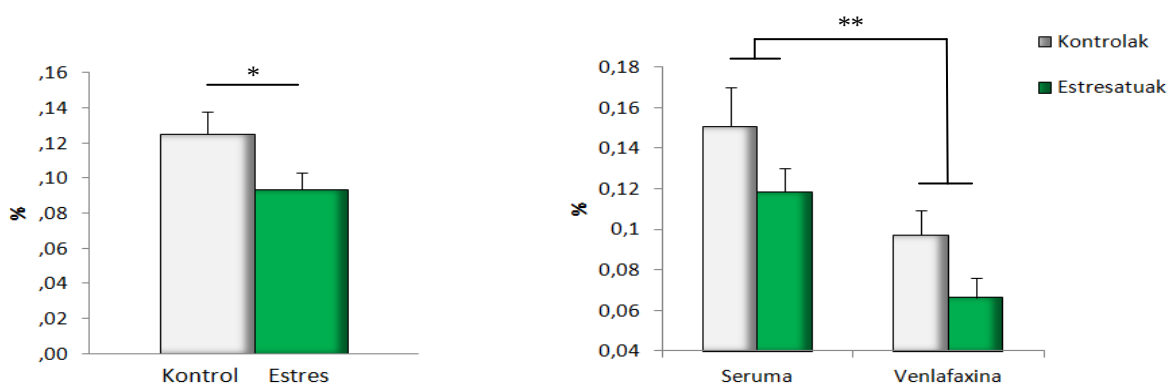
Analisi estatistiko guztiak Windowsentzako SPSS 22 erabiliz egin ziren eta esanguramaila gisa $p < 0.05$ ean finkatu zen ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$). Aldagai biologikoak eta jokabide aldagaiak aztertzeko bi faktoreko ANOVA erabili zen, eta elkarrekin kasuetan Post hoc testa, Bonferroniaren irizpideari jarraiki. Bibrisen analisia egiteko, kontingentzia taulak erabili ziren eta gorputz pisuaren bilakaera aztertzeko lagin errepikatuen froga.

3.4 Emaitzak

3.4.1 Estresa eta venlafaxinaren eragina jokabidean

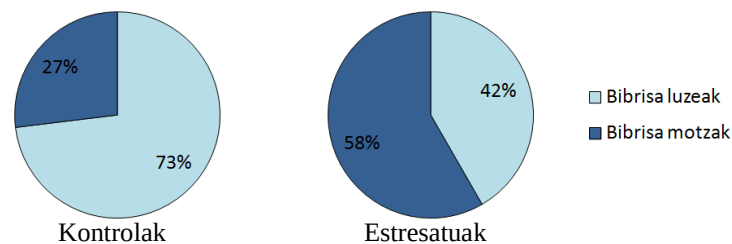
Analisi unibarianteak erakutsi zuenez, ez zen *estresa* eta *farmakoa* faktoreek eragin esanguratsua izan zuten SPT frogako sakarosa kontsumoan. Batetik, estresatutako saguek sakarosa gutxiago edan zuten kontrolek baino ($F_{[1,43]}=4.64$; $p=0,037$), eta bestetik, serum fisiologikoa emandakoek Venlafaxina antidepresiboa administratutakoek baina gehiago ($F_{[1,43]}=13.76$; $p=0,001$). Ez zen elkarrekin aurkitu bi faktoreen artean.

1. Grafikoa. Sakarosa kontsumoa gorputz pisuarekiko proportzioan estres taldearen eta farmako taldearen arabera



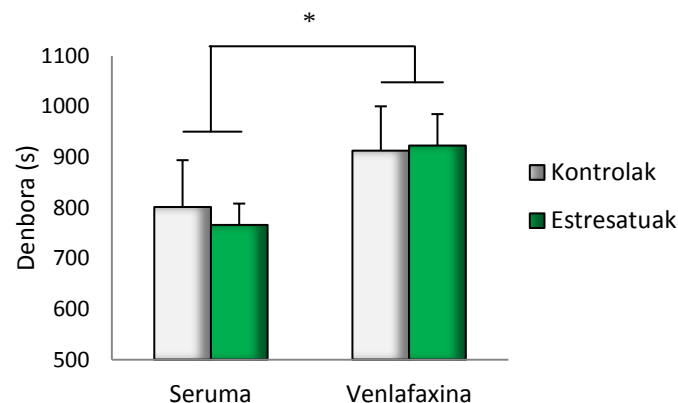
Barbering jokabidea aztertzerakoan, estresatutako taldean aurkitutako bibrisa motz portzentajea kontrolatan aurkitutakoa baino handiagoa zela ikusi zen (*Fisherren test* zehatza, $p=0,044$). Venlafaxinak ez zuen eraginik izan jokabide honetan.

2. Grafikoa. Bibrisa luze eta motzen portzentajea estres eta kontrol taldeen barruan.



Eremu irekiko probari dagokionean, ez zen ezberdintasunik ageri ibilge iragandako denboran, ez eta saguek ibilitako distantzian ere. Hala ere, eta estresak ezberdintasun esanguratsurik eragin ez bazuen ere, farmakoak saguek eremuaren erdialdean denbora gehiago pasa zezaten eragin zuen ($F_{[1,47]}=4.32; p=0,04$).

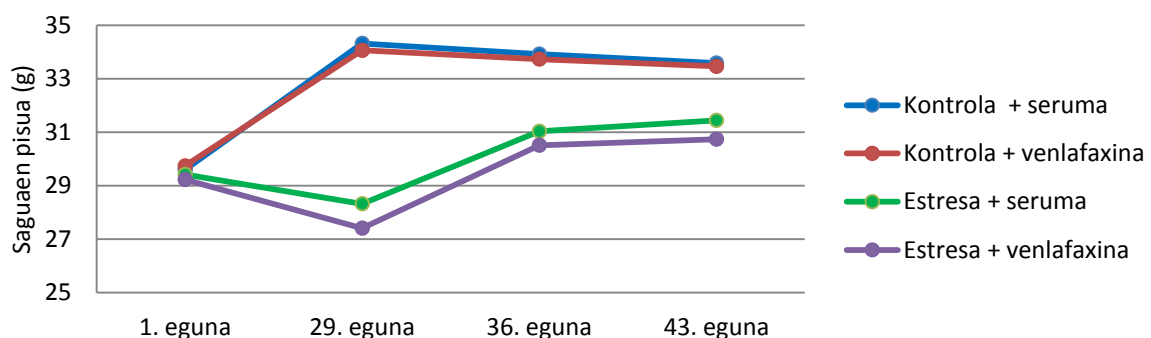
3. Grafikoa. Venlafaxinaren eragina eremu irekiko testean kaxako erdialdean iragandako denboran.



3.4.2 Estresaren eragina gorputz pisuan

Lan honetan, estresak saguek behar beste pisu ez irabaztea eragin zuen. Lagin errepikatuentzako frogak adierazi zuenez, sagu estresatuak ez zuten kontrolek bezain beste pisu irabazi denboran zehar ($F_{[1,94]}=58.34; p=0.000$). Venlafaxinak ez zuen aldaketarik eragin gorputz pisuan.

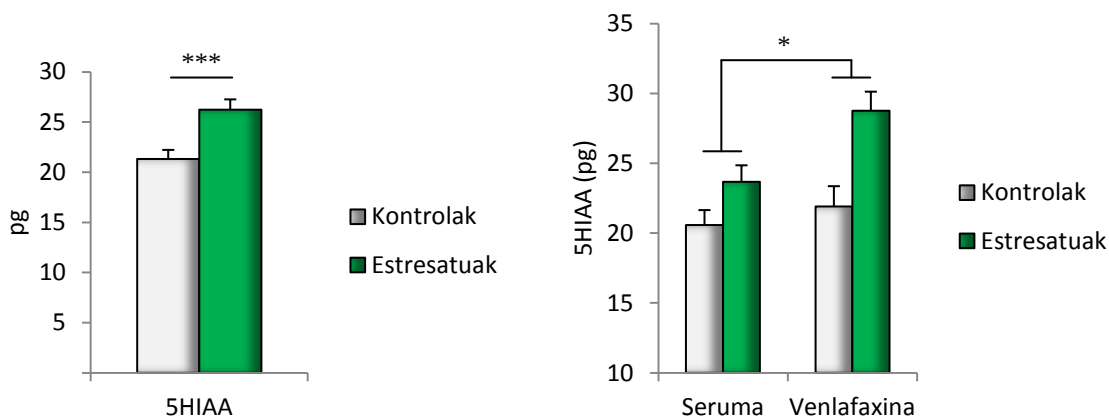
4. Grafikoa. Saguen pisuaren bilakaera egoera basaletik hasi eta esperimentua amaitu artean.



3.4.3 Bide serotoninergikoa kortex prefrontalean

Kortex prefrontaleko 5HIAAri dagokionean, analisi unibarianteak erakutsi zuen *estresa* eta *farmakoa* faktoreek kortex prefrontaleko 5HIAA mailan eragina izan zutela. Estresak 5HIAA maila areagotu zuen ($F_{[1,47]}=14.88; p=0.000$), eta venlafaxinak ere norabide berean eragin zuen igoera ($F_{[1,47]}=4.32; p=0.017$). Hala ere, ez zen bi faktoreen arteko elkarreaginik aurkitu.

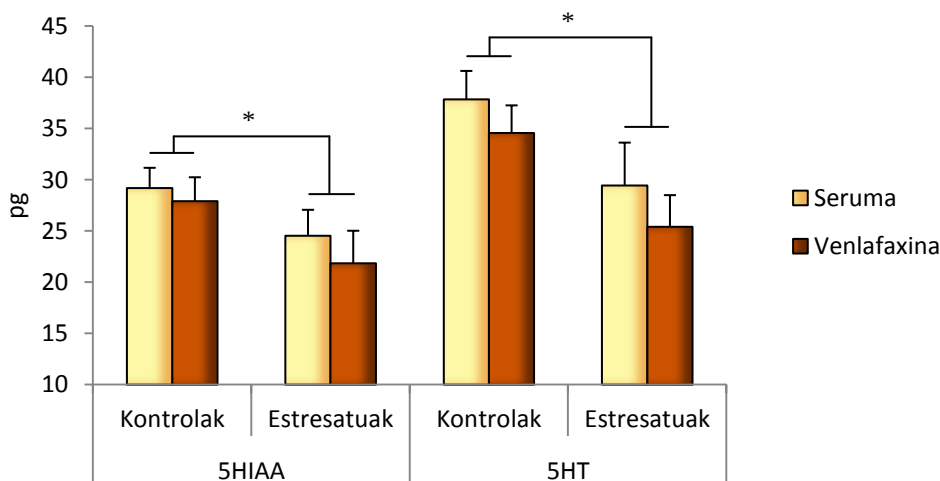
5. Grafikoa. Estresa eta venlafaxinaren eragina kortex prefrontaleko 5HIAA mailetan.



3.4.4 Bide serotoninergikoa hipokanpokoan

Analisi unibarianteak adierazi zuenez, estresak hipokanpoko 5HIAA maila ($F_{[1,49]}=4.44; p=0.042$) eta 5HT maila murriztu zituen ($F_{[1,49]}=6.8; p=0.012$). Venlafaxinak ez zuen eraginik izan hipokanpoko bide serotoninergikoan, eta *estresa* eta *farmakoa* faktoreek ez zuen elkarreaginik erakutsi.

6. Grafikoa. Estresaren eragina hipokanpoko 5HIAA eta 5HT mailetan.



4. Ondorioak

Emaitzei erreparatuta, ezegonkortasun sozial kronikoaren estresak sagu emeetan antxietate-depresio zantzuko sintomak eragin dituela esan dezakegu: SPTn nabarmendutako anhedonia batetik eta *barbering* jokabidea areagotzea bestetik. Bestalde, OF proban estresatu eta kontrolen artan alderik nabarmendu ez bada ere, litekeena da OF prozedura emeetan aldaketak igartzeko aproposa ez izatea (Kokras eta Dalla, 2014; Simpson eta Kelly, 2012). Izan ere, proba hori sagu arrentzako sortu zen, eta sagu emeen lokomozioa azkarragoa eta luzeagoa dela ikusi da. Hots, baliteke emeetan zehaztasuna lortzeko proba eremu handiagoan edota denbora luzeagoan egin behar izatea. Gorputz pisuan ere eragin du estresak. Esperimentua hasi aurretik sujetu guztien

pisua antzerakoa bazen ere, esperimentuan zehar estresatutakoek pisua galdu dute eta ostera pisua hartzen hasi badira ere, ez dute kontrolek adina irabazi. Aktibitate serotoninergikoaren inguruan, estresatuen hipokanpoan aurkitutako 5HT maila baxuak bat datoz depresioaren hipotesi monoaminergikoarekin. Era berean, hipokanpoko 5HIAA metabolito maila txikiagoek estresatuetan serotonina eskasia adieraz dezake. Hala ere ikerketa sakonagoa behar litzake urritasun hori triptofano aitzindaritik 5HT gutxi sintetizatu delako edo 5HIAAren bidetik asko metabolizatu delako gertatu den jakiteko. Kortex prefrontalean aldiz, 5HIAA gehiago ageri dute estresatuek, nahiz eta 5HTn ezberdintasunik ez egon. Horrek, egitura honetan estresatuek kontrolek baino aktibitate serotoninergiko handiagoa dutela iradokitzen du.

Venlafaxinari dagokionean, ez du kasu guztietan esperotako emaitza eman. Ez du estresaren eraginik lehengoratu jokabide probetan, eta gainera, badirudi venlafaxinak berak anhedonia eragin duela bere kaxa. OF proban aldiz, badirudi efektu antsiolitikoa izan duela farmakoak, saguak kaxaren ertzetan ezkutuan ibili beharrean eremu erdialdean denbora gehiago pasa baitute. Gorputz pisuari dagokionean, venlafaxinak ez du inolako eraginik erakutsi, bai ordea kortex prefrontaleko 5HIAA mailan, metabolito maila handiagoak baitituzte farmakoa jasotakoek. Azken emaitza hau tentuz hartu beharrekoa da, baliteke eta estresak eragindako 5HIAA iguera aldagai honetan eragiten egotea.

Azpimarratzekoa da analisiek ez dutela aldagai bakar batean ere *estresa* eta *farmakoa* faktoreen arteko elkarreraginik antzeman. Emaiza hau sujetu gehiago izanez gero aldatuko litzake agian. Bestalde, baliteke venlafaxinak sintoma depresiboekiko duen efektua emean espero bezain zehatza ez izatea.

Laburbilduz, estres eredia baliagarria izan da antsietate-depresio antzerako sintomak eragiteko. Venlafaxinak ordea, partzialki soilik lortu du sintoma horiek leheneratzea.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Estresak eta venlafaxinak 5HTn eta 5HIAAn izan duten eragina ikusita, interesgarria litzake bide serotoninergikoaren ikuspegi zabalago bat lortzea, 5HTren aitzindari den triptofanoa eta 5HIAAren ondorengo metabolitoak 3-hidroxikinurenina eta azido kinurenikoa neurtuz. Sistema immunitarioa aztertzeak ere patofisiologiaren ikuspegi zabalagoa izaten lagunduko luke.

Bestalde, emeen aldaketa biologikoak antzemateko prozedura zehatzagoak garatzeko beharra ere badago.

6. Erreferentziak

- Herzog, C. J., Czéh, B., Corbach, S., Wuttke, W., Schulte-Herbrüggen, O., Hellweg, R., ... Fuchs, E. (2009). Chronic social instability stress in female rats: A potential animal model for female depression. *Neuroscience*, 159(3), 982–992.
- Hirschfeld, R. M. (2000). History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 61 Suppl 6, 4–6.
- Kokras, N., & Dalla, C. (2014). *Sex Differences in Animal Models of Psychiatric Disorders*. *British journal of pharmacology*.
- Mogil, J. S. (2016). Perspective: Equality need not be painful. *Nature*, 535(7611), S7–S7.
- Paula A. Johnson, Fitzgerald, T., Salganicoff, A., Wood, S. F., & Goldstein, J. M. (2014). *Why Women 's Health Can 't Wait*. Brigham and Women's Hospital.
- Prendergast, B. J., Onishi, K. G., & Zucker, I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 40, 1–5.
- Schmidt, M. V, Scharf, S. H., Liebl, C., Harbich, D., Mayer, B., Holsboer, F., & Müller, M. B. (2010). A novel chronic social stress paradigm in female mice. *Hormones and Behavior*, 57(4-5), 415–20.
- Shah, K., McCormack, C. E., & Bradbury, N. A. (2014). Do you know the sex of your cells? *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 306(1), C3–18.
- Simpson, J., & Kelly, J. P. (2012). An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. *Behavioural Brain Research*, 229(1), 289–300.

Xing, Y., He, J., Hou, J., Lin, F., Tian, J., & Kurihara, H. (2013). Gender differences in CMS and the effects of antidepressant venlafaxine in rats. *Neurochemistry International*, 63(6), 570–5.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzaren Ikertzaileak Prestatzeko 2014ko Doktoretza-aurreko bekari eta Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioaren proiektuari (PSI2015-63658-R) esker burutu da.

Egileek UPV/EHUko SGikerren giza babesa eta teknika eskertzen dute

Eskerrik asko Joxeba Lizeaga Arostegi ingeniari eta lagunari, ezegonkortasun sozial kronikoan taldekatzerakoan subjektuak birritan elkarrekin ez egokitze diseinatutako konbinazioengatik.

TRPV1-KO saguek epilepsia krisi arinagoak jasatearen zergatiak bilatzen

Egaña-Huguet, Jon ^{1,2}; Rico-Barrio, Irantzu ^{1,2}; Terradillos, Itziar ^{1,2}; Mendizabal-Zubiaga, Juan Luis ^{1,2}; Puente, Nagore ^{1,2}; Gerrikagoitia, Inmaculada ^{1,2}; Elezgarai, Izaskun ^{1,2}; Grandes, Pedro ^{1,2}.

¹ Medikuntza eta Erizaintza fakultatea UPV/EHU, E-48940 Leioa, ²Achucarro Basque Center for Neuroscience, Bizkaiko zientzia eta teknologia parkea, 205. eraikuntza, Zamudio.

Jon.egana@ehu.eus

Laburpena

CB1 hartzailak sinapsi kitzikatzailetan glutamatoaren askapena erregulatzen du eta honek epilepsia gaixotasuna pairatzen duten zirkuitu neuronaletan babes funtzio bat bete dezakeela pentsatzen da. Kainato bitartez induzitutako epilepsia krisiak behatzean ikusi da TRPV1-KO saguek pairatzen duten status epilepticus-a jatorrizko saguek pairatzen dutena baino arinagoa dela. Ebidentzia hori oinarri harturik, lan honetan sagu hauetan sistema endokannabinoidearengan gertatzen diren egokitzapen aldaketak aztertu dira.

Hitz gakoak: CB1-TRPV1-KO-hipokanpoa-epilepsia

Abstract

The endocannabinoid type 1 receptor (CB1) regulates glutamate release to control the excitatory synaptic transmission playing a protective role in the modulation of neuronal circuits affected by the epileptic seizures. We have observed that seizures assessed by behavioural score were milder in TRPV1-KO than in WT mice subjected to the kainate-induced status epilepticus model. As so the aim of this study is to clarify the adaptative changes underlying these phenomena.

Key word: CB1-TRPV1-KO-hippocampus-epilepsy

Sarrera/ Momentuko egoera:

Jakina da marihuana landareak erabilera ludikoa izateaz gain, terapeutikoki ere oso eraginkorra izan daitekeela. Horregatik, azken urteetan gora egin dute landare honekin eta bere inguruarekin zerikusia duten ikerketek. Ikerketa hauek batetik, landareak terapeutikan izan dezakeen boterea aztertzen dihardute, ekoizten dituen kannabinoideak eta euron deribatuak ikertuz gure onurarako izan daitezkeen medikamendu berriak garatzeko. Eta bestetik, zenbait ikerketa, marihuana landareak gure gorputzean aktibatzen duen sistema endokannabinoidea, hau da, gizakian endogenoa den kannabinoide sistema aztertzen dabiltza. Sistema hau ez da soilik gizakietan agertzen, beste hainbat bizidunetan, bai ugaztun zein arrainetan, aurkitu daiteke eta bere eginkizun bakarra ez da marihuana landarearen osagai aktiboa den α -THC-aren ekintza ahalbidetzea, izan ere, nerbio sisteman dagoen sistema modulatzailer nagusietako bat da frogatuta dauden beste funtzio batzuen artean. Hots, sistema honen bitartez neuronan aktibitatea kontrolatzen da. Gehiegizko aktibitate kitzikatzailer gertatuz gero kalte eta heriotza neuronala ematen dira toxikotasun mekanismoen ondorioz (Zhang et al. 2015). Gehiegizko kitzikapen hori gertatzen denean, sistema hau martxan jartzen da eta gehiegizko aktibitate hori eten dezake, horregatik esan daiteke sistema honek funtzio neurobabeslea duela (Monory et al. 2006). Adibidez azido kainikoaren bitartez eragindako krisi epileptikoetan anandamida

endokannabinoidearen produkzioa areagotzen da hipokanpoan, ondorioz CB1 hartzailearen aktibazioa eragiten da gehiegizko aktibazioaren aurka babesteko (Marsicano et al., 2003).

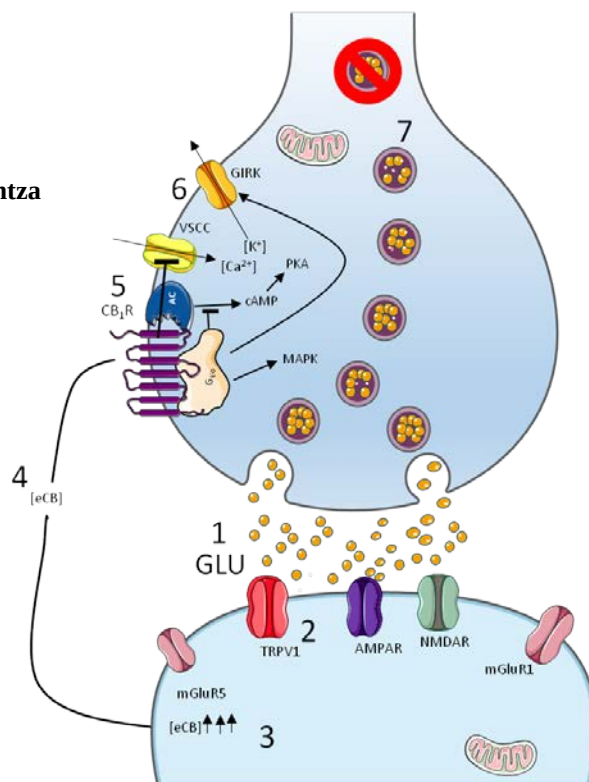
Endokannabinoide sistemaren barne hainbat osagai aurki ditzakegu. Lehenik, endokannabinoide nagusienak, batetik arakidonil-etanol-amina (AEA) daukagu, anandamida izenaz ezaguna dena, eta bestetik 2-arakidonil-glizerola (2-AG). Hauek sintetizatu eta degradatzeko berriz, entzima espezifikoak dauzkagu. Anandamidaren sintesi entzima NAPE-PLD da eta 2-AG –rena DAGL α . Aldiz degradaziorako entzimak FAAH eta MAGL dira hurrenez hurren. Jarraitzeko, hartzaile kannabinoideak dauzkagu, lehen motakoa (CB1) eta bigarren motatakoa (CB2). Hauek berezko kannabinoideak (endokannabinoideak) eta berezkoak ez direnak (fitokannabinoideak landareetan edota kannabinoide sintetikoak) ezagutzeko kapazak dira eta euren ekintza eta baita kokapena ere desberdina da. Lehen motako hartzailea nerbio sistema zentrolean aurkitzen da batez ere, bigarren motako hartzailea berriz zelula immunitarioetan aurkitzen da nagusiki. CB1 hartzailea mintz presinaptikoan kokatzen da. Gainontzeko neurotransmisore klasikoak ez bezala, endokannabinoideak eremu postsinaptikoan sintetizatzen dira beharrezkoak direnean eta presinapsiraino bidea egiten dute euren ekintza burutzeko (Howlett et al., 2002) (1. eskema).

Hartzaile hauetan eragiteaz gain, endokannabinoideak beste sistema batzuetako hartzaileekin ere elkarrekintzak sortzen dituzte, horien artean TRPV1 (Potenzial aldakorrekotako lehen motako hartzaile valinoidea) edota GPCR55 (G proteinetara loturiko hartzaile zurtza). TRPV1 hartzailea kanal kationiko ez selektibo bat da zeina hainbat sustantzia naturalen bidez, valinoideen bidez, pH baxuen bidez edota tenperatura altuen bidez aktibatzen den. Ondorioz neurotransmisoreen askapena erregulatzen du garuneko plastizidade sinaptikoan eraginez (Bhaskaran eta Smith, 2010). Hartzaile horiek kannabinoideengatik aktibatuak izan daitezke eta endokannabinoideen sintesian eragina izan dezaketela ikusi da (Chávez et al., 2014). Duela gutxi deskribatu da hartzaile hau, TRPV1-a hipokanpoko geruza molekularreko bide zulatzailean kokaturiko sinapsi kitzikatzaileren alde postsinaptikoan aurkitzen dela (Puente et al. 2014) eta gainera geruza horretan dauden sinapsi inhibitzaileen % 30 hartzaile honentzako immunopositiboak dira (Canduela et al. 2015).

1. eskema

Endokannabinoide sistemaren ekintza mekanismoa

1. Sinapsia
2. Mintz postsinaptikoaren despolarizazioa
3. Endokannabinoideen sintesia
4. Endokannabinoideen askapena
5. CB₁ hartzailearen aktibazioa
6. Mintz presinaptikoaren hiperpolarizazioa
7. Neurotrasmisoreen askapenaren etetea



Esan bezala, sistema honek sinapsi transmisioa modulatzeko duenez, burmuinean gertatzen den gehiegizko aktibitatea kontrolatu dezake, eta hori litzateke, hain zuzen ere, epilepsian ematen den fenomeno. Gaixotasun kroniko honetan burmuinaren gehiegizko kitzikapen bat gertatzen da hipokanpoan, izan ere, eremu honetan dauden zirkuitu kitzikatzailak gehiegizko aktibitate hori garatzeko erraztasun gehiago daukate (Ben-Ari Y., 2002) eta horren ondorioz hipokanpoa endekatu egiten da.

Krisi epileptikoak bi motatakoak izan daitezke; partzialak, konbultsioak gorputz atal baten ematen direnean, eta orokortuak, gorputz osoan adierazten direnak (Bates, K. 2015). Epilepsia gaixotasuna nahi baino aruntagoa da, gaur eguneko munduan 50 milioi pertsona baino gehiagok pairatzen duten gaixotasun kronikoa da eta urtean 2,4 milioi kasu berri agertzen direla kalkulatu da. Gaixotasun hau mundu osoan morbiditatearen %0,5 betetzen du eta Europa mailan urtean dakarren diru gastua 20.000 milioiokoa da (OMS 2015).

Ikerketaren helburuak:

Gure laborategian aurretik egindako saiakera batzuetan, ikusi da TRPV1 hartzailea espresatzen ez duten genetikoki moldatutako saguek (TRPV1-KO) jasaten duten status epilepticus-a, sagu normalek jasaten dutena baino arinagoa dela, bai jasandako mailan eta baita iraupenean ere. Emaita horiek TRPV1 hartzaileak edo bere absentsiak eragiten dituen aldaketak onuragarriak izan daitezkeela epilepsian iradokitzen dute. Sistema endokanninoidearen eragin neurobabeslea kontutan hartuz eta potentzial terapeutikoa ezagututa (Chiarlone et al. 2014), garrantzitsua litzateke hipokanpoko neurona kitzikatzailarekin TRPV1-KO saguetan epilepsiaren aurreko babesean parte hartzen dauden neurona azpimoten CB1 hartzaileak aurkezten duen kokapena jatorrizko animaliekin konparatzea; CB1-aren espresio edo kokapen aldaketa izan baitaiteke epilepsia arintzearen erantzule.

Ikerketaren muina eta ondorioak:

Lan honen helburua betetzeko lehenik eta behin TRPV1 hartzailea espresatzen ez duten sagu transgenikoetan sistema endokannabinoidearen parte diren osagaiak aztertu dira. Horretarako teknika ezberdinak erabili ditugu. Batetik, sistemaren osagaiak diren hartzaile eta zenbait entzimen espresioa western blot teknikaren bidez aztertu da. Teknika horren bitartez jatorrizko saguen eta TRPV1-KO saguen hipokanpoetan hartzaile edo entzima desberdinen kantitatea alderatu da. Bestetik, teknika immunohistokimikoak erabiliz, argi mikroskopia eta mikroskopia elektronikoaren bitartez hain zuzen ere, CB1 hartzailearen espresioan eta kokapen orokor eta zehatzean dauden ezberdintasunak bilatu dira bi sagu moten artean.

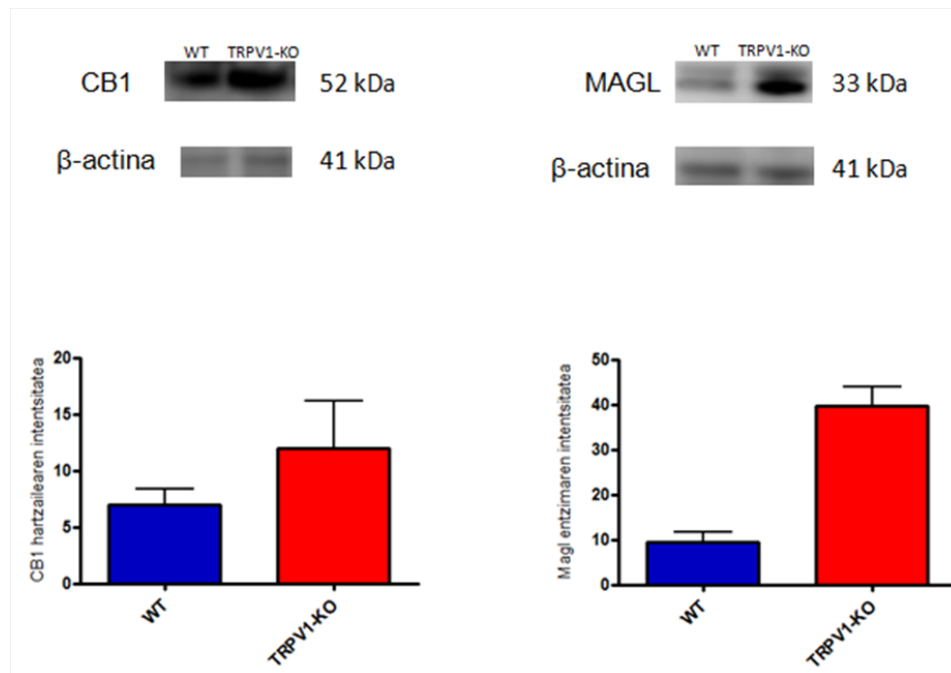
Ikerketa honetan erabili diren saguak, bi hilabeteko C57BL6 anduiko saguak dira, bai kontrol zein TRPV1-KO animaliak. Hauetan aztertu den eremua hipokanpoa izan da eskualde hau baita aldi baterako epilepsia medialarekin zuzenki erlazionatutako eremua. Epilepsia mota honetan hipokanpoaren endekapena gertatzen da bere funtzioaren galerarekin batera.

Lehenik eta behin bi sagu hauen artean ezberdintasunak bilatzeko western blot teknika erabili da. Teknika honen bitartez ikusi da CB1 hartzailearen eta baita ere MAGL sintesi entzimaren espresioan handipen bat dagoela TRPV1 hartzailea ez duten saguen hipokanpoetan (1. irudia).

Hipokanpoan ematen den handipen hau zehaztasun handiagoz aztertzeko eta aldaketak izaera orokorra duten edo hipokanpoaren eskualde jakin batzuetara mugatzen diren ezagutzeko teknika immunohistokimikoak erabili dira. CB1 hartzailearen lotzen diren antigorputzak erabiliz, ikusi dugu

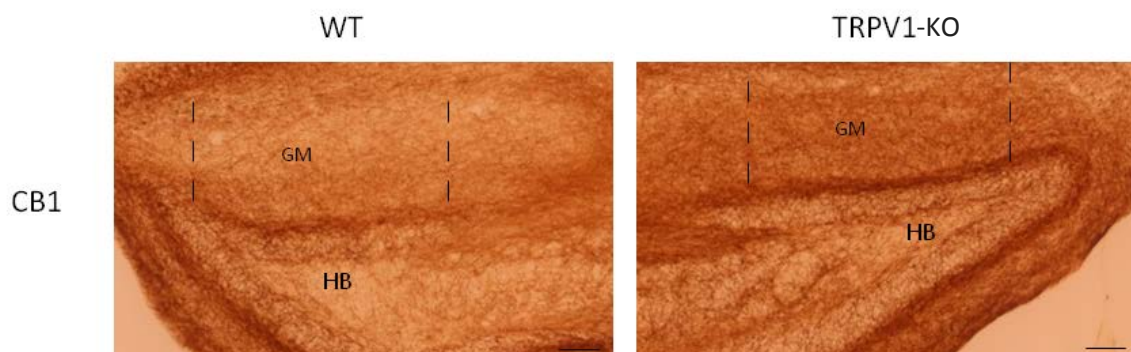
hipokanpoan CB1 hartzailaren espresioan handipen bat gertatzen dela TRPV1-KO saguetan eta handipen hau hipokanpoaren hortz bihurgunean nabarmenagoa dela (2. irudia). Eredu honetan hainbat geruza ezberdin badaude ere, analisi hau geruza molekularra deritzon zonaldearen lehen herenera zuzendu da, bertan baitago CB1 hartzaila gehien eta desberdintasunak nabariagoak izan daitezke, hala ere, etorkizunean gainerakoak aztertzeko asmoa dago.

1. irudia



CB1 eta MAGL proteinen espresioa sagu hipokanpoan. Ardatz bertikalean bi proteinen espresio erlatiboa adierazten da. Ardatz horizontalean berriz aztertutako bi taldeak. WT: jatorrizko sagua TRPV1-KO: TRPV1 espresatzen ez duen sagua

2. irudia

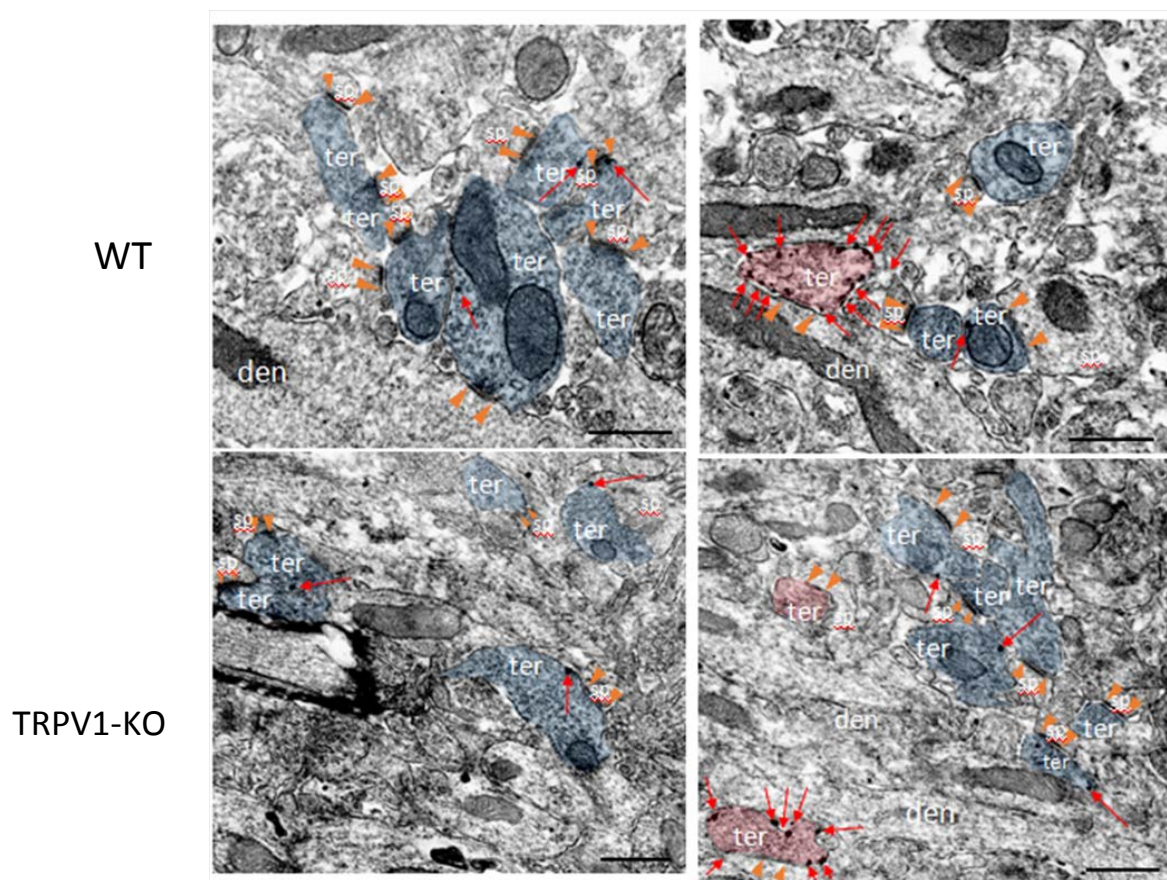


Argi mikroskopia bidezko CB1 hartzailaren markaketa hipokanpoko hortz bihurgunean jatorrizko eta TRPV1-KO saguetan. Marra bertikalek geruza molekularren eskumako eta ezkerreko mugak adierazten ditu. WT: jatorrizko sagua TRPV1-KO: TRPV1 espresatzen ez duen sagua. GM: geruza molekularra eta HB: hortz bihurgunea; Eskala barra: 0,5 μ m

Ultraegitura mailan, handipen hau zein neurona mota eta eskualdetan gertatzen den jakin nahi izan da eta horretarako teknika immunoizotokimikoak mikroskopio elektronikoan aztertu dira (3. irudia). Azterketa eta kuantifikazioa egin ondoren, ikusi da terminal kitzikatzaileetan CB1 hartzailearen handipen esanguratsua gertatzen dela (4A irudia), izan ere, jatorrizko animalien terminal kitzikatzaileetan $32,61 \pm 2,33$ -an CB1 hartzailea dagoen bitartean, TRPV1 hartzailerik ez duten animalietan, eremu berdinean, CB1 hartzailea agertzen duten terminal kitzikatzaileen ehunekoa $47,37 \pm 2,47$ -ra arte igotzen da. Kontutan edukiz, sagu mota bietan terminal kitzikatzaile kopuruan ezberdintasun esanguratsurik ez dagoela, ondorioztatu daiteke gora egin duena CB1 hartzailearen presentzia dela. Hau ikusita, terminal inhibitzaileetan berdin gertatzen den aztertu da (4B irudia). Kasu honetan ere terminal inhibitzaile kopuruan aldaketarik ez egoteaz gain, ez da CB1 hartzailea duten terminal inhibitzaileen handipen esanguratsurik behatu.

Terminal kitzikatzaileetan CB1 terminal positibo kopurua igotzeaz gain CB1 hartzailearen dentsitatean ere handipen bat dago (4D irudia). Hau da, TRPV1-KO animalien terminal kitzikatzaileen mintzetan agertzen den CB1 hartzaileen kopurua handiagoa da jatorrizko saguetan agertzen dena baino. Horrela, jatorrizko saguetan mintzeko mikrometro bakoitzeko $0,23 \pm 0,019$ partikula agertzen diren bitartean, TRPV1-KO animalietan mintzeko mikrometroko $0,32 \pm 0,021$ partikula ageri dira. Dentsitate aldaketa honen arrazoia CB1 hartzailearen espresio igoera edo terminalen perimetroaren txikitzea izan daitekeenez, terminal kitzikatzaileen perimetroak neurtu dira. Azterketa horrek bi animali taldeen artean ez du ezberdintasun esanguratsurik aurkitu. Terminal inhibitzaileetan ez da CB1 hartzailearen dentsitatean aldaketarik gertatu (4E irudia).

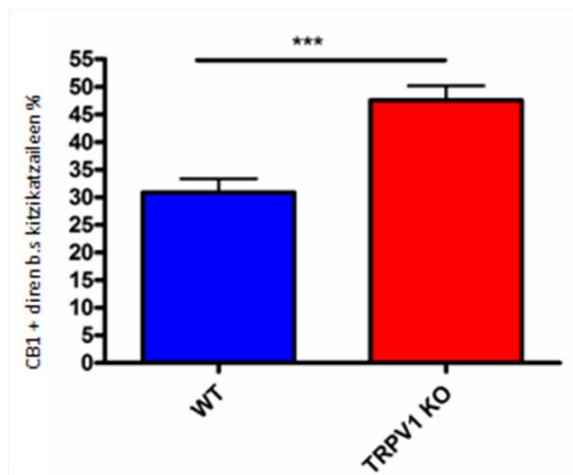
3. irudia



CB1 hartzailearen kokapena hipokanpoko geruza molekularreko lehen herenean, neurona kitzikatzaile zein inhibitzaileetan, jatorrizko saguetan eta TRPV1-KO saguetan. Urdinez: bukaera sinaptiko kitzikatzaileak; Gorritz: bukaera sinaptiko inhibitzaileak; Geziburu gorriak: sinapsiak; Gezi gorriak: CB1 immunopartikulak; Ter: bukaera sinaptikoak; Sp: spina dendritikoak; Den: dendritak. Eskala barra 0,5 μ m

4. irudia

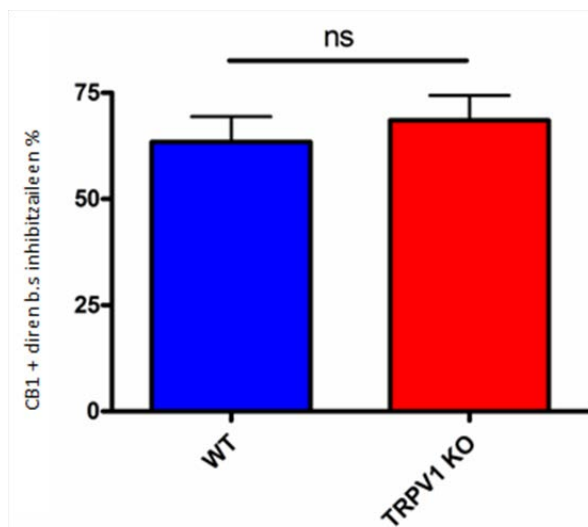
A)



CB1 espresioaren kuantifikazioa bukaera sinaptiko kitzikatzaileetan.

CB1 immunopositiboak diren terminal kitzikatzaileen batz bestekoa jatorrizko saguetan % 30,87 ± 2,45-koa da. TRPV1-KO saguetan batz bestekoa %47,54 ± 2,63-koa da. Bi taldeen arteko aldea estadistikoki esanguratsua da ($p < 0,0001^{***}$, Mann Whitney test). (B.s: bukaera sinaptikoa. Aztertutako bukaera kopurua, WT: 328; TRPV1-KO: 345).

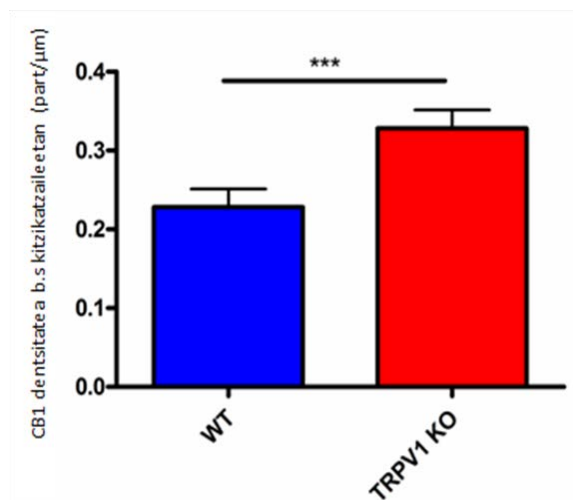
B)



CB1 espresioaren kuantifikazioa bukaera sinaptiko inhibitzaileetan

CB1 immunopositiboak diren terminal inhibitzaileen batz bestekoa jatorrizko saguetan %63,46 ± 5,95-koa izan da. TRPV1-KO saguetan berriz batz bestekoa %68,53 ± 5,85-koa da. Ez da bi taldeen arteko ezberdintasun estadistiko esanguratsurik ageri ($p > 0,05$ Mann whitney test). (B.s: bukaera sinaptikoa. Aztertutako bukaera kopurua, WT: 74; TRPV1-KO 72)

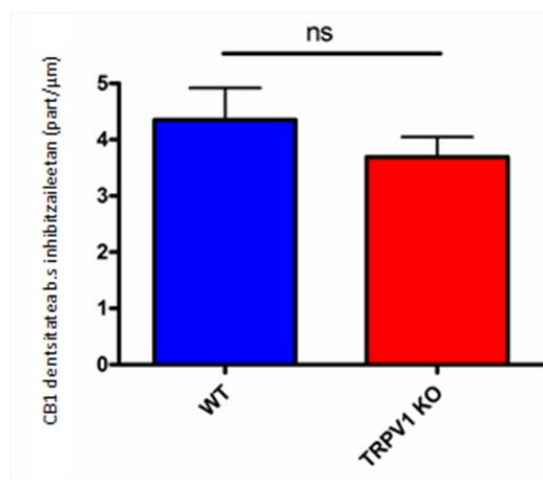
D)



Terminal kitzikatzaileen CB1 immunopartikulen dentsitatea hipokanpokoan.

CB1 immunopartikulen batz bestekoa mikrako 0,23 ± 0,023 partikulakoa da jatorrizko saguetan. TRPV1-KO saguetan berriz mikrako 0,33 ± 0,023 partikulakoa da. Bi taldeen arteko ezberdintasuna estadistikoki esanguratsua da ($p < 0,0001^{***}$ Mann Whitney test). (B.s: Bukaera sinaptikoa. Aztertutako bukaera kopurua, WT: 328; TRPV1-KO: 345).

E)



Terminal inhibitzaileen CB1 immunopartikulen dentsitatea hipokanpokoan.

CB1 immunopartikulen batz bestekoa mikrako 4,35 ± 0,57 partikulakoa da jatorrizko saguetan. TRPV1-KO saguetan berriz mikrako 3,69 ± 0,35 partikulakoa da. Ez da bi taldeen arteko ezberdintasun estadistiko esanguratsurik ageri ($p > 0,05$ Mann whitney test). (B.s: bukaera sinaptikoa. Aztertutako bukaera kopurua, WT: 74; TRPV1-KO: 72).

Lan honen emaitzak adierazten dute, TRPV1 hartzailea ez duten saguetan, CB1 hartzailearen espresioan handipen bat ematen dela. Handipen hau, zehazki, geruza molekularreko lehen hereneko terminal kitzikatzailleetan ematen dela behatu da. Horrez gainera hartzailearen mintzeko espresioa ere handitu egin da

Guzti honek iradokitzen du TRPV1-KO saguek status epilepticus arinagoak pairatzen dituztenaren oinarrian, pentsa daiteke sistema endokannabinoidearen espresio maila eta bere aktibitatearen areagotuta izatearen ondorioz izan daitekeela.

Etorkizunerako planteatutako norabidea

Lan honetan hipokanpoko geruza molekularreko lehen hereneko eremua aztertu da. Azterketa hau hipokanpoko beste eremuetara zabaldu nahiko genuke eta azterketa honetatik lortutako emaitzak lobulu tenporalerako epilepsia sagu ereduan aztertu. Erabiliko dugun eredia hipokanpo barneko kainato injekzioa da. Modu horretara, jatorrizko animalietan zein TRPV1-KO-etan epilepsiak sistema endokannabinoidean eragiten dituen aldaketak aztertuko dira eta kannabinoideetan oinarritutako tratamendu bat garatzen ahaleginduko gara.

Eskerrak eta oharrak:

Lan hau burutzeko hainbat erakunderen diru laguntzaz baliatu da. Euskal gobernutik Pedro Grandes jaunari BCG IT764-13 laguntza esleitu zaio; SAF2015-65034-R laguntza Pedro Grandes jaunari ministeriotik ; Euskal Herriko unibertsitate UPV/EHU UFI11/41 laguntza; Adikzio nahasmenduen saretik - Instituto de Salud Carlos III-RD12/0028/0004 laguntza Pedro Grandeseri eta JEHE Euskal Herriko Unibertsitatearen kontratu dauka (PIF 15/255).

Erreferentziak

Bates, K. (2015) Epilepsy: Current evidence-based paradigms for diagnosis and treatment. *Neurology*; 42:217-232

Ben-Ari Y. (2002 iraila) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.*; 3(9):728-39

Bhaskaran, M.D. eta 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

Canduela, M.J. et al. (2015) Visualization by high resolution immunoelectron microscopy of the transient receptor potential vanilloid-1 at inhibitory synapses of mouse dentate gyrus. *PLoS One*; Mar 16; 10 (3):e0119401

Chávez A. E. et al (2014) Compartment-Specific modulation of GABAergic synaptic transmission by TRPV1 channels in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*. 34(50):16621-29

Chiarlone, A. et al. (2014) A restricted population of CB1 cannabinoid receptors with neuroprotective activity. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*; 1-6

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

Marsicano, G et al. (2003) CB1 cannabinoid receptors are on demand defense against excitotoxicity. *Science*; 302: 84-88

Monory, K. et al. (2006) The endocannabinoid System Controls Key Epileptogenic circuits in the Hippocampus. *Neuron*; 51:455-466

Munduko osasun erakundea, Osasunaren 68. Mundu asanblada (2015) Carga mundial de epilepsia y necesidad de medidas coordinadas en los países para abordar sus consecuencias sanitarias y sociales y su conocimiento por el público. *Idazkaritzako informea*; A68/12: 3-4

Puente, N et al. (2014) The transient receptor potential vallinoid-1 is localized at excitatory synapses in the mouse dentate gyrus. *Brain Struct. Funct.* Man 220(2); 12187-94

Zhang, L-N. et al. (2015) Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*; 24:161-165

Elementu erregulatzaileen identifikazioa eritasun zeliakoan genoma osoko koadierazpen analisi bidez

Romero-Garmendia I.¹, Garcia-Etxebarria K.¹, Santin I.², Jauregi-Miguel A.¹, Plaza-Izurieteta L.¹, Legarda M.³, Irastorza I.³, Fernandez-Jimenez N.^{1*}, Bilbao JR^{1*}.

¹*Immunogenetika laborategia, Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria, Espainia*

²*Endokrinologia eta Diabetes ikerketa taldea, BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria, Espainia*

³*Haur Gastroenterologia, Gaixotasun zeliakoa, Nutrizioa eta digestio hodiko gaixotasunen ikerketa taldea, Pediatria Saila, BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria, Espainia*

irati.romero@ehu.eus

Laburpena

Eritasun zeliakoa (EZ) glutenaren eraginez genetikoki suszeptibleak diren indibiduoetan agertzen den gaixotasun autoimmunea da. Jakina da gliadinak zenbait generen koadierazpenean eragiten duela EZan. Ikerketa honen helburua genoma mailako koadierazpen patroia zeliakoak erakitzea izan da, eta baita gaixotasunaren testuinguruan aldatzearen atzean egon daitezkeen elementu erregulatzaileak identifikatzea ere. Gure metodologia gaixotasunerako funtsezko izan daitezkeen elementu erregulatzaileak identifikatzeko gai izan da. Zehazki, *CREB1* eta *IRF1* desberdin adierazten dira pazienteetan kontrol ez zeliakoekin alderatuta, eta haien aktibazioa gertatzen da gliadinarekin kitzikatutako C2BBE1 zeluletan.

Hitz gakoak: Eritasun zeliakoa, koadierazpena, IRF1, CREB1

Abstract

Celiac disease (CD) is an autoimmune disease that develops in genetically susceptible individuals due to ingested gluten. It is known that gliadin provokes coexpression changes in several genes in the disease. The aim of this study was to construct the celiac coexpression patterns at a whole genome level and to identify regulatory elements that drive CD-related alterations in coordination. Coexpression analyses at a whole genome level are a useful strategy to identify regulators that could underlie these patterns and consequently be relevant to the disease. In particular, CREB1 and IRF1 are differentially expressed in patients, and are activated upon gliadin stimulation in C2BBE1 cells.

Keywords: Celiac disease, coexpression, IRF1, CREB1

1. Sarrera eta motibazioa

Eritasun zeliakoa (EZ, MIM: 212750) %1eko maiztasuna duen gaixotasun kroniko eta autoimmunea da, gariaren glutenaren eta zekale eta garagarraren beste antzeko proteinekiko intolerantzia dela eta, genetikoki suszeptibleak diren indibiduoetan ematen dena. Heste meharraren endekatzea eragiten du EZak; hala nola, linfuzito intraepitelialen infiltrazioa, kripten hiperplasia eta biloxken atrofia. Gainera, diagnosirako erabilgarriak diren auto-antigorputzak agertzen dira zirkulazioan, anti-endomisio (EMA) edo anti-transglutaminasa (TGA) antigorputzak, esaterako (Green eta Cellier, 2007).

Sintomak oso aldakorak izan daitezke. Ohikoenak beheko kronikoa, pisu galera eta hantura abdominala dira, baina nekea, altuera baxua, osteoporosia, urritasun psikomotoreari dagozkion sintomak (giharren ahultzea...) ere aurkeztu ditzake.

Gaur egun, tratamendu eraginkor bakarra erabateko glutenik gabeko dieta (GGD) da, gari, zekale eta garagarraren produktuak dietatik kenduz. Tratamendua betetzen ez bada, beheakoa, inflamazioa, pisu galera, giharren ahultzea etab. eman daitezke.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Zeliakia eritasun konplexua da, bere patogenesia faktore genetikoek zein ingurune faktoreek parte hartzen dutelarik. Giza Antigeno Leukozitarioaren (ingelesez Human Leucocyte Antigen edo HLA) DQ2 eta DQ8 aldaerak arrisku genetikoaren erantzule nagusiak dira, baina beharrezkoak izan arren, gaixotasunaren osagarri genetikoaren %40a inguru besterik ez dute azaltzen (Greco et al., 2002). Azken urteetan genoma osoko asoziazio azterketek (GWAS) eta Immunochip (van Heel et al., 2007; Dubois et al., 2010; Trynka et al., 2011; Garcia-Etxebarria et al., 2016) proiektuak gaixotasunaren arriskuan eragiten duten beste markatzaile batzuk identifikatu dituzte. Azken horiek osagai genetikoaren %10-15 azaltzen dute.

Asoziazio seinale horien atzean egon daitezkeen ondorioak ulertzeko burutu diren gene hautagaien banakako adierazpen azterketek emaitza mugatuak erdietsi dituzte (Plaza-Izurietta et al., 2015). Gaixotasunaren patogenesia eszenatoki konplexuagoa iradokitzen dute, non gene taldeen edota bidezidorren erantzun koordinatua izan daitezkeen maila ukitua. Zentzu horretan, asoziazio eremu genomiko bereko *PTPRK* eta *THEMIS* geneen adierazpen mailak gaixoen heste biopsietan (baina ez kontrol ez zeliakoetan) korrelazionatuta daudela ikusi dugu (Bondar et al., 2014). Gainera, NFκB bidezidorrarekin erlazionatutako 93 geneen mRNA mailen arteko korrelazio estua aurkitu da kontrol ez zeliakoetan, baina gaixoetan gene multzoaren adierazpena guztiz desantolatzen da (Fernandez-Jimenez et al., 2014).

Aurkikuntza horiek, gaixotasuna eragiten duten faktoreak gene indibidualak baino, gene taldeak erregulatzen dituzten elementu genomikoak izan litezkeela iradokitzen dute. Eritasun zeliakoa pairatzeko joera duten pertsonengan glutenaren ingestioak zenbait gene multzoren erantzun koordinatuan eragin dezakeela proposatzen dugu, gene multzo koordinatuak sortuz edota multzoak desantolatuz transkriptoma osoan zehar. Gainera, koadierazpen aldaketa horien erantzule izan litezkeen transkripzio faktore (TF) zein miRNA bezalako elementu erregulatzailerak gaixotasunean asaldaturik egon litezkeela proposatzen dugu.

Hipotesi hau baieztatzeko, aurretiaz gure laborategian egindako bi adierazpen *microarray*-en emaitzak berraztertu ditugu. *Microrarray* horietan, pazienteen heste biopsiak aztertuz, gliadinaren epe luzeko zein laburreko esposizioek genoma osoaren adierazpenean duten eragina deskribatzen da (Castellanos-Rubio et al., 2008; Castellanos-Rubio et al., 2010). Lan honetan, koadierazpena ikertu dugu genoma osoan, eta modu koordinatuan antolatzen diren geneen moduluak identifikatu ditugu. Gainera, koadierazpenaren aldaketa hauen bultzatzaile izan daitezkeen elementu funtzionalak identifikatu ditugu. Azkenik, gure estrategia balioztatzeko, elementu erregulatzailerak horien alterazio funtzionalak identifikatzen saiatu gara gaixo eta kontrolen ehunetan zein *in vitro* eredu batean.

3. Ikerketaren muina

3.1 Glutenak koadierazpen aldaketak sortzen ditu eritasun zeliakoan

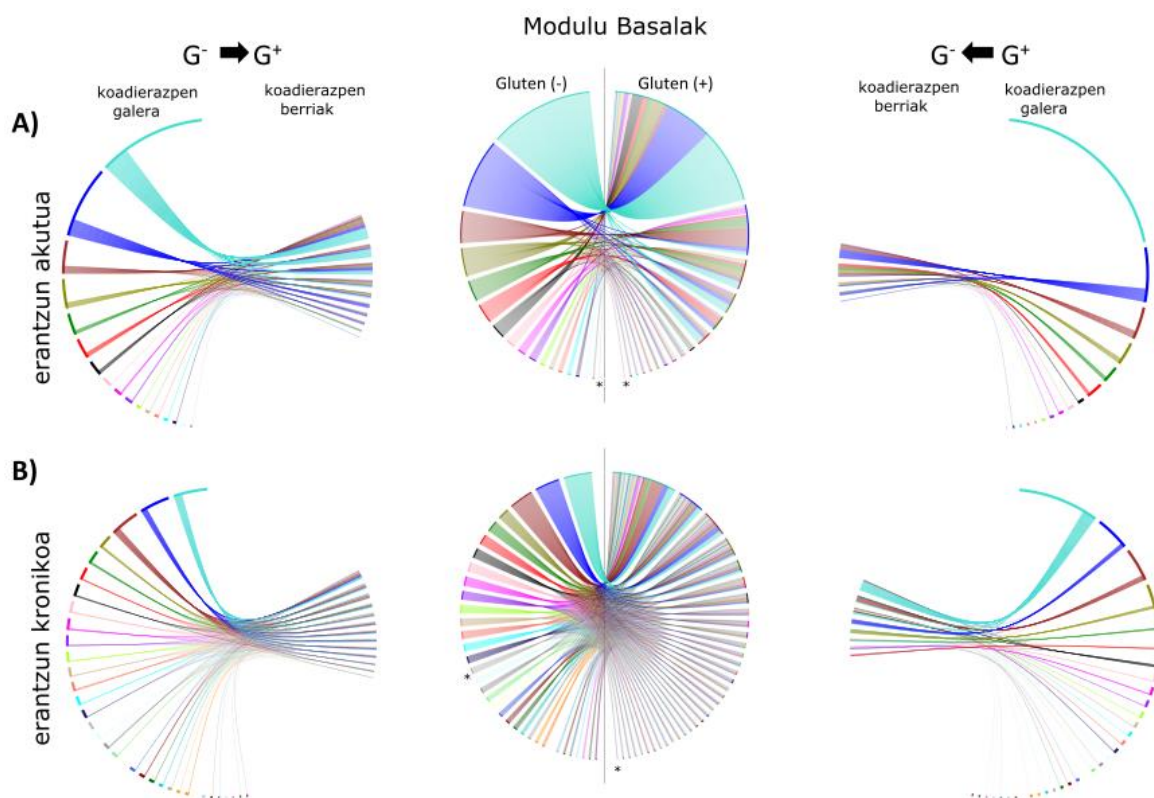
Glutenak koadierazpenean izan dezakeen eragin akutua eta kronikoa aztertzeko, aurretik gure laborategian egindako bi *microarray* esperimentu berraztertu dira; esperimentu haietan, erantzun akutua aztertzeko GGD tratamenduan zeuden pazienteen biopsiak gliadinarekin eta gliadina gabe inkubatu ziren 4 orduz, eta erantzun kronikoa aztertzeko, GGD tratamendupean eta tratamendurik gabeko gaixo aktiboen biopsiak behatu ziren (Castellanos-Rubio et al., 2008; Castellanos-Rubio et al., 2010).

Oraingo analisisian, esperimentu akutuen kasuan 18 koadierazpen talde, modulu izenez ezagutzen direnak, identifikatu dira GGD biopsietan, eta 16 gliadinarekin lau orduz tratatutako frakzioetan. Esperimentu kronikoaren kasuan, aldiz, 35 modulu ezberdin sortu dira bai GGD zein paziente aktiboen taldeetan (1. irudia).

Baldintza desberdinetako koadierazpen moduluak identifikatzeaz gain, gliadinaren ondoriozko koadierazpen aldaketak ere aztertu dira. Koadierazpen diferentziala erakusten zuten geneak (KDG) moduluko beste geneekiko harremanak modu esanguratsuan aldatzen dituztenak

dira. Zehazki, esperimentu akutuan, egoera basaleko geneen %21,71k koadierazpen aldaketak jasaten ditu, eta 4 orduz estimulatutako biopsien kasuan geneen %9,93k. Erantzun kronikoan, koadierazpen galera horrek GGD taldean gaixo aktiboen taldean baino gehiago eragiten du (%14,68 vs. %12,60). Baliteke behin gaixoen mukosa osatuta eratzen diren moduluak gaixo aktiboetan daudenak baino aldakorragoak izatea.

- 1. irudia. Genoma osoko koadierazpen moduluak gliadinaren aurkako erantzun A) akutuan eta B) kronikoan. Esperimentu bakoitzean, erdiko irudian egoera basaleko (glutenarekin G^+ - edo gluten gabe G^-) koadierazpen moduluak erakusten dira. Kolore bakoitzak modulu bat adierazten du eta izartxoak modulutan taldekatzen ez diren geneei dagozkie. Ezkerrean G^- egoeran glutena gehitzen denean moduluetatik ihes egiten duten geneak eta hauek egoera berrian sortzen dituzten moduluak adierazten dira ($G^- \rightarrow G^+$ trantsizioa). Eskuinean $G^+ \rightarrow G^-$ trantsizioko ondorioak.**



3.2 Erregulatzaile hautagaien identifikazioa

Modulu bakoitzeko KDGeekin miRNA eta transkripzio faktoreen aberaste-analisia burutu da koadierazpen aldaketen atzean egon daitezkeen elementu erregulatzaileak identifikatzeko. Aberaste-analisiak 9 miRNA eta 3 TF identifikatu ditu esperimentu akutuan, eta 37 miRNA eta 8 TF esperimentu kronikoan ($P < 0.05$). Identifikatutako zenbait erregulatzaile balioztapen esperimentalerako hautatu dira; batzuk aurretik inflamazio prozesuekin erlazionatutakoak, IRF1 (Guo et al., 2010) eta CREB1 (Wen et al., 2010) kasu. Beste batzuk eritasun zeliakoarekin erlazionatutako bidezidorrekin asoziatu dira: Toll-like hartzaileen bidezidorrarekin hsa-miR-92a (Lai et al., 2013) eta hsa-let-7b-3p (Teng et al., 2013); NF κ B bidezidorrarekin hsa-miR-33a (Kuo et al., 2013), hsa-miR-503 (Zhou et al., 2013), hsa-miR-18a-3p (Trenkmann et al., 2013), hsa-miR-26b (Zhao et al., 2014), hsa-miR-520e (Zhang et al., 2012) eta NF κ B1 (Fernandez-Jimenez et al., 2014); lotura hertsiekin ELK1 (Al-Sadi et al., 2013); eta beste batzuk gaixotasunarekin asoziatutako geneekin, hsa-miR-655 (Kitamura et al., 2014) eta hsa-miR-520b (Yadav et al., 2008) esaterako. HOXA5 transkripzio faktorearen ituen aberaste nabarmena ere ikusi da bai esperimentu akutuko zein kronikoko zenbait modulutan.

3.2 Adierazpen aldaketak TF eta miRNA hautagaietan

Aukeratutako 9 miRNA hautagaien forma heldugabearen (pri-miRNA) adierazpena neurtu da gaixo aktibo eta kontrolen duodenoko biopsietan. Zazpi pri-miRNA (hsa-mir-33, hsa-mir-363, hsa-let-7b, hsa-mir-655, hsa-mir-26b, hsa-mir-520b eta hsa-mir-520e) modu esanguratsuan ($P < 0.05$) gutxiago adierazten dira gaixoetan, kontrolekin konparatuta.

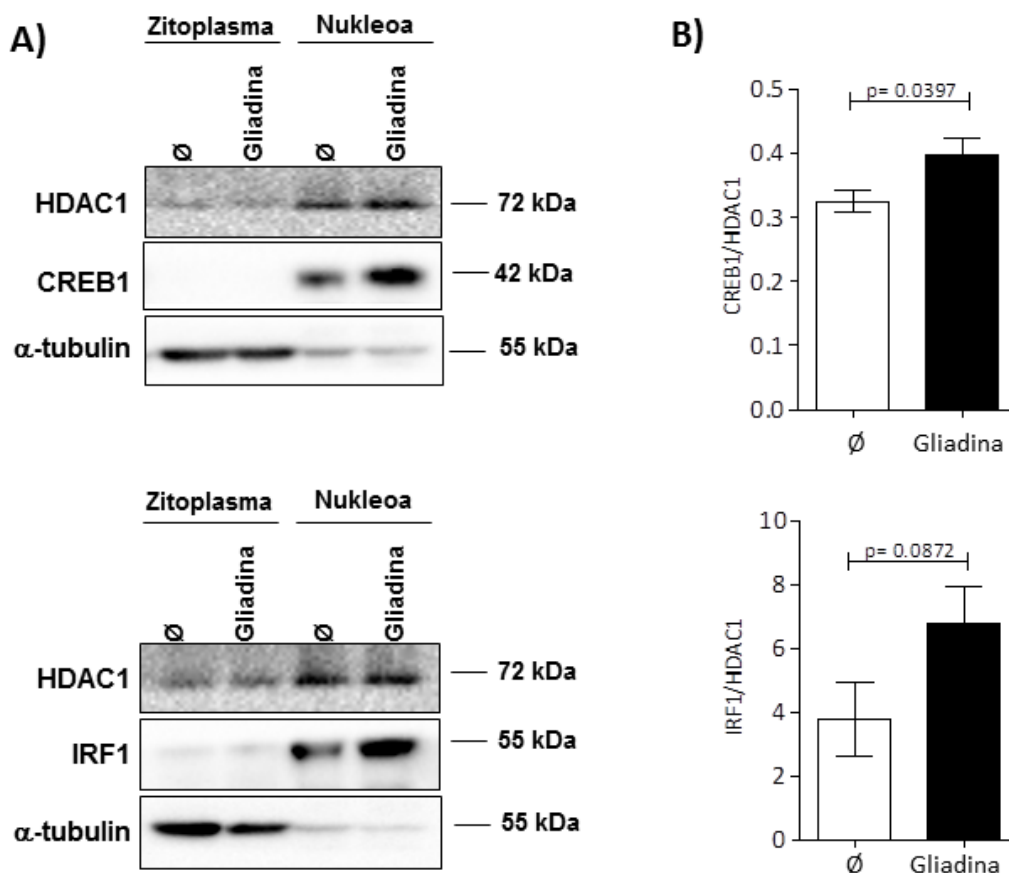
Zenbait miRNA eritasun zeliakoarekin aurretik erlazionatu badira ere (Capuano et al., 2011), lan honetan identifikatutako miRNA-k ez daude horien artean.

Bestetik, transkripzio faktore hautagaien adierazpen analisiak *IRF1*, *ELK1*, *NFKB1* eta *CREB1* gaixotasunean gain-adierazita ($P < 0.05$) daudela erakutsi du. Aurreko zenbait lanek *IRF1* eta *NFKB1* gaixotasunean asaldatuta daudela ikusi dute (Lahdenperä et al., 2011; Fernandez-Jimenez et al., 2014), baina oraingoa da gaixotasunean *CREB1*-en gain-adierazpena identifikatu den lehen aldia. Bestetik, *ELK1* garrantzitsua da hesteko irazkortasunaren emendatzean, gaixotasunean bereizgarria den ezaugarria (Jauregi-Miguel et al., 2014).

3.4 TF kandidatuak C2BBel lerro zelularrean

Transkripzio faktore aktibo batek eragin biologikoa izateko zelularen nukleoan sartu behar denez, adierazpen aldaketa erakutsi duten 4 TFen nukleorako translokazioa aztertu dugu gliadinarekin eta gliadina gabe tratatutako C2BBel lerro zelularrean. Gliadinarekin tratatutako zeluletako nukleoan, IRF1 eta CREB1 proteinen emendioa ikusi dugu (2. irudia), TF hauen aktibazioan gliadinaren inplikazioa iradokiz, baita eredu ez zeliakoetan ere.

2. irudia. IRF1 eta CREB1 transkripzio faktoreen translokazioa gliadinarekin/gabe kitzikatutako C2BBel zeluletan. A) TF-en translokazioa neurtzeko hiru Western blot esperimentu independente egin dira. B) Banden intentsitatea kuantifikatu eta HDAC1 kontrolarekiko normalizatu dira, batz bestekoa $\pm$ SEM.



4. Ondorioak

Laburbilduz, mota honetako ikerketak gaixotasunetan garrantzitsuak diren elementu erregulatzaileak identifikatzeko erabilgarriak izan daitezkeela erakutsi dugu. Aztertutako hautagai gehienek adierazpen aldaketak dituzte gaixoen ehun ituan, eta horietako bik aktibazioa erakutsi dute gliadinarekin tratatutako C2BB₁ zeluletan (EZaren eredutzat aurretiaz erabilitako heste-zelulak). Esperimentu bioinformatikoen eta modu librean eskura daitezkeen genoma osoko datuen erabilgarritasuna azpimarratu nahiko genuke mekanismo berriak eta kandidatu terapeutikoak identifikatzeko orduan.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Identifikatutako elementu erregulatzaile guztietatik 9 miRNA eta 5 transkripzio faktore balioztatu dira esperimentalki. Etorkizunean elementu erregulatzaile gehiagoren balioztapenak egin nahi ditugu. Beste erregulazio mekanismo batzuk ere aztertu nahi ditugu, RNA luze ez-kodetzaileak (long non-coding RNA edo lncRNA) eta kromatinaren egoera kasu.

6. Erreferentziak

- Al-Sadi, R., et al. (2013), TNF- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier is regulated by ERK1/2 activation of Elk-1, *Am. J. Pathol.*, 183, 1871-84.
- Bondar, C., et al. (2014), THEMIS and PTPRK in celiac intestinal mucosa: coexpression in disease and after in vitro gliadin challenge, *Eur. J. Hum. Genet.*, 22, 358-62.
- Capuano, M., et al. (2011), MicroRNA-449a overexpression, reduced NOTCH1 signals and scarce goblet cells characterize the small intestine of celiac patients, *PLoS One*, 6.
- Castellanos-Rubio, A., et al. (2008), Combined Functional and Positional Gene Information for the Identification of Susceptibility Variants in Celiac Disease, *Gastroenterology*, 134, 738-46.
- Castellanos-Rubio, A., et al. (2010), Long-term and acute effects of gliadin on small intestine of patients on potentially pathogenic networks in celiac disease, *Autoimmunity*, 43, 131-9.
- Dubois, P., et al. (2010), Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression, *Nat. Genet.*, 42, 295-302.
- Fernandez-Jimenez, N., et al. (2014), Coregulation and modulation of NF κ B-related genes in celiac disease: Uncovered aspects of gut mucosal inflammation, *Hum. Mol. Genet.*, 23, 1298-310.
- Garcia-Etxebarria, K., et al. (2016), Ancestry-based stratified analysis of Immunochip data identifies novel associations with celiac disease, *Eur. J. Hum. Genet.*, 1-4.
- Greco, L., et al. (2002), The first large population based twin study of coeliac disease, *Gut*, 50, 624-8.
- Green, P.H.R. eta Cellier, C. (2007), Celiac disease, *N. Engl. J. Med.*, 357, 1731-43.
- Guo, M., et al. (2010), Inhibition of IFN regulatory factor-1 down-regulate Th1 cell function in patients with acute coronary syndrome, *J. Clin. Immunol.*, 30, 241-52.
- Jauregi-Miguel, A., et al. (2014), Alteration of tight junction gene expression in celiac disease, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 58, 762-7.
- Kitamura, K., et al. (2014), MiR-134/487b/655 cluster regulates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and drug resistance to gefitinib by targeting MAGI2 in lung adenocarcinoma cells, *Mol. Cancer Ther.*, 13, 444-53.
- Kuo, P.L., et al. (2013), MicroRNA-33a functions as a bone metastasis suppressor in lung cancer by targeting parathyroid hormone related protein, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1830, 3756-66.
- Lahdenperä, A., et al. (2011), The effect of gluten-free diet on Th1-Th2-Th3-associated intestinal immune responses in celiac disease, *Scand. J. Gastroenterol.*, 46, 538-49.
- Lai, L., et al. (2013), MicroRNA-92a negatively regulates toll-like receptor (TLR)-triggered inflammatory response in macrophages by targeting MKK4 kinase, *J. Biol. Chem.*, 288, 7956-67.
- Plaza-Izurieta, L., et al. (2015), Expression analysis in intestinal mucosa reveals complex relations among genes under the association peaks in celiac disease, *Eur. J. Hum. Genet.*, 1-6.
- Teng, G.G., et al. (2013), Let-7b Is Involved in the Inflammation and Immune Responses Associated with Helicobacter pylori Infection by Targeting Toll-Like Receptor 4, *PLoS One*, 8.

- Trenkmann, M., et al. (2013), Tumor necrosis factor α -induced microRNA-18a activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through a feedback loop in NF- κ B signaling, *Arthritis Rheum.*, 65, 916-27.
- Trynka, G., et al. (2011), Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease, *Nat. Genet.*, 43, 1193-201.
- van Heel, D.A., et al. (2007), A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21, *Nat. Genet.*, 39, 827-9.
- Wen, A.Y., et al. (2010), The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function, *J. Immunol.*, 185, 6413-9.
- Yadav, D., et al. (2008), Cutting Edge: Down-Regulation of MHC Class I-Related Chain A on Tumor Cells by IFN- γ -Induced MicroRNA, *J. Immunol.*, 182, 39-43.
- Zhang, S., et al. (2012), MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF- κ B-inducing kinase (NIK), *Oncogene*, 31, 3607-20.
- Zhao, N., et al. (2014), MicroRNA-26b suppresses the NF- κ B signaling and enhances the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells by targeting TAK1 and TAB3, *Mol. Cancer*, 13, 35.
- Zhou, R., et al. (2013), Histone Deacetylases and NF- κ B Signaling Coordinate Expression of CX3CL1 in Epithelial Cells in Response to Microbial Challenge by Suppressing miR-424 and miR-503, *PLoS One*, 8.

7. Eskerrak eta oharrak

- Ikerketa hau ISCIII (PI13/01201) ikerketa proiektuaren bitartez finantzatu da.
- Lan honen parte bat tesi egonaldiaren ondorioa izan da, eta nazioarteko kongresu batetik (ESHG, 2016) eta kongresu nazional batetik (SEEC, 2016) eratorria da.
- Egileek SGikerrek (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, EGEF eta EGIF) emandako laguntza tekniko eta gizatiarra eskertzen dute.

Analisi proteogenomikoak minbiziaren ikerkuntzan

Garin-Muga Alba¹

Guruceaga Elizabeth^{1,3}

Corrales Fernando^{1,2,3}

Segura Victor^{1,3}

¹ Proteomika eta Bioinformatika saila. Medikuntza Aplikatuko Ikerketa Zentroa (CIMA). Iruñea (Nafarroa)

² Hepatologia eta Terapia Genikoko saila. Nafarroako Unibertsitatea (UNAV). Iruñea (Nafarroa)

³ Nafarroako Osasun Ikerkuntzaren Institutua (IDISNA). Iruñea (Nafarroa)

Laburpena

Proteogenomika, proteomika eta genomika elkartzen dituen arloa, arrakastaz erabili ohi da minbizi-genometan gordetzen dituzten mutazioak identifikatzeko. Minbizi laginetan dauden mutazioak identifikatzeko gauzatu diren errendimendu handiko esperimentuek, *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) gisako proiektuen garapena ahalbidetu dute. Proiektu hauetako datuak erabiliz, proteina sekuentzien datu-baseak sor ditzazkegu eta datu-base hauetako sarrera bakoitza minbizi mota jakin batekin zerikusia duen mutaturako peptido jakin bati dagokio. Artikulu honetan, bioinformatikako lan-fluxu bat deskribatuko dugu, zeina datu-base hauek sortzeko erabiltzeaz gain minbizi-laginetako mutaturako peptidoak proteomika esperimentuetan detektatzeko erabiliko dugun. Proposatutako metodoa lau minbizi desberdinen zeluletan atondutako datu publikoak erabilia balioztatuko da.

Hitz gakoak: Proteogenomika, minbiziaren ikerkuntza, peptido mutatuak

Abstract

Proteogenomics, the field that combines genomics and proteomics, has been successfully applied to the identification of mutations present in cancer genomes. High throughput experiments for genome-wide detection of mutations in cancer samples has allowed the development of projects such as the TCGA. Using these data, we can generate protein sequence databases in which each entry corresponds to a mutated peptide associated with certain cancer types. In this article, we describe a bioinformatics workflow for creating these databases and detecting mutated peptides in cancer samples from proteomic experiments. The performance of the proposed method has been evaluated using publicly available datasets from four cancer cell lines.

Keywords: *Proteogenomics, cancer research, mutated peptides*

1 Sarrera eta motibazioa

Minbiziak, munduan gertatzen diren heriotzen eragile nagusia da, heriotza guztien %15a delarik. Bestalde, datozen bi hamarkadetan, minbiziaren erruz heriotza-indizea bikoiztu egingo dela uste da. Gaur egun 200 minbizi mota baino gehiago ezagutzen dira eta hauek, euren ezaugarri molekular eta klinikoetan oinarrituta hainbat modutan sailka daitezke (Tomczak *et al.*, 2015). Minbizi mota hauetako bat baino gehiago, DNAn sekuentzian gertatzen diren mutazioengatik eraginda daude, mutazio hauek zelulen kontrolak gabeko hazkundera hasten bait dute gaixotetan, besteak beste. Beraz, minbiziaren prebentzio eta detekzio goiztiarraz gain, tratamendua ere hobetzeko, DNAn gertatzen diren mutazio guztiak identifikatzea behar beharrezkoa da.

Gizakiaren biologia konplexua ulertzeko, giza genomaren sekuentziazioa izan zen eman zen lehenengo pausotako bat (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Azken urteotan, errendimendu handiko teknologien garapenak giza proteomaren eta genomaren ikuspegi orokorra hobeto ezagutzeko aukera eskaini digu (Chin *et al.*, 2011). Sekuentziazio masiboak (*Next-generation sequencing*, NGS) mutazio genomikoen aurkikuntza bizkortu egin du (Meyerson *et al.*, 2010; Trapnell *et al.*, 2013) eta genoma- eta exoma-osen sekuentziazioak dira gaur egun teknologia baliotsuenak giza gaixotasunen diagnosi eta tratamenduentzat, bereziki minbiziaren kasuan. Minbizi genomaren ikerkuntzan egin diren aurrerapenei esker, gaixotasun hauen inguruan karakterizazio proiektu handiak sortu dira:

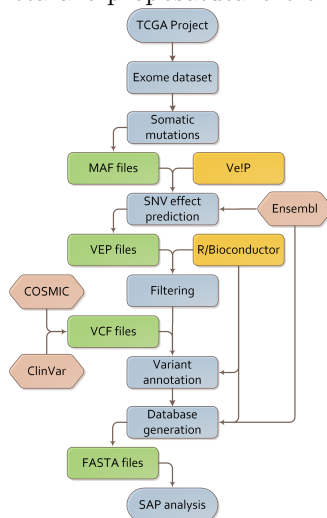
Cancer Genome Project (CGP¹), *International Cancer Genome Consortium* (ICGC²) edota *The Cancer Genome Atlas* (TCGA³) izenekoak. 2006. urtean jaio zenetik, TCGA proiektuak, errendimendu handiko sekuentziazioa erabiliz, 34 minbizi motako 10000 tumore lagin baino gehiago karakterizatu ditu jada. Bioinformatika datuak aztertu ostean, proiektu honetan 10 milioi mutazio baino gehiago identifikatu dituzte.

2 Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Proteogenomika, proteomika, genomika eta transkriptomikako ikerketa elkartzen dituen arloa da. Proteogenomikaren helburu nagusia funtzio zelularrak guztiz ulertzea da (Faulkner *et al.*, 2015; Nagaraj *et al.*, 2015). Masa-espektrometriaren (MS) bidez identifikatutako peptidoak, genomikako sekuentziazio datuekin lerrotzen dira eza-gutzen diren geneak egiaztatu edo gene berriak identifikatzeko (Ansong *et al.*, 2008). Nahiz eta hainbat esparrutan aplikatu proteogenomikako ezagupena, minbiziaren arloan egin dira aurrerapenik esanguratsuenak, hain zuzen ere, tumoreek proteoman eragindako aldaketen gaineko ikerkuntzan. Hala nola, aminoazido bakarrekiko polimorfismoek (*Single amino-acid polymorphism*, SAP) edo mutaturako peptidoek gaixotasunaren hasiera edo tratamenduarekiko erantzunean eragin dezakete (Alfaro *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Guzti honetarako, proteomikan beharrezkoak diren neurriak egindako peptido datu-baseen sorkuntza izan da minbizi datuen analisiaren fase erabakigarria. Datu-base hauek DNA edo RNA sekuentziazioak erabiliz sortu dira (Woo *et al.*, 2014; Nesvizhskii, 2014; Wang eta Zhang, 2013). Ondorioz, TCGA bezalako proiektuetan dauden datu kopuru handiak, baliabide botoretsua dira batez ere metodologia hau klinika onkologikoan ezartzeko. Ildo honetan, *Human Proteome Project* (HPP) deritzen ekimenak (Legrain *et al.*, 2011), transkriptomikako eta proteomikako datuen uztarketan jarduten du (Paik eta Hancock, 2012; Segura *et al.*, 2013) eta proteogenomikako metodoak eta erreminta bioinformatikoak garatzea da euren betebeharrak garrantzitsuenetako bat (Krasnov *et al.*, 2015; Tabas-Madrid *et al.*, 2015).

Artikulu honetan, proteogenomikarako datu-baseak sortzeko beharrekia den lan-fluxu bioinformatikoaren garapena aurkezten dugu. Lan-fluxu honen helburua, TCGA proiektuan bilduak dauden DNAko mutazioak erabiliz, minbizi laginetan dauden proteinetan jasotzen diren aminoazidoen aldaketak identifikatzea da (1 irudia).

1 Irudia: Proiektu honetarako proposatutako bioinformatikako lan-fluxua



2.1 The Cancer Genome Atlas (TCGA)

The Cancer Genome Atlas (TCGA) proiektua, *National Cancer Institute* (NCI) eta *National Human Genome Research Institute* (NHGRI) izeneko erakundeen arteko elkarlana da. Proiektu honen xede nagusia, gaixotasunen oinarri molekularrak ulertzeko, hainbat minbizi motetan gertatzen diren aldaketa genomikoak deskribatzea da (Tomczak *et al.*, 2015). Helburu hau lortzeko, etekin altuko teknologiak erabili dira, mikroarraiak edo sekuentziazio masiboa esaterako.

¹<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP>

²<https://dcc.icgc.org>

³<http://cancergenome.nih.gov>

3 Ikerketaren muina

Minbizi laginetan mutaturako peptidoak aurkitzeko, errendimendu altuko proteomikako esperimentuen analisia egin genuen TCGAko datu multzoekin sortutako FASTA datu-baseak erabiliz. Atal honetan, 4 minbizi motatako zelulen proteogenomika azterketa azaltzen dugu. Kasu honetan, *shotgun* esperimentu publikoak erabili genituen sortutako datu-baseetan mutaturako peptidoak Mascot bilatzailearekin aurkitzeko. Izan ere, gure lan-fluxu proteogenomikoa egin daitekeela eta emaitzak zentzuzkoak direla ziurtatu nahi izan genuen.

3.1 Peptido mutatuaren datu-baseen sorkuntza

Laginak aztertzen hasi baino lehen, peptido mutatuaren datu-basea sortu genuen. Hortarako, TCGAn erabilgarri dauden datuetatik, 31 minbizi motari dagozkion 10183 exoma datu erabili genituen peptido mutatuaren datu-basea sortzeko. Hiru minbizi motari dagokien exoma datuak ez zeuden eskuragarri. Gene-mutatuak dituzten artxiboak TCGAko web gunetik lortu ziren eta datu hauek gure departamentuan landutako R lengoaiako *script*-ak erabiliz prozesatu ziren. Guztira 3009480 aldaera identifikatu ziren eta hauetatik, gibeletako kartzinoma izan zen aldaera gehien (956761 mutazio) eta ubeako melanoma berriz aldaera gutxien azaldu zituen (3918 mutazio).

Mutazioen eragina aurreikusteko, prozesaturako mutazioen informazioa VEP erremintarekin osatu zen (McLaren *et al.*, 2010). VEP erremintak, geneetan gertatzen diren mutazioak aminoazidoen mailara bihurtzen ditu eta mutazio hauetako bakoitzak duen eragina bi puntuazio mota emanez deskribatzen du (Kumar *et al.*, 2009; Adzhubei *et al.*, 2010). Informazio hau erabiliz, mutazio mota guztietatik, sinonimoak ez diren mutazioak aukeratu genituen R/Bioconductor lengoia erabiliz. Mutazio hauek, genetarik proteinara doan prozesuan aminoazido aldaketa bat eragiten dutenak dira. Honen ondorioz, bariante guztietatik sinonimoak ez diren mutazioak aukeratu ostean 1161751 aldaera identifikatu genituen.

Datu-basea sortzeko, jarraian azaldutako prozesua jarraitu genuen. Lehenik eta behin, proteina sekuentzia ezagunak erabiliz (Ensembl 75. bertsioa), 80 aminoazidoz osaturako sekuentziak sortu ziren mutaturako aminoazidoaren inguruan. Ondoren, erreferentziako proteoman agertzen ez diren sekuentziak bakarrik mantendu genituen sortutako datu-basean. Osotara, 92412 proteinetan aurkitzen diren 1525055 mutaturako aminoazidoak osatzen dute gure datu-basea. Informazio hau, 19925 geneen sekuentzietatik ateratakoa zen. Gene bakoitzeko, batezbeste 77 mutaturako aminoazido identifikatu genituen. Azaleko melanoman aurkitu genituen SAP gehien (222665 mutaturako aminoazido) eta ubeako melanoman gutxien (2738 mutaturako aminoazido). Azkenik, datu hauek erabiliz, FASTA formatuko datu-basea sortu genuen, proteomikako bilaketak egiteko. Bilaketak egin ostean, guk egindako R lengoiaiko *script*-ak erabiliz, beharrezko emaitzak lortu ziren.

3.2 *Shotgun* esperimentu publikoak

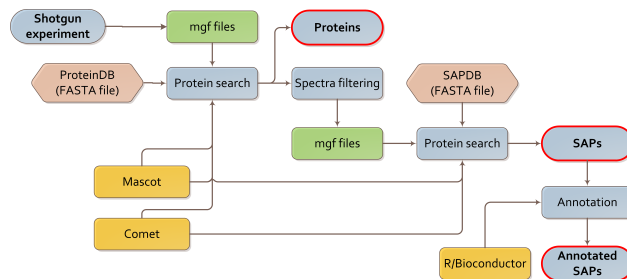
PRIDE datu-basean eskuragarri dauden lau giza minbiziren zelulen egindako esperimentuak analizatu genituen. Esperimentu hauek, Espainiako HPP ekimeneko lan taldeek ProteomeXchange biltegira PXD000039, PXD000442, PXD000443 eta PXD000449 kodeekin sartuak ziren. Minbizi mota desberdineko zelula bakoitzeko bi erreplika aukeratu genituen: Jurkat (T Linfoblasto motako giza zelulak), CCD18 (koloneko fibroblasto motako giza zelulak), MCF7 (bularreko adenokartzinoma motako giza zelulak) eta Huh7 (gibeletako kartzinoma motako giza zelulak). Adierazitako analisiak egiteko Mascot bilatzaileak erabiltzen dituen fitxategiak (*Mascot generic files*, MGF) jaitsi genituen. MGF fitxategi hauek, masa-espektrometria espektroak dituzte testu formatuan. MGF fitxategiak ProteinDB datu-basean bilatu genituen Mascot zerbitzaile bilatzailea (2.3 bertsioa, Matrix Science, London, UK) erabiliz. Bilaketa egiteko, ohiko parametroak erabili ziren. Protein mailako identifikazioek, espektro mailan positibo-faltsu tasa (*Peptide-spectrum match false discovery rate*, PSM FDR) $< 1\%$ eta protein mailan positibo-faltsu tasa (proteina *False discovery rate* FDR) $< 1\%$ irizpideak jarraitzen zituzten, C-HPP ekimenak gomendatzen duen moduan.

3.3 *Shotgun* datuen analisia

Lagin bakoitzarekin, 2. irudian ikusi daitekeen moduan, proteomikako 2 analisi egin ziren: lehenengoan, proteina ezagunen datu-base bat erabiliz, gure kasuan Ensembl proteina datu-basea (ProteinDB), eta bigarrenean, guk sortutako mutaturako peptido datu-basea erabiliz (SAPDB).

Proteinen inferentzia PAnalyzer algoritmoa erabiliz egin ziren eta eztabaidagarriak ziren proteinak alde batera baztertu ziren (Prieto *et al.*, 2012).¹ taulan, zelula mota bakoitzaren proteomikako emaitzak erakusten ditugu.

2 Irudia: *Shotgun* esperimentu publikoak erabilia, mutaturako peptidoak detektatzeko bioinformatikako lan-fluxua. Analisi atazak (urdiñez), fitxategi formatuak (berdez), datu-baseak (gorriz) eta bioinformatika erremintak (laranjaz) ikus daitezke irudian. Gorriz markaturako ertzek, lan-fluxuaren irteera adierazten dute.

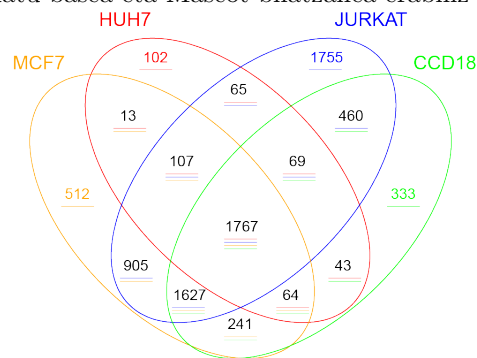


1 Taula: ProteinDB datu-basea erabiliz identifikatutako peptido, proteina eta gene kopurua (positibo-faltsu tasa (PSM FDR) < % 1, proteina mailan positibo-faltsu tasa (proteina FDR) < % 1).

	Peptidoak	Proteinak	Geneak
HUH7-1	1367	3596	1017
HUH7-2	3303	6159	1890
MCF7-1	28573	14000	4785
MCF7-2	12175	11324	3669
JURKAT-1	39433	19094	6409
JURKAT-2	36026	17888	6110
CCD18-1	17981	11581	3837
CCD18-2	17152	11005	3771

Emaizten balioztatzea sinplifikatzeko, Ensembl protein kodeak gene kodera bihurtu genituen. Guztira 8063 gene detektatu ziren, % 21.92a 4 zelula motetan eta % 33.51a zelula mota bakoitzaren berariazkoak izanda (3 irudia).

3 Irudia: ProteinDB datu-basea eta Mascot bilatzailea erabiliz identifikatutako geneak.



Ezagunak diren proteinak identifikatu ostean, analisi honetan esleitutako espektroak hasierako MGF fitxategietatik baztertu genituen. Horrela, mutaturako peptidoen bilaketa, proteina ezagunak ez direnen artean egin zen. Lagin iragaziak mutaturako peptidoen datu-basea (SAPDB) erabiliz analizatu genituen. Datu-base honek 1525055 mutaturako peptido dauzka. Honetaz gain, 3 datu-base berri sortu ziren:

- LIHC datu-basea (LIHCDB): Gibelesko kartzinomari dagokion 67694 mutaturako peptidoz osatua, Huh7 zelulak ikertzeko.
- COAD datu-basea (COADDB): Kolon-ondesteko adenokartzinomari dagokion 89771 mutaturako peptidoz osatua, CCD18 zelulak ikertzeko.
- BRCA datu-basea (BRCADB): Bularreko kartzinomari dagokion 72249 mutaturako peptidoz osatua, MCF7 zelulak ikertzeko.

2 Taula: SAPDB datu-baseak erabiliz identifikatutako peptido, protein eta gene kopurua (espektro mailan positibo-faltsuen tasa (PSM FDR) $< 1\%$). SAPDB datu-base orokorra da eta LIHCDB, COADDB eta BRCADB zelula mota bakoitzaren berariazkoak.

	PSMak	Mutatutako peptidoak (SAP)	Mutatutako proteinak	Mutatutako geneak	datu-basea
HUH7-1	5	5	9	4	LIHCDB
HUH7-2	6	5	9	5	LIHCDB
MCF7-1	115	97	218	68	BRCADB
MCF7-2	22	8	24	5	BRCADB
CCD18-1	65	19	64	10	COADDB
CCD18-2	82	33	78	21	COADDB
HUH7-1	134	50	107	35	SAPDB
HUH7-2	153	105	225	70	
MCF7-1	1972	1627	1093	343	
MCF7-2	27	22	63	12	
CCD18-1	907	316	581	179	
CCD18-2	1238	466	841	256	
JURKAT-1	1111	690	1150	332	
JURKAT-2	554	364	795	239	

Jurkat zelulak ikertzeko, SAPDB datu-basea orokorra bakarrik erabili zen, mutazio informazio faltagatik, ez zegoelako berariazko datu-baserik egiteko aukerarik.

Mascot zerbitzariarekin bilaketak egin ziren, ohiko parametroak erabiliz, baina kasu honetan espektro mailan positibo-faltsu tasa (PSM FDR) $< 1\%$ bakarrik erabili zen mutatatutako peptidoak identifikatzeko. 2 taulan ikus daitezke lortutako emaitzak.

Iragazi ostean espektro kopurua handia izan arren, identifikatutako emaitzak, mutatatutako peptido, proteina eta geneei dagokienez, eskasak izan ziren. Emaitz hauek espero diren mutatatutako peptidoen ugaritasun bajearekin eta masa-espektrometria esperimenteren zorizkotasunarekin bat egiten dute. SAPDB eta zelula mota bakoitzarekiko datu baseekin, emaitzak alderatu genituen, 4. irudian ikus daitekeen moduan. Bestalde, SAPDB orokorra erabiliz identifikazio gehiago lortu genituen zelula mota bakoitzaren berariazko datu-baseekin alderatuz. Gainera, aipagarria iruditzen zaigu mutatatutako gene kopuruaren apaltasuna, mutatatutako peptidoekin alderatuta, baina gertaera hau gene bakoitzeko mutazio asko daudelako izan daiteke.

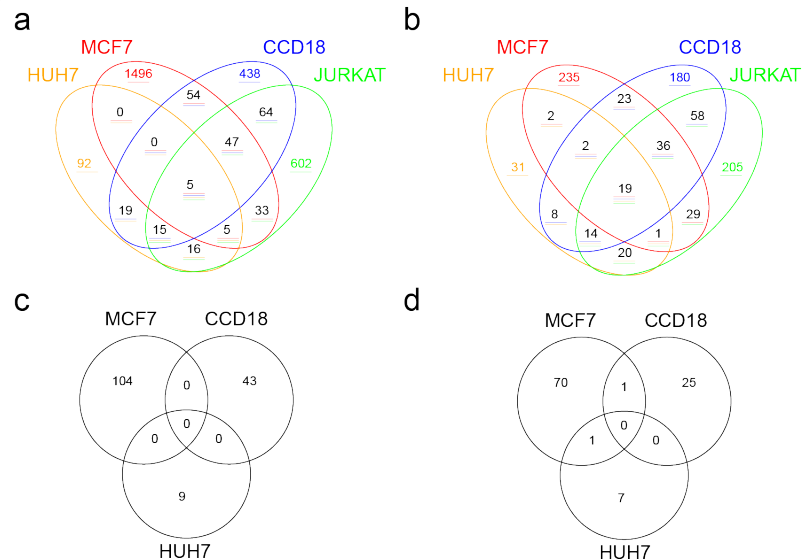
5. irudian ikus daitekeen moduan SAPDB orokorra eta zelula mota bakoitzaren berariazko datu-baseen arteko antzekotasuna nabaria da. Espero zen bezala, zelula mota bakoitzeko, identifikatutako mutatatutako peptido gehienak bi datu-baseak erabilitakoan agertzen ziren. Halere, mutatatutako peptido batzuk beste zelula motetan agertzen ziren eta ez ziren datu-base analisi bietan agertzen. Honen arrazoiak datu-basearen tamainak positibo-faltsuen tasan duen eraginagatik edo hainbat minbizi motek mutazio berak konpartitzen dituztelako izan daiteke.

Laburbilduz, lan honetan 2916 mutatatutako peptido (877 mutatatutako gene) identifikatu ditugu 4 minbizia motatako zeluletan. Mutatatutako gene multzoak ikertutako minbizia mota bakoitzean duen eragina aztertu genuen. Hortarako, mutatatutako geneen analisi funtzionala egin genuen Ingenuity erreminta erabiliz. Mutatatutako gene guztietatik, gehienak minbiziari dagokion kategoriarekin erlazionatuta zeuden. Gainera, aberastuta dauden gaitasunen artean, "bularreko edo kolon minbizia", "kolon minbizia", "gibeleko minbizia", "hepatokartzinoma" eta "neoplasia hematologikoa" aurkitu genituen. Gure ustez emaitza hau oso garrantzitsua da, identifikatutako mutazioak ikertutako minbizi motekin erlazionatuta daudela egiaztatzen duelako.

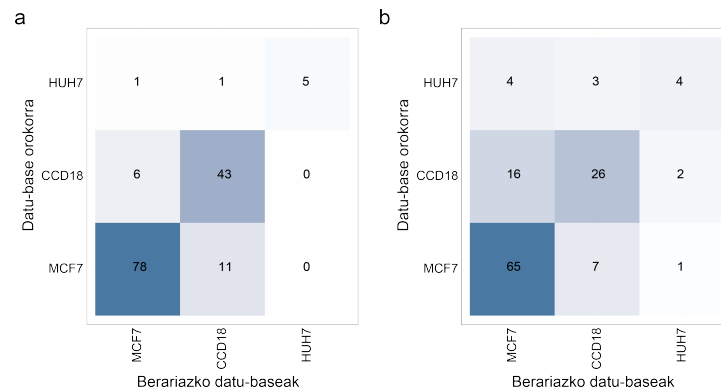
4 Ondorioak

Artikulu honetan, minbizi laginetan mutatatutako peptidoak detektatzeko bioinformatikako lan-fluxua deskribatzen dugu. TCGA proiektuko mutazioez baliatuz, datu-base proteogenomikoak sortu genituen, 31 minbizi mota desberdinei dagokien datuak erabiliz. Datu-base hauek, 4 minbizi mota desberdinetako zelulak *shotgun* esperimenteren bilaketan erabili genituen, peptido mutatuak bilatzeko. Lortutako emaitzak funtzionaliki ikertu ziren eta minbizian, eta batez ere guk ikertzen ditugun minbizi motetan, duen eragina egiaztatu genuen. Ikerketa honek, minbizi laginetan mutatatutako peptidoak detektatzeko proteogenomikaren balioetasun garrantzitsua baieztatzen du.

4 Irudia: SAPDB orokorra (SAPDB) eta berariazko DBak erabiliz ikusitako mutaturako peptidoak eta geneak laburbiltzen dituen diagramak. a) Mutaturako peptido kopurua SAPDB datu-basea erabiliz. b) Mutaturako gen kopurua SAPDB datu-basea erabiliz. c) Mutaturako peptido kopurua zelula-lerro bakoitzeko berariazko datu-baseak erabiliz. d) Mutaturako gene kopurua zelula-lerro bakoitzeko berariazko datu-baseak erabiliz.



5 Irudia: Mutazioen arteko antzekotasunak erakusten dituen *heatmapa*. a) Zelula-lerroen artean konpartitzen dituzten mutaturako peptidoak. b) Zelula-lerroen artean konpartitzen dituzten mutaturako geneak.



5 Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Minbizia ikertzeko genomikako sekuentziazioek minbizi genomaren konplexutasuna eta heterogeneitatea erakutsi digute. Teknika honen bitartez, existitzen diren mutazio kopurua handia dela ikusi dugu azken urteotan. Honekin batera, proteinak zelula-funtzioan garrantzitsuak dira eta mutaturako geneak sortzen dituzten proteinek euren funtzioa aldatuta izaten dute. Hori dela eta, mutaturako proteinek tumoreen hasiera, progresioa eta tratamenduaren erantzuna gidatzen dute. Beraz, proteomikaren bidez, genomikaren ikuskeraren mutazioek duten eragina baieztatu daiteke. Alabaina, peptidoen bilaketak egiteko erabiltzen diren proteomikako datu-baseak, ezagunak diren proteinek barneratzen dituzte eta hau honela izanik, mutaturako peptidoak bilatzeko ez dute balio handirik. Horregatik, mutaturako geneetatik sortutako proteina datu-baseak sortzea ezin bestekoa da mutaturako peptidoak bilatzeko. Genomika bakarrik erabiliz, proteinak izango duen eragina aurrean dezakegu baina, osteraz, proteogenomikaren bidez, mutaturako peptidoak ikus ditzakegu ere.

Aurrerantzean, artikulua honetan proposatutako lan-fluxua zehaztasuneko medikuntzan erabiltzea da gure

nahia. Horretarako, pazienteen datuak jasoko ditugu, hauen DNA genomikoa sekuentziatuko dugu eta pazien-
teek dituzten gene mutazioak kontuan hartuta, hauek sortzen dituzten peptido mutatuak masa-espektrometria bidez
ikertuko ditugu. Honek, gure lan-fluxuari balioa emango dio zalantzarik gabe.

Erreferentziak

- ADZHUBEI, IVAN A, STEFFEN SCHMIDT, LEONID PESHKIN, VASILY E RAMENSKY, ANNA GERASIMOVA, PEER BORK, ALEXEY S KONDRASHOV, eta SHAMIL R SUNYAEV. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* 7.248–249.
- ALFARO, JAVIER A, ANKIT SINHA, THOMAS KISLINGER, eta PAUL C BOUTROS. 2014. Onco-proteogenomics: cancer proteomics joins forces with genomics. *Nature methods* 11.1107–1113.
- ANSONG, CHARLES, SAMUEL O PURVINE, JOSHUAÑ ADKINS, MARY S LIPTON, eta RICHARD D SMITH. 2008. Proteogenomics: needs and roles to be filled by proteomics in genome annotation. *Briefings in functional genomics & proteomics* 7.50–62.
- CHIN, LYNDY, WILLIAM C HAHN, GAD GETZ, eta MATTHEW MEYERSON. 2011. Making sense of cancer genomic data. *Genes & development* 25.534–555.
- FAULKNER, SAM, MATTHEW D DUN, eta HUBERT HONDERMARCK. 2015. Proteogenomics: emergence and promise. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72.953–957.
- KRASNOV, GEORGE SERGEEVICH, ALEXEY ALEXANDROVICH DMITRIEV, ANNA VIKTOROVNA KUDRYAVTSEVA, ALEXANDER VALERIEVICH SHARGUNOV, DMITRY SERGEEVICH KARPOV, LEONID ANDREEVICH UROSHLEV, NATALYA VLADIMIROVNA MELNIKOVA, VLADIMIR MIKHAILOVICH BLINOV, EKATERINA VLADIMIROVNA POVERENNAYA, ALEXANDER IVANOVICH ARCHAKOV, eta OTHERS. 2015. Ppline: An automated pipeline for snp, sap, and splice variant detection in the context of proteogenomics. *Journal of proteome research* 14.3729–3737.
- KUMAR, PRATEEK, STEVEN HENIKOFF, eta PAULINE C NG. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the sift algorithm. *Nature protocols* 4.1073–1081.
- LANDER, ERIC S, LAUREN M LINTON, BRUCE BIRREN, CHAD NUSBAUM, MICHAEL C ZODY, JENNIFER BALDWIN, KERI DEVON, KEN DEWAR, MICHAEL DOYLE, WILLIAM FITZHUGH, eta OTHERS. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409.
- LEGRAIN, PIERRE, RUEDI AEBERSOLD, ALEXANDER ARCHAKOV, AMOS BAIRROCH, KUMAR BALA, LAURA BERETTA, JOHN BERGERON, CHRISTOPH H BORCHERS, GARRY L CORTHALS, CATHERINE E COSTELLO, eta OTHERS. 2011. The human proteome project: current state and future direction. *Molecular & cellular proteomics* 10.M111–009993.
- MCCLAREN, WILLIAM, BETHAN PRITCHARD, DANIEL RIOS, YUAN CHEN, PAUL FLICEK, eta FIONA CUNNINGHAM. 2010. Deriving the consequences of genomic variants with the ensembl api and snp effect predictor. *Bioinformatics* 26.2069–2070.
- MEYERSON, MATTHEW, STACEY GABRIEL, eta GAD GETZ. 2010. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 11.685–696.
- NAGARAJ, SHIVASHANKAR H, NICOLA WADDELL, ANIL K MADUGUNDU, SCOTT WOOD, ALUN JONES, RAMYA A MANDYAM, KATIA NONES, JOHN V PEARSON, eta SEAN M GRIMMOND. 2015. Pgtools: a software suite for proteogenomic data analysis and visualization. *Journal of proteome research* 14.2255–2266.
- NESVIZHSHII, ALEXEY I. 2014. Proteogenomics: concepts, applications and computational strategies. *Nature methods* 11.1114–1125.
- PAIK, YOUNG-KI, eta WILLIAM S HANCOCK. 2012. Uniting encode with genome-wide proteomics. *Nature biotechnology* 30.1065.
- PRIETO, GORKA, KERMÁN ALORIA, NEREA OSINALDE, ASIER FULLAONDO, JESÚS M. ARIZMENDI, eta RUNE MATTHIESEN. 2012. Panalyzer: A software tool for protein inference in shotgun proteomics. *BMC Bioinformatics* 13.288.
- SEGURA, VÍCTOR, JUAN ALBERTO MEDINA-AUNON, MARIA I MORA, SALVADOR MARTÍNEZ-BARTOLOMÉ, JOAQUÍN ABIAN, KERMÁN ALORIA, ORETO ANTÚNEZ, JESÚS M ARIZMENDI, MIKEL AZKARGORTA, SILVIA BARCELÓ-BATLLORI, eta OTHERS. 2013. Surfing transcriptomic landscapes. a step beyond the annotation of chromosome 16 proteome. *Journal of proteome research* 13.158–172.

- TABAS-MADRID, DANIEL, JOAO ALVES-CRUZEIRO, VICTOR SEGURA, ELIZABETH GURUCEAGA, VITAL VIALAS, GORKA PRIETO, CARLOS GARCÍA, FERNANDO J CORRALES, JUAN PABLO ALBAR, eta ALBERTO PASCUAL-MONTANO. 2015. Proteogenomics dashboard for the human proteome project. *Journal of proteome research* 14.3738–3749.
- TOMCZAK, KATARZYNA, PATRYCJA CZERWIŃSKA, eta MACIEJ WIZNEROWICZ. 2015. The cancer genome atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge. *Contemporary Oncology (Pozn)* 19.A68–A77.
- TRAPNELL, COLE, DAVID G HENDRICKSON, MARTIN SAUVAGEAU, LOYAL GOFF, JOHN L RINN, eta LIOR PACHTER. 2013. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with rna-seq. *Nature biotechnology* 31.46–53.
- VENTER, J CRAIG, MARK D ADAMS, EUGENE W MYERS, PETER W LI, RICHARD J MURAL, GRANGER G SUTTON, HAMILTON O SMITH, MARK YANDELL, CHERYL A EVANS, ROBERT A HOLT, eta OTHERS. 2001. The sequence of the human genome. *science* 291.1304–1351.
- WANG, XIAOJING, eta BING ZHANG. 2013. customprodb: an r package to generate customized protein databases from rna-seq data for proteomics search. *Bioinformatics* p. btt543.
- WOO, SUNGHEE, SEONG WON CHA, SEUNGJIN NA, CLARK GUEST, TAO LIU, RICHARD D SMITH, KARIN D RODLAND, SAMUEL PAYNE, eta VINEET BAFNA. 2014. Proteogenomic strategies for identification of aberrant cancer peptides using large-scale next-generation sequencing data. *Proteomics* 14.2719–2730.
- ZHANG, BING, JING WANG, XIAOJING WANG, JING ZHU, QI LIU, ZHIAO SHI, MATTHEW C CHAMBERS, LISA J ZIMMERMAN, KENT F SHADDOX, SANGTAE KIM, eta OTHERS. 2014. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 513.382–387.

6 Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau hurrengo erakundeek lagundu dute:

- Nafarroako Gobernuko Osasun Saileko 33/2015 proiektua (V Segura)
- Espainiako Zientzia eta Berrikuntza Ministerioko DPI2015-68982-R diru-laguntza (V Segura)
- PRBB eta Carlos III Nazioarteko Osasun Institutua, PRBB-ISCIH'
- Espainiako Zientzia eta Berrikuntza Ministerioko SAF2014-5478-R diru-laguntza (F Corrales)
- ISCIH-RETIC RD06/0020 (F Corrales)

Miren Josu Omaetxebarria (UPV-EHU) eta Xabier Aguirreri (CIMA-UNAV) euskera zuzendu eta gure artikulua irakurtzeko denbora hartzeagatik. Mila esker!

Faktore genetikoak eta iskiotibialetako lesio muskularrak goi-mailako futbolarietan: asoziazio eta balioztatze ikerketa

Jon Larruskain¹, David Celorrio², Irantzu Barrio¹, Adrian Odriozola¹, Susana M Gil¹, Juan Ramon Fernandez-Lopez³, Raul Nozal³, Isusko Ortuzar⁴, Jose A Lekue^{1,4}, Jose M Aznar²

1: Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 2: BAIGENE, 3: Kirolene, 4: Athletic Club
jlarruskain@hotmail.com

Laburpena

Helburua 25 nukleotido bakarrekoko polimorfismoren (SNP), adinaren eta aurretiko lesioen, eta futboleko ohikoenak diren iskiotibialetako lesioen arteko asoziazioa ikertzea izan zen 5 denboralditan goi-mailako futbolarietan; lesio arriskua zenbatesteko eredu bat sortzeko eta lesio berriak auresateko gaitasuna denboraldi independente batean aztertzeko. 24 urte edo gehiago, eta *MMP3* rs679620 AA, *TNC* rs2104772 AA, *IL6* rs1800795 GG, *NOS3* rs1799983 GG, eta *HIF1A* rs11549465 CC genotipoak lesionatzeko arrisku handiagoarekin erlazionatu ziren. Ereduak ez zuen lesio berriak auresateko gaitasuna eduki (C indizea=0.52). Etorkizunean beharrezkoa da genoma osoa aztertzeko teknikak erabiltzea, eta aldagai genetikoak beste faktore batzuekin batera aztertzea eredu multifaktorialetan.

Hitz gakoak: genetika, iskiotibialak, lesioak, futbola, auresatea

Abstract

*The aim was to investigate the association of 25 single nucleotide polymorphisms (SNP), age, and previous injury with hamstring injuries, the most frequent injury in football, over 5 seasons in elite football players; and to create a model to estimate the risk of injury and test its predictive ability in an independent season. Players older than 24 years, and those with the *MMP3* rs679620 AA, *TNC* rs2104772 AA, *IL6* rs1800795 GG, *NOS3* rs1799983 GG, and *HIF1A* rs11549465 CC genotypes were at a higher risk of injury. The model had no ability to predict future injuries (C index=0.52). Future studies should use whole-genome screening methods, and investigate genetic variants in combination with other risk factors in multifactorial models*

Keywords: genetics, hamstrings, injury, football, prediction

1. Sarrera eta motibazioa

Futbolaren praktikak osasunerako onura anitz dakartza, baina lesioak pairatzeko arriskua handitzen du ere. Lesioek taldeen errendimendua jaisten dute, koste ekonomiko handiak dituzte, eta futbolarien kirol bizitza murrizteaz gain, epe luzeko osasunean eta bizi kalitatean eragin kaltegarria eduki dezakete. Iskiotibialetako lesio muskularra, izterraren atzealdeko muskuluen gainkarga edo haustura, lesiorik ohikoena da goi-mailako futboleko. Beraz, lesio hau jasateko arriskuan dauden jokalariek identifikatzea eta lesioen prebentziora bideratutako esku-hartzeak garatzea beharrezkoa da. Horretarako lehen urratsa iskiotibialetako lesioen arrisku faktoreak ikertzea da.

Orain arte egindako ikerketetan iskiotibialetako lesioekin indartsuen erlazionatu den faktorea aurretiko iskiotibialetako lesioa da. Beste arrisku faktore batzuei dagokienez, hala nola, adin handiagoa, iskiotibialetako malgutasun murriztua, iskiotibialetako indar baxua, indar desorekak edota nekea, ebidentzia mugatua da edo kontraesanekin (van Beijsterveldt et al., 2013).

Gainera, aurreko ikerketek genetikak lesioetan eragina izan dezakeela iradoki dute. Hainbat nukleotido bakarrekoko polimorfismo (single nucleotide polymorphism edo SNP, DNA sekuentzian ematen diren nukleotido bakarrekoko aldaketak), kirol lesio ezberdinekin erlazionatuak izan dira kasu-kontrol ikerketa erretrospektiboetan, batez ere belauneko aurreko lotailu gurutzatuaren hausturarekin eta Akilesen tendinopatiarekin. SNP hauek ehun muskuloeskeletikoa osatzen duten proteina estrukturalak edo erregulatzailak kodifikatzeaz arduratzen diren geneetan daude kokatuta, hala nola, *COL1A1*, *COL5A1*, *ACAN*, *TNC*, *MMP3*, etab. Hau dela eta, polimorfismo jakin batek geneak sortutako proteinaren ezaugarri estrukturalak edo funtzionalak moldatu ditzake, lesionatzeko arriskua handituz edo gutxituz (Collins et al., 2015).

Era berean, SNP hauek muskuluaren egituraren edo funtzionamenduan zer esana eduki dezakete, eta ondorioz, lesio muskular bat jasateko aukeretan eragin. Hala ere, orain arte ez da ikertua izan aldagai genetikoaren eta iskiotibialetako lesioen arteko erlazioa. Hau beharrezkoa da iskiotibialetako lesioen kausa biologikoetan sakontzeko, eta arriskuan dauden jokalariai identifikatzeko test edo frogak garatzeko. Alabaina, gaur egun ez dago lesioak aurreikusteko ahalmena duen frogarik (Bahr, 2016). Lesionatzeko arriskuan dauden jokalariai identifikatzeko testek informazio baliotsua emango lukete prebentzio esku-hartzeak norbanakoaren beharretara egokitzeko, eta futboleko dihardutenen kirol praktika eta bizi estilo osasuntsuak bultzatzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Orain arte, ez da ikertua izan aldagai genetikoaren eta iskiotibialetako lesioen arteko erlazioa, ezta ere froga genetikoaren baliagarritasuna arriskuan dauden jokalariai identifikatzeko. Beraz, ikerketaren helburuak hurrengoak izan ziren: (1) aurretik beste lesio batzuekin erlazionatutako SNP-en eta iskiotibialetako lesioen arteko asoziazioa ikertzea hainbat denboralditan, eta (2) lesionatzeko arriskuan dauden jokalariai identifikatzeko eredu estatistikoa bat eratzea, eta honen lesioak auresateko gaitasuna denboraldi independente batean aztertzea.

3. Ikerketaren muina

3.1 Metodoak

Lagina eta diseinu esperimentalak

Ikerketan Athletic Club-eko 107 zelaiko jokalarik hartu zuten parte, denak gizonezkoak. Jokalarien erreklutamendua eta listu laginen bilketa 2014-2015 denboraldiaren hasieran burutu zen. Une hartan 27 jokalaria lehen taldekoak ziren, 42 Bilbao Athletic eta Basconia-koak, 36 gazte mailakoak eta 2 jokalaria ohiak. Jokalari hauek era prospektiboan jarraituak izan ziren 2010-2011 denboralditik 2015-2016 denboraldira. Ikerketa bi fasetan banandu zen: (1) aurkikuntza fasean, 2010-2011 eta 2014-2015 denboraldien artean, arrisku faktoreen eta iskiotibialetako lesioen arteko erlazioa aztertu zen, lesio arriskua zenbatesteko eredu bat sortzeko asmoarekin; eta (2) balioztatze fasean, 2015-2016 denboraldian, ereduak lesio berriak auresateko zuen gaitasuna ikertu zen.

Lesioen eta esposizio denboraren erregistroa

Klubaren talde medikuak denbora galera eragin zuten lesioak FIFA-k gomendatutako argibideak jarraituz erregistratu zituen (Fuller et al., 2006). Analisisirako kontaktu gabeko egoeretan gertatutako iskiotibialetako lesio muskularrak aukeratu ziren. Zerbitzu medikuak eta entrenatzaileek egunero jokalaria bakoitzak entrenamendu eta partiduetan parte hartutako denbora minututan erregistratu zuten.

Genotipatzea

Ikerketarako 25 SNP aukeratu ziren, aurretiaz beste lesio muskuloeskeletiko batzuekin erlazionatutakoak (Rahim et al 2016). Listu laginak ahoko hisopoekin lortu ziren (4N6FLOQSwab, Life Technologies). DNA erauzketa QIAmp DNA Mini kitarekin burutu zen (Qiagen), eta fluorimetria bidez kuantifikatu zen (Qubit, Life Technologies). DNA laginak Biomark HD sisteman genotipatu ziren SNP type probak erabilita (Fluidigm). Genotipatzea UPV/EHU-ko Ikerkuntzarako Zerbitzu Orokorretako (SGIker) Sekuentziazio eta Genotipo Azterketen Zerbitzuak burutu zuen.

Analisi estatistikoa

Iskiotibialetako lesioen eta arrisku faktoreen arteko asoziazioa Cox-en arrisku proportzionalen erregresioaren bidez aztertu zen frailty luzapenarekin, R v.3.2.3 software estatistikoa erabilita (R Core Team 2015, R Foundation for Statistical Computing). Eredu estatistikoa honek jokalaria bakoitzak esposizio denbora (esposizio orduak denboraldi bakoitzean) ezberdina duela kontuan hartzen du, eta frailty luzapenak jokalaria berdinen behaketan arteko

korrelazioa aintzat hartzen du (Ullah et al., 2014). Jokalari bakoitzaren jarraipena denboraldi bakoitzaren hasieran hasten zen. Jokalari batzuek lesionatu gabe igaro zezaketen denboraldia, eta beste batzuek, ordea, lesio bat edo gehiago jasan.

Lehenbizi, aurkikuntza faseko datuekin, arrisku faktore bakoitzaren (25 SNP, adina, aurretiko iskiotibialetako lesioak), eta iskiotibialetako lesioen arteko erlazioa aztertu zen banan-banan. Jarrain, $P < 0.25$ erakutsi zuten aldagaiekin Cox-frailty erregresio multiple bat eratu zen, aldagaien aukeraketa pausoka eta aurrerantz eginda. Hazard ratioak (HR, adb. SNP baten kasuan, zenbat aldiz den handiagoa genotipo bat duten jokalarien lesionatzeko arriskua, beste genotipoak dituzten jokalariekin alderatuta) eta % 95-eko konfiantza tarteak kalkulatu ziren. Asoziazio hauek grafikoki irudikatu ziren Kaplan-Meier biziraupen kurben bidez GraphPad Prism v.6.0c erabilita (GraphPad Software). Esangarritasun estatistikoaren maila $P < 0.05$ -en ezarri zen.

Azkenik, Cox-frailty ereduaren bidez jokalari batek lesionatzeko duen arriskua kalkulatu daiteke lagineko batezbesteko jokalariairekin alderatuta. Ereduaren auresate gaitasuna aurkintza eta balioztatze faseetan aztertu zen Harrell-en C indizea erabilita. Indize honek, jokalari aleatorio bi konparatzen direnean, lesionatuko den jokalaria arrisku puntuazio altuagoa duena izateko probabilitatea zenbatesten du. 0.5 inguruko emaitzek ereduaren zorizko hautaketa bat bezain ona dela adierazten dute. Ostera, 1 inguruko indizeek ereduak lesionatzeko arrisku handiagoa duten jokalaria ia beti identifikatzen dituela adierazten dute (Harrell et al., 1996).

3.2 Emaitzak

Aurkikuntza fasean 413 behaketa eta 129 iskiotibialetako lesio egon ziren (107 jokalari), eta balioztatze fasean 98 behaketa eta 31 iskiotibialetako lesio (67 jokalari). Iskiotibialetako lesioen intzidentzia 1.64/1000 ordu izan zen. 7 SNP eta adina iskiotibialetako lesioekin era indibidualean erlazionatuak egon ziren (1. taula). Aldagai anitzeko Cox-frailty eredu estatistikoan 5 SNP eta adina lesionatzeko arriskuarekin asoziatu ziren (2. taula). Aldagai hauen Kaplan-Meier biziraupen kurbak 1. irudian erakusten dira. Emaitza hauen arabera 24 urte baino gehiago izatea, eta *MMP3* (matrizearen metaloproteinasa-3) rs679620 AA, *TNC* (tenaszina-C) rs2104772 AA, *IL6* (interleukina-6) rs1800795 GG, *NOS3* (oxido nitriko sintasa-3) rs1799983 GG, eta *HIF1A* (hipoxiak eragin lezakeen-1a faktorea) rs11549465 CC genotipoak iskiotibialetako lesioak pairatzeko arrisku handiagoarekin erlazionatu ziren. Azkenik, aldagai anitzeko ereduak auresate gaitasun onargarria erakutsi zuen aurkikuntza fasean (C indizea=0.74), baina ez balioztatze fasean (C indizea=0.52).

4. Ondorioak

107 goi-mailako futbolari 6 denboralditan zehar aztertu eta gero, 5 SNP eta adina iskiotibialetako lesio arriskuarekin asoziatu ziren aldagai anitzeko Cox-frailty eredu batean. 5 gene hauek muskuluaren egituraren eta funtzionamenduaren erregulazioan parte hartzen duten proteinak kodifikatzen dituzte, eta SNP-ak funtzionalak direnaren ebidentzia dago, proteinaren kantitatea, egitura edo funtzionamendua aldatu dezaketelarik (Rahim et al., 2016). Hala ere, ikusitako asoziazioen arrazoiak ezagutzeko ikerketa mekanistikoaren beharra dago.

Aldez aurretik, SNP hauen eta beste lesio batzuen erlazioa ikertua izan da. Iskiotibialetako lesio arrisku handiagoarekin asoziatutako *TNC* rs2104772 A aleloa eta *IL6* rs1800795 G aleloa Akilesen tendinopatiarekin erlazionatuak izan dira. Alderantziz, ez zen erlazorik aurkitu Akilesen tendinopatiaren eta *MMP3* rs679620 eta *NOS3* rs1799983-ren artean; ezta ere aurreko lotailu gurutzatuaren hausturaren eta *MMP3* rs679620 eta *HIF1A* rs11549465-en artean (Gibbon et al., 2016; Rahim et al., 2016). Ikerketa honen emaitzen aurka, ez zen erlazorik aurkitu lesio muskularren eta *MMP3* rs679620 eta *TNC* rs2104772-ren artean (Pruna et al., 2016). Adinari dagokionez, nagusiagoak diren jokalaria arrisku handiagoan egon daitezke adinarekin erlazionatutako aldaketak direla medio, edo aurretiko iskiotibialetako lesioak edukitzeko aukera handiagoak dituztelako (van Beijsterveldt et al., 2013).

1. taula. Aldagai genetiko eta ez genetikoaren asoziazio indibiduala iskiotibialetako lesioekin goi-mailako futbolarietan.

Genea	SNP/aldaia	Arrisku handiagoa*	vs. Arrisku txikiagoa	HR (95% CI)	P balioa
<i>MMP3</i>	rs679620	A	G	1.79 (1.27-2.51)	0.001
<i>COL5A1</i>	rs16399	DI	DD+II	1.83 (1.13-2.97)	0.01
<i>MMP1</i>	rs1799750	DD+DI	II	2.05 (1.13-3.74)	0.02
<i>NOS3</i>	rs1799983	G	T	1.43 (1.02-1.99)	0.04
<i>DCN</i>	rs516115	A	G	1.51 (1.02-2.22)	0.04
<i>HIF1A</i>	rs11549465	CC	CT	2.32 (1.03-5.20)	0.04
<i>MMP12</i>	rs2276109	A	G	1.62 (0.99-2.64)	0.05
<i>CASP8</i>	rs3834129	DD	DI+II	1.62 (0.98-2.67)	0.06
<i>COL5A1</i>	rs12722	TC+CC	TT	1.59 (0.90-2.80)	0.11
<i>TNC</i>	rs2104772	A	T	1.35 (0.92-1.99)	0.12
<i>COL1A1</i>	rs1107946	C	A	1.68 (0.80-3.50)	0.17
<i>VEGFA</i>	rs2010963	GG+GC	CC	4.48 (0.49-40.52)	0.18
<i>ADAMTS5</i>	rs226794	GA+AA	GG	1.44 (0.83-2.48)	0.20
<i>ACAN</i>	rs1516797	TG+GG	TT	1.37 (0.82-2.28)	0.23
<i>ADAMTS2</i>	rs1054480	CT+TT	CC	1.35 (0.82-2.21)	0.24
<i>IL6</i>	rs1800795	GG	GC+CC	1.33 (0.81-2.18)	0.25
<i>GDF5</i>	rs143383	TT+CC	TC	1.33 (0.81-2.19)	0.26
<i>COL12A1</i>	rs970547	AA+AG	GG	2.11 (0.53-8.40)	0.29
<i>TIMP2</i>	rs4789932	CC+TT	CT	1.21 (0.73-1.99)	0.46
<i>IL6R</i>	rs2228145	AA+AC	CC	1.24 (0.69-2.24)	0.46
<i>ADAMTS14</i>	rs4747096	AG	AA	1.22 (0.71-2.08)	0.47
<i>EMILIN1</i>	rs2289360	GG+AA	GA	1.19 (0.71-1.97)	0.51
<i>COL1A1</i>	rs1800012	G	T	1.09 (0.75-1.60)	0.64
<i>IL1A</i>	rs1800587	T	C	1.07 (0.73-1.56)	0.72
<i>IL1B</i>	rs1143634	CC+TT	CT	1.03 (0.61-1.76)	0.90
	Adina (urteak)	≥ 24	≤ 23	2.33 (1.30-4.17)	0.004
	Aurretiko lesioak	Bai	Ez	1.19 (0.80-1.75)	0.34

HR: hazard ratio, zenbat aldiz den handiagoa lesionatzeko aukera arrisku handiagoko taldean arrisku baxuagoko taldearekin alderatuta. SNP: single nucleotide polymorphism. CI: konfiantza tarte. I: txertatzea (insertion), D: ezabaketa (deletion).

*Aleloak konparatzen direnean HR-a gehigarria da, hau da, arrisku aleloaren 2 kopia edukitzeak HR-a bikoizten du babes aleloaren 2 kopia dutenekin alderatuta.

Nahiz eta behatutako erlazioen kausa ezezaguna izan, sortutako eredu estatistikoa jokalaria batek lesionatzeko duen arriskua kalkulatzeko erabili daiteke. Horrelako tresna bat oso erabilgarria izan daiteke jokalaria arrisku taldeetan sailkatzeko, eta prebentzio estrategien inguruko erabakiak hartzeko. Hala eta guztiz ere, ereduak ez zuen lesionatzeko arriskuan zeuden jokalaria identifikatzeko gaitasunik erakutsi, eta ez zen zorizko hautaketa bat baino hobeia izan etorkizuneko lesioak auresaterakoan.

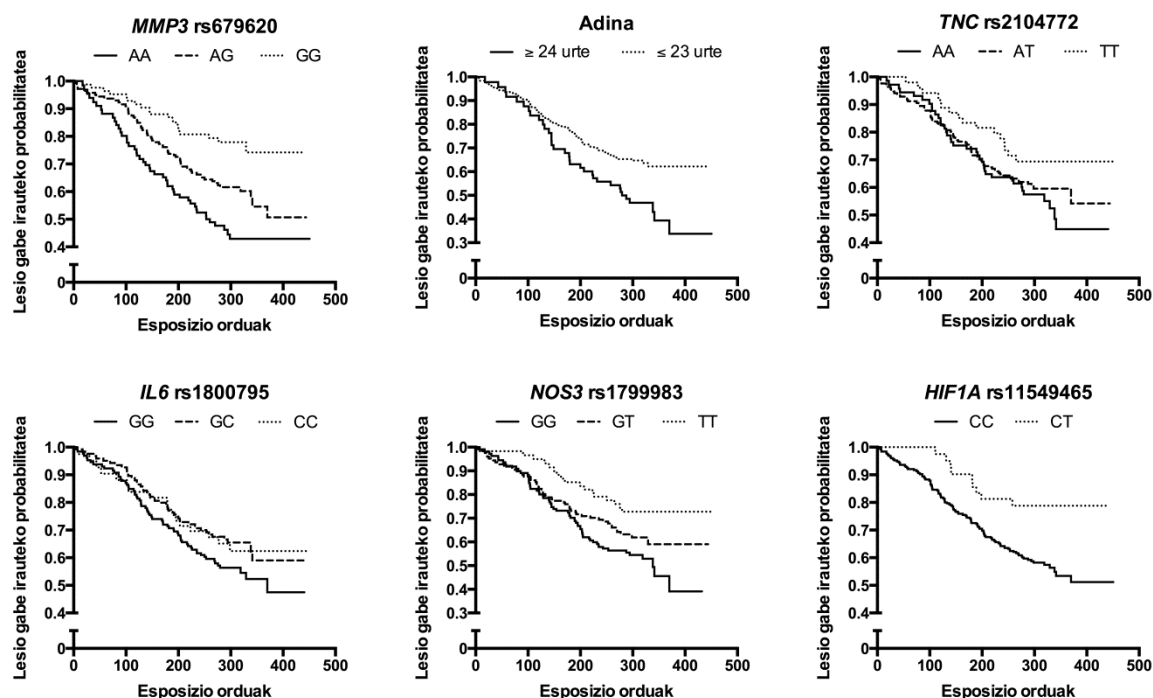
2. taula. Iskiofibialetako lesioak jasateko arriskua zenbatesteko aldagai anitzeko Cox-frailty eredua goimailako futbolarietan.

Genea	SNP/aldagaia	Arrisku handiagoa*	vs. Arrisku txikiagoa	HR (95% CI)	P balioa
<i>MMP3</i>	rs679620	A	G	2.06 (1.51-2.81)	6.2×10^{-6}
	Adina (urteak)	≥ 24	≤ 23	2.10 (1.29-3.42)	0.003
<i>TNC</i>	rs2104772	A	T	1.65 (1.17-2.32)	0.004
<i>IL6</i>	rs1800795	CC	GC+CC	1.68 (1.11-2.53)	0.01
<i>NOS3</i>	rs1799983	G	T	1.35 (1.01-1.79)	0.04
<i>HIF1A</i>	rs11549465	CC	CT	2.08 (1.00-4.29)	0.05

HR: hazard ratio, zenbat aldiz den handiagoa lesionatzeko aukera arrisku handiagoko taldean arrisku baxuagoko taldearekin alderatuta. SNP: single nucleotide polymorphism. CI: konfiantza tartea.

*Aleloak konparatzen direnean HR-a gehigarria da, hau da, arrisku aleloaren 2 kopia edukitzeak HR-a bikoizten du babes aleloaren 2 kopia dutenekin alderatuta.

1. irudia. Kaplan-Meier biziraupen kurbak, denboraldi bat iskiofibialetako lesiorik gabe irauteko probabilitatea irudikatuz Cox-frailty erregresio multipleko aldagaientzat.



Arazoi ezberdinek azaldu dezakete arriskuan dauden jokalariai identifikatzeko ezgaitasuna. Laginaren tamaina balioztatze fasean txikia izan zen, eta emaitza hauek lagin handiagoetan erreplikatzeko beharrezkoa da. Dena den denboraldi batean test batek duen ahalmen prediktiboa garrantzitsua da futbol talde batentzat. SNP gutxi batzuk ikertzea gene hautagai hurbilketarekin mugatua da ere, eta gaur egun milioika SNP ikertzeko aukera dago genoma osoa aztertze teknika erabilia (Collins et al., 2016). Bestalde, lesioak gertaera konplexu eta multifaktorialak dira, eta genetikaz gain beste arrisku faktore batzuk kontuan hartu behar dira, besteak beste, entrenamendu karga, nekea, iskiofibialen indarra edota prebentzio estrategiak burutzen diren edo ez (van Beijsterveldt et al., 2013).

Azkenik, arriskuan dauden jokalariek identifikatzea ezinezkoa izan daitekeela argudiatu da, eta gaur egun ez dago kirol lesioak auresan ditzaken testik (Bahr, 2016). Dena den, horrelako testak erabilgarriak izan daitezke mediku eta entrenatzaileentzat, esku hartze prebentiboen inguruan erabakiak hartzen laguntzeko. Zentzu honetan, test genetikoek erabilera goiztiarra dirudi.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Aipatutako mugak kontuan hartuta, ikerketa gehiagoren beharra dago (1) genoma osoa aztertzeko teknikak erabilita eta milioika SNP analizatuz; eta (2) aldagai genetikoek beste arrisku faktore batzuekin duten interakzioa aztertuz arrisku eredu multifaktorialetan. Horretarako, laginaren tamaina handitzea beharrezkoa izango da. Pausu garrantzitsuak izango dira genetikak lesio arriskuan duen influentzia ezagutzeko, eta test genetikoek iskiotibialetako lesioak prebenitzeko erabaki prozesuetan informazio erabilgarria eskaini dezaten.

6. Erreferentziak

- Bahr, R. (2016), Why screening tests to predict injury do not work-and probably never will...: a critical review, *Br J Sports Med*, 50, 776-780.
- Collins, M. et al. (2015), Biological variation in musculoskeletal injuries: current knowledge, future research and practical implications, *Br J Sports Med*, 49, 1497-1503.
- Fuller, CW. et al. (2006), Consensus statement on injury definitions and data collection procedures in studies of football (soccer) injuries, *Br J Sports Med*, 40, 193-201.
- Gibbon, A. et al. (2017), The MMP3 gene in musculoskeletal soft tissue injury risk profiling: A study in two independent sample groups, *J Sports Sci*, 35, 655-662.
- Harrell, FE. et al. (1996), Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors, *Stat Med*, 15, 361-387.
- Pruna, R. et al. (2016), Genetic biomarkers in non-contact muscle injuries in elite soccer players, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, [Epub ahead of print].
- Rahim, M. et al. (2016), Genes and musculoskeletal soft-tissue injuries, *Med Sport Sci*, 61, 68-91.
- Ullah, S. et al. (2014), Statistical modelling for recurrent events: an application to sports injuries, *Br J Sports Med*, 48, 1287-1293.
- van Beijsterveldt, AM. et al. (2013), Risk factors for hamstring injuries in male soccer players: a systematic review of prospective studies, *Scand J Med Sci Sports*, 23, 253-262.

7. Eskerrak eta oharrak

Jon Larruskain UPV/EHU-ko Euskararen Arloko Errektoreordetzaren beka baten onuraduna da.

“In vivo” saiakerak kolon-ondesteko gibel metastasia hipertermia magnetikoaren bitartez tratatzeko

Irati Rodrigo^{1,2}, Borja Herrero³, Eneko Garaio², Oihane Arriortua^{1,4}, Fernando Plazaola², José Ángel García^{1,5}, José Javier Echevarría-Uraga⁶, Maite Insausti^{1,4} eta Ignacio García-Alonso³

¹ BCMaterials, Basque Center for Materials, Applications and Nanostructures, Bizkaia
Zientzia eta Teknologia Parkea, Derio, Bizkaia

² Elektrizitate eta Elektronika Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko
Unibertsitatea UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia

³ Kirurgia, Erroadiologia eta Medikuntza Fisikoa Saila, Medikuntza eta odontologia
Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia

⁴ Fisika Inorganikoa II Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko
Unibertsitatea UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia

⁵ Fisika Aplikatua II Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea
UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia

⁶ Galdakao-Usansolo Hospitalea, Labeaga Auzoa, Usansolo, 48960 Bizkaia
irati.rodrido@bcmaterials.net

Laburpena

Hipertermia magnetikoa minbiziaren aurkako terapia berritzaile bat da. Tumorean estrategikoki jarritako nanopartikulek kanpotik aplikatutako irati maiztasun eremu magnetiko batetik energia xurgatzen dute eta bero-iturri moduan jokatzen dute, minbizi zelulak hiltzen dituztelarik tenperatura igoeraren ondorioz. Gaur egun ikerketa ugari egiten ari dira hipertermia magnetikoa terapia alternatibo moduan aplikatzeko. Gure ikerketa taldearen helburua hipertermia magnetikoa kolon- ondesteko gibel metastasia tratatzeko eraginkorra den ikustea da. Horretarako laborategiko arratoiekin “in vivo” saiakerak egin dira Fe₃O₄-PMAO-RGD nanopartikulak erabiliz eta 606kHz-ko maiztasuna eta 14kA.m⁻¹-ko intentsitatea duen eremua aplikatuz.

Hitz gakoak: Hipertermia magnetikoa, nanopartikula magnetikoak, eremu alternoa, gibel metastasia, “in vivo” saiakerak

Abstract

Magnetic hyperthermia is a cancer thermotherapy where magnetic nanoparticles placed inside or near the tumor act as heat sources activated by an externally applied magnetic field. These nanoparticles increase the temperature of the tumor cells causing the destruction of the tumor. Nowadays magnetic hyperthermia is being explored as an alternative therapy in order to treat some cancers. The aim of our work is to prove the effectiveness of the hyperthermia in “in vivo” assay in laboratory rats to treat colorectal cancer with liver metastases.

Keywords: Magnetic hyperthermia, magnetic nanoparticles, magnetic field, liver metastases, “in vivo” essay

1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egun, nanopartikula magnetikoek (NP), garrantzi handia hartu dute medikuntzako zenbait arloetan, hala nola minbiziaren aurkako terapia berritzailea bilaka daitekeen hipertermia magnetikoan.

Garatzen ari den terapia honetan, tumorean estrategikoki jarritako nanopartikula magnetikoek eremu magnetiko aldakor baten eraginpean tumorearen tenperatura igo dezakete. Tenperatura igoera horrek minbizi zelulak hiltzen ditu (Jordan et al., 1993), (Perigo et al., 2015). Beste terapia onkologiko batzuek ez bezala, hipertermia magnetikoak minbizi ehunak hautatzeko eta erasotzeko aukera ematen du, ehun osasuntsuak kaltetu barik.

Nanopartikula magnetikoek hipertermiarako erabilgarriak izateko hainbat ezaugarri bete behar dituzte. Lehenik, dispertsatutako ingurunean egonkorak izan behar dira, bigarrenik beroketa nahiko sortu behar dute tumorea hiltzeko; eta hirugarrenik tumorearen ehunetan homogenoki banatuta egon behar dira (Tartaj et al., 2011).

Hipertermia magnetikoan magnetitazko (Fe_3O_4) nanopartikula superparamagnetikoak erabiltzen dira nagusiki. Magnetitazko nanopartikulak ez dira giza gorputzarentzako kaltegarriak, beti ere dosia 300-600 mg NP/kg gorputz-masa baino txikiagoa bada. Dosi hori terapia honetan erabiltzen dena baino askoz handiagoa da, eta ondorioz oso aproposak dira aplikazio biomedikotarako. Gainera, beraien tamainagatik joera superparamagnetikoa dute, eta ondorioz partikula magnetikoen DC histeresi zikloa galdu egiten dute. Hori dela eta, odol sisteman barreia daitezke inolako aglomeratuak sortu barik. Hala ere, magnetitazko nanopartikula superparamagnetikoak irratia maiztasunetako eremu magnetiko baten eraginpean jartzerakoan joera histeretikoa erakusten dute, hauen magnetizazioak ezin duelako eremu magnetikoa jarraitu. Beraz, ziklo bakoitzean energia galdu egingo dute bero moduan. Bero hau izango da tumorearen tenperatura igoera sortuko duena eta ondorioz minbizi zelulen heriotza. Gainera nanopartikula mota hau, errazki moldatu daiteke tumorearen ehunetara lotu ahal izateko (Garaio et al., 2014).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Hipertermia magnetikoa terapia moduan ezartzea da arlo honetan lan egiten duten talde guztien helburu nagusia. Horretarako hainbeste saiakera egin behar dira zelula-hazkuntzetan eta animalietan. Hori dela eta, gure ikerketa taldeak Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) beste ikerkuntza talde batzuk eta Galdakaoko Hospitalearekin batera hipertermiako “in vivo” saiakerak egiten ditu kolon-ondesteko gibelesko metastasia tratatzeko.

Azkeen urteetan, artikulua asko publikatu dira hipertermiaren arloan. 2007. urtean MagforceAC enpresak (Berlin, Germany) garuneko tumorea tratatzeko lehenengo saiakera klinikoak egin zituen. 2011. urtean Europar Batasunak hipertermia magnetikoa garuneko tumoreak tratatzeko baimena eman zuen eta, gaur egun, terapia hau Alemaniako 6 hospitaleetan aplikatzen da. Gainera prostatiko minbizian aplikatzeko saikerak ere egiten ari dira¹.

Momentuz terapia hau soilik garuneko minbizia tratatzeko onartuta egonda ere beste minbizi mota batzuk tratatzeko ere aproposa izan daiteke. Honetariko bat kolon-ondesteko gibelesko metastasia da (Petryk, 2013). Minbizi mota honetan ohiko tratamenduak ez dira oso efektiboak, hori dela eta tratamendu alternatiboak bilatzea da minbizi mota honen erronka nagusia.

Ebakuntza da gibel metastasia sendatzeko metodorik egokiena, hala ere, bakarrik gaixoen %50ri aplikatu ahal zaio. Erauzketa perkutaneo eta kimioenbolizazio arteriala izan daitezke ebakuntzatik kanpo gelditzen diren gaixoen alternatibak (Echevarria-Uraga et al., 2012). Hala ere, metastasis masiboa duten gaixoetan kimioterapia sistemikoak, bakarrik edo kimioenbolizazio arterialarekin batera aplikatua, lortu ditu emaitza kliniko onargarriak (Gray et al., 2011).

Azkenaldi honetan, hipertermia magnetikoa terapia alternatibo moduan ikertzen ari dira gibel metastasia tratatzeko. Ikerketa honen helburu nagusia taldeak sintetizatu eta funtzionalizatu dituen magnetitazko nanopartikula gibel metastasia tratatzeko eraginkorrak diren ikustea izan da. Horretarako RGD peptidoekin funtzionalizatuta dauden magnetitazko nanopartikulak intrarterialki sartu zaizkie arratoiei gibelerara eta ikerketa taldeak sortutako gailu elektromagnetikoaren bitartez hipertermiako tratamendua aplikatu zaie laborategiko arratoiei (Garaio et al., 2015). Gero, ikerketa histopatologikoen bitartez hipertermiaren bidez hildako minbizi ehunak kuantifikatu dira tratamenduaren eraginkortasuna frogatzeko (Arriortua et al., 2016).

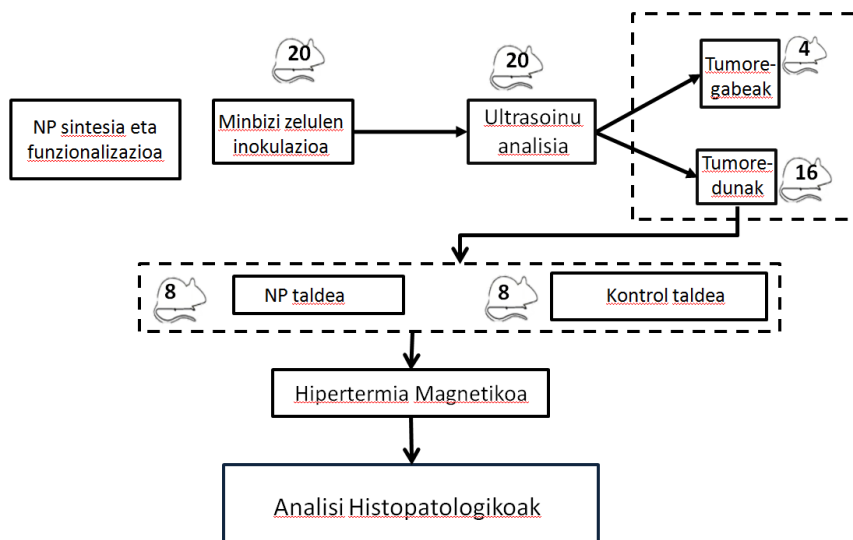
1. www.magforce.de/en/home.html

3. Ikerketaren muina

3.2 Metodologia

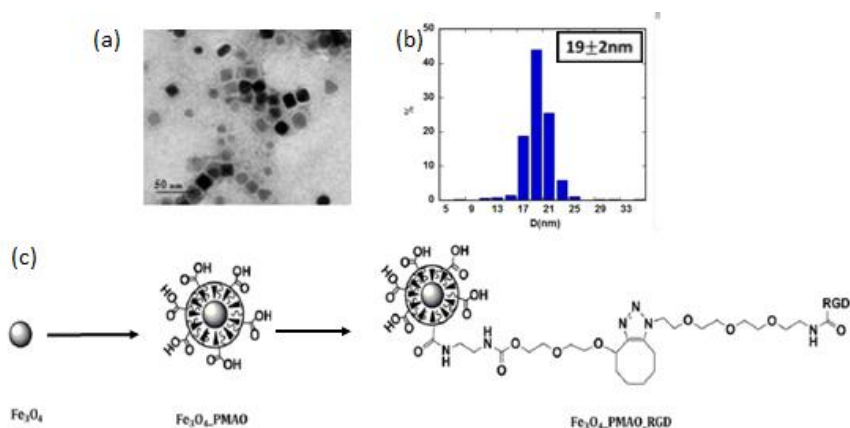
Ikerkerketa honetan kolon-ondesteko minbizi zelulak laborategiko 20 arratoiei inokulatu zaizkie gibleko ezker lobuluan. 1.irudian ikusten den moduan 30 egun pasa eta gero, ultrasoinu analisien bitartez ikusi da 16 arratoiek garatu dutela tumorea.

1. irudia. Ikerketan jarraitu diren urratsak



Ikerketan erabilitako magnetitazko nanopartikulak, Fe_3O_4 , deskonposizioa termikoaren bitartez sintetizatu dira. Transmisiozko mikroskopia elektronikoarekin (TME) nanopartikulen tamainuen banaketa neurtu da. 2b irudian ikusten den moduan tamainuen banaketa-kurba Gaussiar baten itxura dauka eta nanopartikulek 19 ± 2 nm-ko batazbesteko tamaina dute. Nanopartikulak inguru likidoan dispersaturik egon behar dira, izan ere, giza gorputzean horrela sartu egingo direlako. Aipatu den moduan, nanopartikulak inguru likidoan egonkor egon behar dira inolako aglomeraturik sortu gabe. Hau lortzeko magnetitazko nanopartikulak poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene) (PMAO) polimeroarekin inguratu dira (2c irudia). Gainera, nanopartikulak tumorearen ehunetan lotu ahal izateko RGD (arginylglycylaspartic acid) peptidoa gehitu zaie hauen gainazalera. Izan ere, peptido hauek errazki lotzen dira $\alpha_v\beta_3$ eta $\alpha_v\beta_5$ integrinetara, hauek tumoreen ehunetan gain adierazita daudelarik (Zhang et al., 2012).

2. irudia. Ikerketan erabili diren nanopartikulak (a) TME irudia (b) Tamainuen banaketa-grafikoa (c) Fe_3O_4 PMAO-RGD nanopartikulak lortzeko prozesua



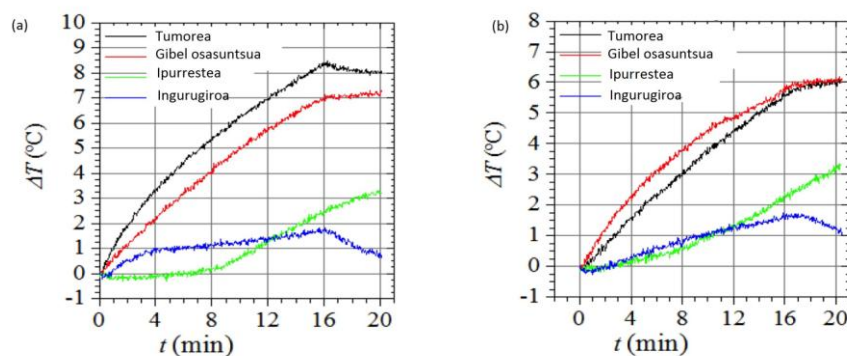
Nanopartikulak sintetizatu eta funtzionalizatu ostean, tumoredun 8 arratoiri nanopartikulak gibelera sartu zaizkie (arratoi talde honi NP taldea deitu diegu) eta beste 8ak kontrol moduan utzi ditugu gibelera gazura soilik sartuz (talde honi kontrol taldea deitu diegu). Nanopartikulak eta gazura gibel arterian kokatutako mikrokanula baten bitartez sartu dira.

24 ordu pasa eta gero 16 arratoiri hipertermia tratamendua aplikatu zaie ikerketa taldeak sortutako gailu elektromagnetikoan. 606kHz-ko maiztasuna eta $14\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ -ko intentsitatea duen eremua 21 minutuz aplikatu zaie. Tenperatura igoera kontrolatzeko 3 tenperatura zuntz erabili dira hipertermia aplikatzen den bitartean: Lehenengoa, tumorerik gabeko gibel zatian sartu da, bigarrena, tumorean eta hirugarrena ipurrestean. Modu honetan tumorera itsatsitako nanopartikulak tenperatura igoera sortzen duten neurtu da. Bukatzeko, analisi histopatologikoak egin dira hipertermiak hiltzen duen tumorearen portzentaia kuantifikatzeko.

3.2 Emaitzak

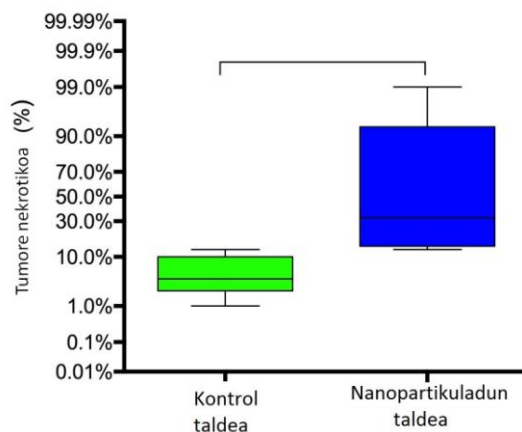
3. irudian ikusten den moduan hipertermia tratamenduaren amaieran NP taldean tenperatura igoera handiagoa ikusten da tumorean gibel osasuntsuan baino. Bestalde, kontrol taldean tumorearen eta gibel osasuntsuaren tenperatura tratamenduaren amaieran berdinak dira. Datuak estadistikoki tratatu dira eta ikusi da batzbeste NP taldean tumorearen tenperatura $7.82\pm 1.20^\circ\text{C}$ igo dela eta kontrol taldean $4.66\pm 0.99^\circ\text{C}$.

3. irudia. Tenperatura eboluzioa hipertermia tratamenduan zehar (a) NP taldea (b) Kontrol taldea



Tenperatura igoera honek tumorea hiltzen duen ikusteko analisi histopatologikoak egin dira. Analisi hauetan nekrotikoa den tumorearen portzentaia kuantifikatzen da. 4. irudian ikusten denez, kontrol taldean tumore nekrotikoa %1-%13 den bitartean NP taldean %13-%99 bitartekoa da.

4. irudia. Kontrol taldean eta NP taldean tumore nekrotikoaren portzentaia



4. Ondorioak

Proiektu honetan hipertermia terapia berritzailea gibel metastasia tratatzeko eraginkorra dela frogatu da. Ikusi denez, NP taldean tumorearen tenperatura kontrol taldean baino 3°C gehiago igo da. Horrek esan nahi du, alde batetik nanopartikulak tumorera itsatsi direla eta ondorioz RGD-a egokia dela lotura egiteko; eta beste aldetik, gure nanopartikulak eremuaren presentzian berotzen direla.

Tenperatura igoerak tumorea hiltzen duen frogatzeko, hau da, hipertermia eraginkorra dela ikusteko, analisi histopatologikoak egin dira. Bertan ikusi da ehun nekrotikoa %13-%99 dela NP taldean eta %1-%13 dela kontrol taldean.

Pentsa daiteke, nekrosi tarte diferentzia bi taldeen artean oso handia dela tumorearen tenperatura diferentzia 3°C-koa dela kontutan izanda. Baina aipatu behar da zelulak 43°C-tik gora hiltzen direla eta emaitzetan ikusten ez bada ere NP taldean tumoreak jasandako tenperatura igoeraren ondorioz tenperatura horretara iristen da, baina kontrol taldean ez.

Laburbilduz, gure ikerketa taldeak sintetizatu dituen Fe₃O₄-PMAO-RGD nanopartikulak gibel metastasia hipertermiaren bitartez tratatzeko eraginkorrak dira.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Gai honetan egin den lehen ikerketa izan denez, lortutako emaitzak interes handikoak direla uste dugu. Honek bide ematen digu gai honetan lan egiten jarraitzeko. Hala ere, emaitzak esanguratsuagoak izateko animala kopurua handitu behar da eta saiakera gehiago egin. Hori dela eta, taldea luzea den prozesua errepikatzen dabil emaitza gehiago lortzeko eta aurretik lortutako emaitzekin konparatzeko.

6. Erreferentziak

- Arriortua, O.K., Garaio, E., Herrero, B., Insausti, M., Lezama, L., Plazaola, F., Garcia, J.A., Aizpurua J.M., Sagartzazu, M., Irazola, M., Etxebarria, N., García-Alonso, I., Saiz-López, A. eta Echevarria-Uraga, J.J. (2016). "Antitumor magnetic hyperthermia induced by RGD-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles, in an experimental model of colorectal liver metastases" *Beilstein J. Nanotechnol*, 7, 1532-1542.
- Echevarria-Uraga, J. J.; García-Alonso, I.; Plazaola, F.; Insausti, M.; Etxebarria, N.; Saiz-López, A.; Fernández-Ruanova, B. (2012). "Study of the intra-arterial distribution of Fe₃O₄ nanoparticles in a model of colorectal neoplasm induced in rat liver by MRI and spectrometry" *Int. J. Nanomed.*, 7, 2399–2410
- Jordan, A., Wust, P., Fähling, H., John W., Hinz A., eta Felix R. (1993), "Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia," *International Journal of Hyperthermia*, vol. 9, no. 1, pp. 51-68,.
- Garaio, E., Collantes, J. M., Plazaola, F., Garcia, J. A., and I. Castellanos-Rubio, (2014), "A multifrequency eletromagnetic applicator with an integrated AC magnetometer for magnetic hyperthermia experiment," *Measurement Science & Technology*, 25, 115702.
- Garaio, E., Sandre, O., Collantes, J. M., García, J. A., Mornet S., eta Plazaola F. (2015) "Specific absorption rate dependence on temperature in magnetic field hyperthermia measured by dynamic hysteresis losses (AC Magnetometry)," *Nanotechnology*, vol. 26, p. 015704.
- Gray, B.; Van Hazel, G.; Hope, M.; Burton, M.; Moroz, P.; Anderson, J.; Gebiski, V. (2001). Randomised trial of SIR-Spheres plus chemotherapy vs. chemotherapy alone for treating patients with liver metastases from primary large bowel cancer. *Ann. Oncol.*, 12, 1711–1720.
- Perigo, E.A., Hemery, G., Sandre, O., Ortega, D., Garaio E., Plazaola F., Teran F.J., (2015), "Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia," *Applied Physics Reviews*, vol. 2, no. 4.
- Petryk, A. A.; Giustini, A. J.; Gottesman, R. E.; Kaufman, P. A.; Hoopes, P. (2013) "Magnetic nanoparticle hyperthermia enhancement of cisplatin chemotherapy cancer treatment. " *J. Int. J. Hyperthermia*, 29, 845–851.
- Tartaj, P.; Morales, M.; Gonzalez-Carreño, T.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Serna, C. J. (2011) "The Iron Oxides Strike Back: From Biomedical Applications to Energy Storage Devices and Photoelectrochemical Water Splitting" *Adv. Mater.*, 23

Zhang, F.; Huang, X.; Zhu, L.; Guo, N.; Niu, G.; Swierczewska, M.; Lee, S.; Xu, H.; Wang, A. Y.; Mohamedali, K. H.; Rosenblum, M. G.; Lu, G.; Chen, X. (2012). "Noninvasive monitoring of orthotopic glioblastoma therapy response using RGD-conjugated iron oxide nanoparticles". *Biomaterials*, 33, 5414–5422.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahiko nizkioke lan honetan parte hartu duten ikerlari guztiei. Ikerketa hau Eneko Garaio eta Oihane Arriortuaren tesietan hasi zen eta gaur egun Borja Herrero eta bion tesian lantzen ari gara. Ikerketa hau, Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza, Hizkuntza Politika eta Kultura Sailak doktore ez diren ikertzaileak prestatzeko duen programako doktore-aurreko bekaren laguntzarekin ari da garatzen.

Jarduera fisikoa eta gorputz-osaeraren eragina hezur-dentsitate mineralen

Hervás, Gotzone¹; Ruiz-Litago, Fátima¹; Zarrasquin, Idoia²; Caballero, Amaia³; Irazusta, Jon¹

¹Fisiologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea UPV/EHU

²Erizaintza Saila I, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea UPV/EHU

³Bioteknologia Graduko ikaslea, Zientzia Fakultatea UPV/EHU
ghervas002@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Hautzaro eta gaztaroan jarduera fisikoa eginez gero, zahartzaroan edukiko den hezur-dentsitatea handiagoa izango da. Izan ere, hezur-dentsitate mineralaren maila maximoa gaztaroan, nerabezaro amaieran, lortzen da eta guztiz erabakigarria da bizitzan zehar izango den hezur-osasunean. Ikerketa honetan giharraren babes-papera agerian utzi, mutilen gaitasun aerobikoak hezur-dentsitatearekin erlazio positiboa duela ikusi eta ariketa fisiko intentsua egitea hezur-dentsitate mineral hobearekin erlazionatzen dela egiaztatu da. Horrela, jarduera fisikoa praktikatzek, gorputz-osaera eta egiturak eta baita gaitasun aerobikoak gazteen hezur-dentsitate mineralen duten eragina ildo berekoa da.

Hitz gakoak: Jarduera fisikoa, Gorputz-osaera, Hezur-dentsitate minerala, Gaztaroa

Abstract

Practice physical activity during childhood and young adulthood helps to gain bone density in the elderly. The highest peak bone mass which is achieved during young adulthood is determinant in the bone health over the life. In this study it has been demonstrated the protective role of the muscle, a positive relation between men aerobic capacity with a higher bone mineral density and the positive association among vigorous physical activity and mayor bone density. In that way, practicing physical activity, body composition and structure and aerobic capacity has similar effects in young adults bone mineral density.

Keywords: Physical activity, Body composition, Bone mineral density, Young adulthood

1. Sarrera eta motibazioa

Hezurraren nolakotasuna eta bizitzan zehar jasaten dituen aldaketei moldatzeko gaitasuna ezaugarri material (masa, dentsitatea, mineral konposizioa eta indarra) eta dimentsionalen (tamaina, itxura eta estruktura) araberakoak dira. Nahiz eta hezurraren garapena genetikoki mugatuta egon bereziki, bizi-ohiturek hezur-dentsitate mineral maximoaren %20-40an eragiten dute. Hortaz, aipaturiko hezurren berezko ezaugarriak, banakako eragile diren zenbait faktore sustatuz hobetu daitezke.

Bizi-ohitura osasuntsuak izatea garrantzitsua da hezur-dentsitate mineral maila altua lortu ahal izateko. Honek osteoporosia garatzeko arriskua %50ean murriztu eta hezur-masaren galera geldotuko du helduaroan (Rizzoli et al, 2010). Izan ere, hezurak ehun biziak dira eta nerabezaro bukaeran lortzen den dentsitate mineralaren maila maximoa eta hortik aurrerako desosifikazio-prozesuaren abiadura, bizi ohituren araberakoak dira.

Bizitza osoan zehar osasuna suspertzeko eta mantentzeko bizi-ohituren artean, jarduera fisikoa da nabarmen. Hala ere badaude beste hainbat bizi-ohitura eta inguru aldagai aintzat hartu behar direnak; hala nola, D bitamina, tabako, alkohol eta kafeina kontsumoa, elikadura-ohiturak eta gorputz-osaera (Weaver C. M. et al. 2016).

Ariketa fisikoaren onurak hezurraren garapenean ondo ezarriak daude eta honek prebentzio ekintzetan oinarritzko osagai bihurtzen du. Nerabezaro amaieran lortzen den hezur-dentsitate mineralaren maila maximoa erabakigarria denez bizitza osoan zehar izango den hezur-osasunean, gaztetan hartutako neurriek eragin zuzena izango dute hezur-dentsitate mineralaren

maila maximoan (Gunter K. B. et al, 2012; Magnusson, H. I. et al. 2001; Specker B et al, 2015). Beraz garrantzitsua da bizitzako lehenengo aroetan, haurtzaro eta nerabezaroan, lan egitea biztanleriaren ongizatea eta hezur-mineralizazio egokia bermatzeko.

Jarduera fisikoak hezur-mineralaren metaketa eta mantentzearekin erlazioa du; osifikazio prozesuaren garrantzizko mugatzailea baita (Baxter-Jones et al, 2008). Onurarik nabarmenenak talkadun ariketa fisikoak eta pisua jasan beharreko ariketa mota desberdinek intentsitate altuan praktikatzean azaltzen dira. Izan ere, ariketa mota hauek hezur-trabekularen orientazioa eta dentsitatea aldatu egiten dute (Mitchel et al, 2016).

Gorputz-osaerak ere erakutsi du baduela erlazioa hezur-dentsitatearekin. Giharrak erlazio positiboa du hezur-dentsitatearekin (Correa-Rodriguez M. et al, 2016). Giharraren eta hezuraren arteko seinale mekaniko eta molekularrak ezinbestekoak dira eskeletoaren garapenaren erregulazioan. Obesitatea edo gehiegizko algartasuna izateak, badu eragina hezur-osasunean (Misra eta Klibanski, 2013).

Beharrezkoa da hezur-dentsitate maximoaren garapena, ahalmen funtzionala eta hezuraren zurruntasunarekin zuzenean erlazonaturiko faktore desberdinak ezagutzea. Honek hezur indartsu eta osasuntsuagoak izateko osasun-programa eraginkor eta zehatzagoak garatzea ahalbidetuko luke. Ideia honen inguruan, proiektu honetan parte-hartzen duten pertsonen hainbat parametro eta ohitura aztertuko dira euren arteko erlazioa zehazteko eta honela, euren ezaugarrietara egokituriko osasun-programa bat garatzeko.

Lortutako hezur-dentsitate maila maximoa erabakigarria da helduaroan eta zahartzaroan izango den hezur-osasunean. Hori dela eta bizi-ohiturek nerabezaro amaieran hezur-dentsitate maximoaren mailan duten eragina ezagutzeak, helduaroan osteoporosiaren aurkako prebentzio-programak garatzeko garrantzizko balioa dauka. Izan ere, ariketa fisikoak daukan eragina ezagutu eta hobekuntza sustatzeak biztanleriaren osasun eta bizi-kalitatean efektu onuragarriak eragingo lituzke.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Helburu nagusi eta zehatzak kontuan hartuz, proiektu honen zentzua gizarte-egoera bat ezagutzea eta islatzea da. Horrela, prebentzio politika eta neurriak garaiz, haurtzaro eta nerabazarotik, eta modu egokian bideratu daitezten. Horretarako hurrengo helburuak proposatu dira;

2.1 Helburu nagusia

Bizi-ohitura den jarduera fisikoak, hezur-dentsitate maila maximoa lortzear diren gazteetan duten eragina aztertzea. Beraien ezaugarrietara egokiturik, biztanleriaren osasun eta bizi kalitatean efektu onuragarriak izango dituen osasun-programa bat planifikatu ahal izateko.

2.2 Helburu zehatzak

- Intentsitate desberdinetako ariketa fisikoek hezur-dentsitate mineralarekin duten erlazioa aztertzea.
- Gorputz-osaerak hezur-dentsitatean duen eragina zehaztea.
- Hezur-dentsitate mineralaren mailan, egoera-fisikoak duen eragina aztertzea gaitasun aerobikoa kontuan izanez.

3. Ikerketaren muina

Ikerketa honetan Leioako Medikuntza eta Erizaintza eta Zientzia eta Teknologia Fakultateetako, 18-21 urte bitarteko 147 ikaslek hartu dute parte. Parte-hartzaileen artean ez da perfil zehatzik bilatu nahi izan.

Ultrasoinuzko dentsitometroarekin orpo-hezuraren parametro desberdinak neurtu dira. Metodo kuantitabo honen bitartez, hezur-trabekularren zurruntasun indizea, *Stiffness* Indizea zein era zehatz batean neurtzen da. Orpo-hezurra batik bat hezur-trabekularrez osatua dago eta honek, hezur-berriztatze handia du.. Indize hau, abiadura arruntaren eta soinuaren atenuazioaren arteko konbinazioa da. Egindako neurketak gizon eta emakumeen artean ez dute ezberdintasun esanguratsurik islatu.

Gorputz-egitura eta osaera ezagutzeko neurtzen diren ezaugarri antropometrikoak pertsonaren egoera-fisikoari buruzko datuak eman ditzake eta modu berean, ariketa fisiko ohituren adierazle ere badira. Altuera, pisua eta gorputz-atal desberdinetako tolestura, diametro eta perimetroekin, gorputzaren egitura (somatotipoa) eta osaera (gantz, gihar, hezur eta hondakinen ehunekoa) estimatu dira.

Ariketa fisiko ohituren baloraziorako, IPAQ-a (International Physical Activity Questionnaire) erabili da. Nazioartean balidatutako galdeketa honek, jarduera eta ariketa fisikoaren baloraziorako informazioa modu kualitatibo zein kuantitatiboan zehazten du. Metodo prospektibo honetan, partaideak, aurreko astean egindako jarduera eta ariketa fisikoaren oroitzapenaren deskribapena egin behar ditu 7 galdera erantzunez. IPAQ-aren bidez, egindako ariketa fisikoa hiru intentsitate desberdinen arabera aztertu dira; ariketa fisiko arina (ibili), ariketa fisiko ertaina (arnas maiztasuna atsedenekoa baino altuagoa denean, azkar ibiltzea adibidez) eta ariketa fisiko bizia (arnas maiztasuna atsedenekoarekin konparatuz oso altua denean; korrika egitea esaterako).

Astrand-en normogramaren bitartez, generoa kontuan izanez, potentzia eta bihotz-maiztasuna erlazionatu egiten dira. Honela, oxigeno-kontsumo maximo absolutua (l/min) ezagutzen da. Hau partaidearen pisuarekin erlazionatuz gero, oxigeno-kontsumo maximo erlatiboa lortzen da (ml/Kg/min) baina giharraren pisua bakarrik kontuan izanez gero, gihar pisuaren arabera oxigeno-kontsumo maximoa ezagutu daiteke (ml/Kggihar/min).

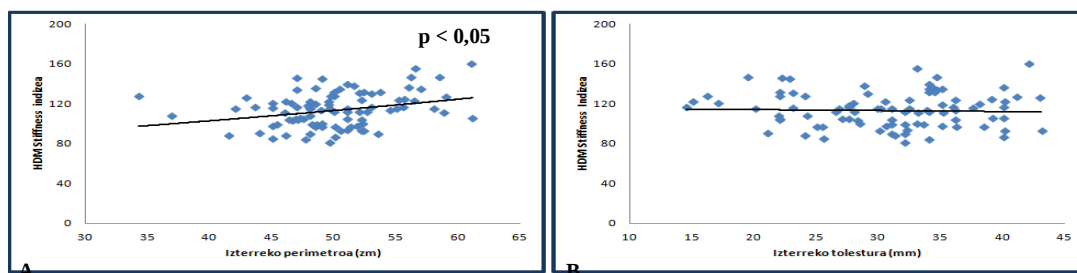
Egindako frogak guztiek jarduera fisikoak hezur-dentsitate mineralean dituen onurak berretsi dituzte. Alde batetik jarduera fisikoak gorputz parametroak, gorputz-osaera eta egitura moldatzen ditu eta bestetik, egoera fisikoan, gaitasun aerobikoan eragina duela ikusi da. Guzti hauek modu batean edo bestean, neska mutil gazteen hezur-dentsitatean eragina dutela erakutsi dute.

Gihar-ehunak hezur-dentsitatean eragina duela agertu da. Nesketan, mesomorfiak *Stiffness* indizearekin erlazio positibo eta esanguratsua duela frogatu da ($p < 0,05$) eta mutiletan gihar-portzentajeak ere joera berdina erakutsi du ($p < 0,05$). Gainera gantza eta loditasunarekin erlazioa duten parametroek hezurrean giharrak duen kontrako eragina sustatzen duela frogatu da. Gero eta gantz-gehiago izan, orduan eta *Stiffness* indize txikiagoa eta hezur-zurruntasun makalagoa aurkezten dute mutil-neska gazteek.

Mutiletan, gantz-portzentajearen adierazle diren tolesturak; tolestura-trizipitala, sei-tolesturak eta enbor-tolesturak hezur-dentsitatearekin modu negatibo eta esanguratsuan erlazionatzen dira. Behe-gorputz adarreko tolesturak erlazio bera erakutsi dute baina ez era esanguratsuan. Hain zuzen ere, mutilek normalean gantza sabel eta bizkarraldean pilatzen dute. Bestalde, mutilen endomorfia ere hezur-dentsitate baxuagoarekin erlazionatu da. Egitura endomorfikoa duten pertsonak obesitateko joera dute. Forma biribildun pertsona bigunak eta makalak dira eta ez dute gihar ehun trinkorik.

Nesketan *Stiffness* indizeak izterreko perimetroarekin eta mesomorfiarekin erlazio positibo eta esanguratsua du. Perimetro eta tolestura desberdinekin alderatuz, *Stiffness* indizearen parametroa nesken izterreko perimetroarekin positiboki erlazionatzen da ($p < 0,05$). Ez ordea izterreko tolesturarekin (1 irudia).

1 irudia. Nesken Stiffness indizeak (ordenatu-ardatza) izterreko perimetroarekin (A) eta tolesturarekin (B) duen korrelazioa.



Alabaina, erregresio linealarekin (1 taula) garbi geratu da giharra dela erlazio hori positibo egiten duena. Izterreko-tolesturak lotura negatiboa du *Stiffness* indizearekin eta ondorioz gantzak ez du hezuraren-dentsitate minerala indartzen.

1 Taula. Stiffness indizearen menpe dagoen eta izterreko tolestura eta perimetroa erlazionatzen dituen erregresio lineala. $p < 0,005$

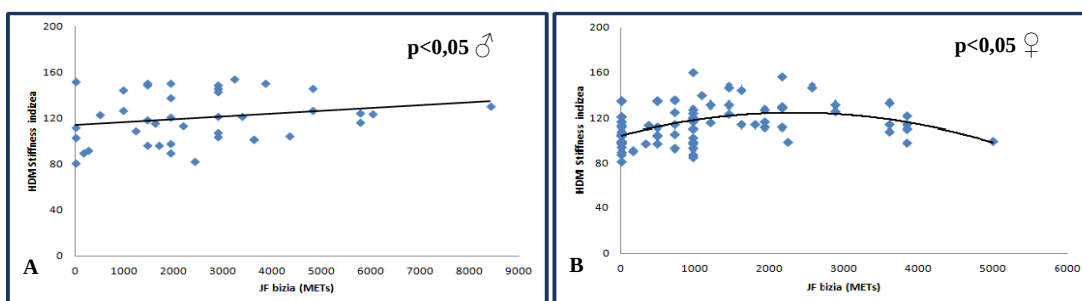
	B	Beta	Esangura
Konstantea	56,8		0,003
Izterreko tolestura	-0,51	-0,198	0,076
Izterreko perimetroa	1,47	0,397	0,001

Jarduera fisikoa egiteak gorputz-osaeran islatzeaz gain ahalmen eta gaitasun fisikoan ere du eragina. Gorputz-egitura eta osaera pertsona baten egoera-fisikoaren adierazle da eta modu berean, jarduera fisiko ohituren erakusle. Horrela, gorputz-osaera eta egiturak, jarduera fisikoa praktikatzek eta gaitasun aerobikoak hezur mineralizazioan izango duten eragina ildo beretik doaz.

Jarduera fisikoak ere badu lotura hezuraren zurruntasunarekin beraz sedentarismoak ere erlazioa izango du hezur-dentsitatean. Jesarrita gero eta denbora gehiago egon, orduan eta *Stiffness* indize baxuagoa dute neska-mutil gazteek. Jarduera fisiko arina eta *Stiffness* indizearen arteko loturak duen izaera negatiboa da. Baita jarduera fisiko ertaina eta hezur-dentsitatearekin erlazionatzen den parametroarena ere.

Jarduera fisiko biziak aldiz, hezur-dentsitate mineralarekin erlazio positiboa duela frogatu da. Mutil gazteek neskak baino jarduera fisiko gehiago egiten dute ($p < 0,05$). Desberdintasun hau askoz nabarmenagoa da jarduera fisiko bizian ($p < 0,005$). Hala ere, lehen aipatu bezala, hezur-dentsitatean eragina duen jarduera fisikoa bai mutil eta nesketan, jarduera fisiko bizia da. Hortaz, bi kasuetan, erlazio positibodun lotura esanguratsua aztertu da (2 irudia); gero eta jarduera fisiko bizi gehiago, orduan eta hezur-dentsitate handiagoa dute gazteek.

2 irudia. Mutil (A) eta neskek (B) egiten duten jarduera fisiko (JF) bizia MET-etan (absiza-ardatza) Stiffness indizearekin alderatzen duen korrelazio diagrama.

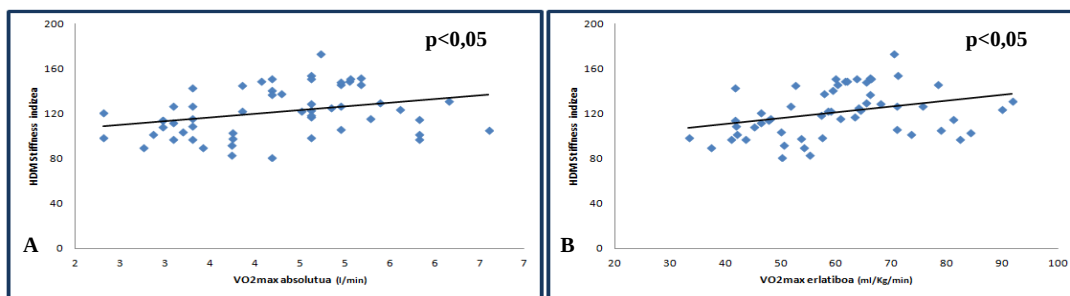


Erlazio hau mutiletan mantendu arren, astean 3000 MET edo gehiagoko jarduera fisiko bizia egiten duten neskei hezur-dentsitatea okerragotu egiten zaie. Gutxi dira astero 5 egunetan zehar 60 minutuko jarduera fisiko intentsua egiten duten neska gazteak baina dena den, kopuru honetatik aurrera egindako jarduera fisiko biziak nesken hezuraren zurruntasunarekin

erlazonaturiko *Stiffness* indizea murriztu egiten duela argi ikusten da egindako ikerketa honetan.

Jarduera fisikoa egitean egoera fisikoa aldatu egiten da. Hau dela eta egoera fisikoa ikerketa honen aldagai garrantzitsua da. Egoera fisikoa gaitasun aerobikoaren bitartez aztertu da eta mutil gazteen VO_2 maximoa absolutu eta erlatiboak hezur-dentsitatearekin erlazio positiboa duela ikusi da. Nesketan ostera izaera berdina sumatu arren, ez da lotura esanguratsurik frogatu (3 irudia).

3 irudia. Mutilen *Stiffness* indizea (ordenatu-ardatza) VO_2 maximo absolutuarekin (A) eta erlatiboarekin (B) duen erlazioa.



4. Ondorioak

Gorputz-osaerak oso paper garrantzitsua jokatzeko du hezur-dentsitatean. Gihar portzentaje handia eta gantz-portzentaje txikia izateak hezur-dentsitate altuarekin du erlazioa. Modu honetara giharraren babes-papera agerian utziz. Aipatzekoa da nesken beheko gorputz-adarretan gihar portzentaje handia eta gantz-portzentaje txikia hezur-dentsitatearekin modu positiboan erlazionatzen da.

Ariketa fisikoa baxua eta ertaina egiteak itxuraz ez du erlazio zuzenik hezur-dentsitatearekin. Baina ariketa fisiko intentsua egitea hezur-dentsitate mineral hoberekin erlazionatu da mutil eta nesketan modu desberdinean jardun arren. Izar ere nesketan jardura fisiko biziak hezur-dentsitatean eragin negatiboa izan ditzake.

Ariketa fisikoa modu intentsuan aritzean, egoera fisikoa hobetu egiten da. Gaitasun aerobikoa, egoera fisikoarekin modu zuzenean erlazionatzen den parametroa da. Ikerketa honetan parte hartu duten mutilen gaitasun aerobikoa; VO_2 maximoa absolutu eta erlatiboak hezur-dentsitatearekin erlazio positiboa du. Hortaz, ariketa fisikoa modu intentsuan praktikatzeak hezur-dentsitatean eragin positiboa du.

Ariketa fisiko intentsua egitea aholkatzen duten osasun-programak eta gorputz-osaera hobetzera zuzenduak daudenak hezur-dentsitate mineral hobea lortzea laguntzen dute. Horretarako gomendagarria da haurtzaro eta nerabezaro garaian grabitatearen eragin nabaria duten eta erresistentziaren kontra egindako ariketak egitea.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa honetan gorputz-osaerak eta jardura fisiko intentsuak hezur-dentsitatean duten garrantzia agerian geratu dira. Behin gihar-portzentajeak hezur-dentsitatearen maila maximoarekin duen erlazioa aztertutik, ondorengo pausua gaitasun anaerobikoaren adierazle diren gihar-indar eta potentzia hezur osasunean duten eragina ikertzea izango litzateke. Balorazio isozinetiko baten bidez koarizepsaren indar-espezifiko aztertuz.

Horretaz gain, intentsitate desberdinetako jardura fisikoaren eragina modu zehatzago batez aztertzeak, jardura fisiko intentsua eta hezur-dentsitatearen arteko lotura hobeto definituko luke. Azelerometriak, egindako mugimendu kopurua eta hauen intentsitatea era zehatz eta objektiboan neurtzen ditu. Horrela, beste intentsitateek ere hezurrean duten efektua hobeto ezagutu ahal izango litzateke.

6. Erreferentziak

- Baxter-Jones A. D., Kontulainen S. A., Faulkner R. A., Bailey D. A. (2008). A longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual from adolescence to young adulthood. *Bone*, 43, 1101-1107.
- Correa-Rodríguez, M., Rio-Valle, J.S., González-Jiménez, E. & Rueda-Medina, B. (2016). The Effects of Body Composition, Dietary Intake, and Physical Activity on Calcaneus Quantitative Ultrasound in Spanish Young Adults. *Biol Res Nurs*, 18 (4), 439-444.
- Gunter, K. B., Almstedt, H. C., Janz, K. F. (2012). Physical Activity in Childhood May Be the Key to Optimizing Lifespan Skeletal Health. *Exerc Sport Sci Rev*, 40 (1), 13-21.
- Magnusson, H. I., Westlin, N. E., Nyqvist, F., Gardsell, P., Seeman, E., Karlsson, M. K. (2001). Abnormally decreased regional bone density in athletes with medial tibial stress syndrome. *Am J Sports Med*, 29 (6), 712-715.
- Misra M., Klibanski A. (2013). Anorexia nervosa, obesity and Bone Metabolism, *Pediatr Endocrinol Rev*, 11(1), 21-33.
- Mitchel J. A., Chesi A., Elci O., McCormack S. E., Roy S. M., Kalkwarf H. F., Lappe J. M., Gilsanz V., Oberfield S. E., Shepherd J. A., Kelly A., Grant S. F., Zemel B. S. (2016). Physical activity benefits the skeleton of children genetically predisposed to lower bone density in adulthood. *Journal of Bone and Mineral Research*, 31(8), 1504-12.
- Specker, B., Thiex, N. T., Sudhagani, R. G. (2015). Does Exercise Influence Pediatric Bone? A Systematic Review. *Clin Orthop Relat Res*, 473, 3658-3672.
- Rizzoli R., Bianchi M. L., Garabédian M., McKay, H. A. eta Moreno L. A. (2010). Maximizing bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly. *Bone*, 46, 294-305.
- Weaver C. M., Gordon C. M., Janz K. F., Kalkwarf H. J., Lappe J. M., Lewis R., O'Karma M., Wallace T. C., Zemel B. S. (2016). The National Osteoporosis Foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations. *Osteoporos Int*. 27(4):1281-386.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau master lan amaiera batean egindako lanetik eratorria da. Izan ere bukatu gabeko tesiaren atal bat da. Premiazkoa da ikerlanean parte hartu duten ikasle guztiei eskerrak ematea.

Fe_3O_4 nanopartikulen prestakuntza eta karakterizazioa, hipertermia magnetikoan aplikatzeko.

Itziar Galarreta¹, Oihane Kristine Arriortua², Izaskun Gil de Muro^{1,2}, Idoia Ruiz de Larramendi¹, Maite Insasuti^{1,2}

¹Kimika Ezorganikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, UPV/EHU, 48940 Leioa.

²BC Materials, Basque Center for Materials, Applications & Nanostructures, 48610, Derio, itziar.galarreta@gmail.com

Laburpena

Morfologia, tamaina eta gainazal propietate desberdinak dituzten nanopartikula magnetikoen sintesiak arrakasta handia izan du azken urte hauetan, ez ordea euren erabilera medikuntza munduan. Nanosistema hauek gorputzarekin biobateragarritasun oso altua izan behar dute, prozesu kimikoen bidez lortzen zaila dena. Hori gutxi balitz, partikula-tamaina eta funtzionalizazioa nanosistemek aplikazio biomedikoan duten errendimenduarekin zuzenean lotuta dago, hipertermia magnetikoan batez ere. Hortaz, erronka hauen domeinuak nanopartikula magnetikokin erlazionatuta dagoen ezarpen eremu zabalean eragina izango luke. Lan honetan, hipertermia magnetikoan erabiliko diren nanopartikula magnetikoen sintesi eta karakterizazio bide desberdinak azalduko dira.

Hitz gakoak: nanopartikula magnetikoak, magnetita, sintesi metodoak, zیتotoxizitatea, hipertermia.

Abstract

Although the improvements performed in producing magnetite nanoparticles by chemical methods with diverse morphologies, sizes and surface properties, the applications of these systems for clinical trials is not so developed. Additionally, the role of the particle size and its functionalization on the performance of some biomedical applications, in particular hyperthermia, requires additional studies from the experimental point of view. Moreover, the application of these systems in medicine demands a high degree of biocompatibility. The fulfillment of these challenges would provide key contributions in the application of magnetite nanoparticles. In this work the preparation and characterization of magnetic nanoparticles with different size and morphology, together with cytotoxicity assays, for their development in magnetic hyperthermia are presented.

Keywords: magnetic nanoparticles, magnetite, synthesis methods, cytotoxicity, hyperthermia.

1. Sarrera

Nanoteknologia nanoegitura eta nanomaterialen diseinu, fabrikatze eta aplikazioaz arduratzen den zientzia da. Eskala horretan kokatzen diren materialak zein egiturak aztertzeaz gain, materialen propietate fisikoak eta dimentsioak ere erlazionatzen ditu. Ikertzaileen ustez hurrengo iraultza industrialaren pizgarri nagusiak nanomaterialak izan daitezke (Roco, 2002). Interes berezi honen sortzaile nagusiak material hauen ezohiko propietateak dira (Gleiter, 1992; Henglein, 1989; Weller, 2003). Nanoegituratutako sistemen ezaugarri den partikulen dimentsioa, De Broglie-en elektroien uhin-luzera, Frank-Reed dislokazioa sortzeko behar den distantzia, elektroien batezbesteko bide askea eta domeinu magnetikoaren tamaina bezalako fenomenoek neurri kritikoaren antzekoa edo txikiagoa da. Gertaera honek, material nanoegituratuen propietate elektriko, optiko eta magnetikoen berezitasunak azaltzen ditu (Stara *et al.*, 1996; Stara eta Klabunde 1996). Nanomaterialen propietateak direla eta, aplikazioak oso zabalak dira hainbat esparrutan, hala nola, elektronikan, katalisian, medikuntzan, etabarrean. Biomedikuntzan nanomaterialen arrakasta molekula biologikoekin elkarrekintzak sortzeko gaitasunean datza; nanopartikulek duten tamainaren ondorioz, material interesgarrienetarikoa nanopartikula magnetikoak direlarik. Izan ere, eremu magnetikoaren eraginez, gorputzean zehar garraiatu daitezke, farmakoak eramanez, irudi-analisiaren sentikortasuna handitzen da eta hipertermia magnetiko sortzeko gaitasuna dute (Lartigue *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013).

Lehenago aipatu den moduan, tamainak izaera magnetikoaren aldaketa eragiten die, izaera ferro/ferrimagnetikoa izatetik superparamagnetikoa izatera. Horren ondorioz, nanopartikulek monodomeinu magnetiko bezala jokatzen dute, non momentu magnetikoak eremu magnetikoaren

eraginpean honen norabidean lerrokatzen diren. Gainera, eremu magnetiko hau ez aplikatzean nanopartikulen imanazioa zero bihurtzen da, nanopartikula bakoitzaren momentu magnetikoa zoriz biratuz (Cullity, 1972). Hortaz, nanopartikulei txandakako eremu magnetikoa aplikatzean, erlaxazio efektuen ondorioz ingurunera beroa askatzen dute. Sortutako beroa absortzio maila espezifikoaren (specific absorption rate, SAR) bidez neurtzen da.

Hau ikusita asko izan dira propietate honi aplikazioa bilatu nahi izan diotenak medikuntza arloan. Besteak beste, minbiziaren kontrako terapietan alternatiba modura hipertermia magnetikoa dugu. Hipertermia bidezko terapia zelula tumoralen termosentikortasunez baliatzen da: nanopartikula magnetikoak tumore aldean kokatuz eta txandakako eremu magnetikoa aplikatuz, zelula tumoralen nekrosia sortzen dute (Marszall, 2001). Teorikoki erraza dirudien arren, minbizia tratatzeko metodo berri honen garapen prozesua zaila eta mantsoa izaten ari da. Nanopartikula magnetikoak eragindako efektua nabaria izateko, nanopartikulen ezaugarriak, hala nola, tamaina, morfologia, egoera koloidala edo anisotropia magnetikoa kontrolatu behar dira (Jana *et al.*, 2004; Bautista *et al.*, 2005). Gainera, ezinbestekoa da tumoreak tratatzeko erabiltzen diren nanopartikulak biobateragarriak izatea.

Beraz, nanopartikulen propietatez baliatzeko bide bakarra, nanopartikulen sintesi prozesua optimizatzea da. Izan ere, kalitate oneko eta neurri zehatzeko nanopartikulen sintesia oraindik zailtasun handiz jositako prozesua da. Hortaz, ezinbestekoa da sintesi bide moldakorra eta sendoa hautatzea. Aintzindari organometalikoen deskonposizio termikoan oinarritutako sintesi bideak oso eraginkorrak direla frogatu da (Hauser *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2015), baina uretan sakabanatzeko arazoak ematen ohi dituzte eta uretan disolbagarriak izateko beste prozesu batzuk ezinbestekoak dira (Anbarasu *et al.*, 2014).

Hau guztia kontutan hartuta, garapen prozesuan dagoen hipertermia magnetikoan oinarritutako terapiaren hobekuntzan laguntzeko asmoz, lan honetan erabili diren gorputz jariakin magnetikoak osatuko ditzuzten nanopartikulen diseinu, sintesi eta karakterizazio teknika desberdinen inguruko ikerketa aurkezten da.

2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa honen helburu nagusiak hipertermia magnetikoan erabiliko diren gorputz jariakin magnetikoak osatzen dituzten nanopartikula magnetikoen diseinua, sintesia eta karakterizazioa dira. Ondoko hauek, hain zuzen:

- Nanopartikula magnetikoen sintesi metodo bat baino gehiago ikertzea.
- Homogeneoak, kristalinoak eta momentu magnetiko handia duten nanopartikulak lortzea.
- Lortutako nanopartikulak biobateragarri bihurtzea.
- Nanopartikulen karakterizazio kimika, morfologikoa eta magnetikoa garatzea.
- Biobateragarritasun saiakuntzak aurrera eramatea.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

3.1 Arlo esperimentalak

Hipertermian erabili diren nanopartikula (NP) magnetikoen sintesia hiru metodo desberdinen bidez egin da: deskonposizio termikoa, metodo solbotermala eta koprezipitazio metodoa. Honekin, morfologiak nanomaterialen egituretan duen eragina aztertu da. Nanopartikulak X izpi difrakzioaren, mikroskopia elektronikoaren eta lagin bibrazio magnetometroarekin karakterizatu dira. Lortutako materialen artean, imanazio balio hoberenak aurkeztu dituzten nanopartikulak uretan disolbagarri bihurtu dira polimero batez inguratuz. Amaitzeko, biobateragarriak diren nanopartikulekin zitotoxizitatearen saiakuntzak burutu dira.

3.2 Nanopartikulen sintesia

3.2.1. Deskonposizio termikoa.

Nanopartikula handiak lortzeko asmoz, aurretik argitaratu den segidako adizoren prozesuaren bidez sintetizatu dira (Castellanos-Rubio *et al.*, 2014; , Hufschmid *et al.*, 2015). Horretan, $\text{Fe}(\text{CO})_5$ (3 mmol), 1,2-hexadecanediol (5 mmol), azido oleiko (4 mmol), oleilamina (6 mmol) eta bentzil eter (25 ml) hiru lepodun baloi batean nahastu dira. Gero, irabiagailu mekaniko baten laguntzaz eta argonezko atmosferan, disoluzioa 140°C-ra igo da 30 minututan. Disoluzioa tenperatura honetan ordu erdi utzi eta gero, 280°C-ra igo da eta 120 minutuz utzi da errefluxupean. Bigarren, hirugarren eta laugarren adizioak, $\text{Fe}(\text{CO})_5$ (9, 10, 15 mmol), azido oleiko (5, 8, 9 mmol) eta oleilamina (6, 6, 6 mmol) gehituz egin dira (Zhang *et al.*, 2006; Herranz *et al.*, 2008). Amaitzeko disoluzioa hozten utzi da eta etanola eta toluenoarekin garbitu da nanopartikulez osatutako dispertsio koloidala lortu arte (DT nanopartikulak).

Bestalde, morfologiaren eragina aztertzearen nanokuboak sintetizatu dira, burdina(III) azetatozko deskonposizio termikoaren bidez (Yang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (1 mmol), 1, 2-hexadecanediol (4 mmol), azido oleiko (8 mmol), oleilamina (2 mmol) eta bentzil eter (10 ml) hiru lepodun baloi batean nahastu dira. Gero, irabiagailu mekaniko baten laguntzaz eta argonezko atmosferan, disoluzioa 110°C-ra igo da 25 minututan. Disoluzioa tenperatura honetan 60 minutu utzi eta gero, 200°C-ra igo da. 30 minutu eta gero, 300°C-ra igo da, tenperatura horretan ordubete mantenduz. Amaitzeko disoluzioa hozten utzi da eta etanol eta toluenoarekin garbitu da nanokuboz osatutako dispertsio koloidala lortu arte (DT nanokuboak).

3.2.2. Metodo solbotermala.

Metodo solbotermalak nanopartikulen tamaina eta morfologia modu zehatzagoan kontrolatzeko aukera ematen du (Yan *et al.*, 2010; Ou *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2006). Hasteko, 0.65 g (4.0 mmol) burdina(III) kloruro hexahidrato ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) etilenglikol 20 ml-tan disolbatuko dira irabiagailu mekaniko baten laguntzaz. Disoluzioak kolore hori homogeneoa izan bezain laster, 1.80 g sodio azetato gehituko zaizkio eta ordu eta erdi irabiatzen utziko da. Debora hau igarota, 0.25 g trisodio zitrato botako zaizkio eta astintze indarra konstante mantenduz giro tenperaturan 5 orduz irabiatzen da. Kasu honetan, disoluzioaren kolorea horitik marroira aldatuko da. Aipatutako denbora igaro ondoren, disoluzioa 25 mL-ko tefloi batean kokatzen da eta 200 °C-tan 10 orduz labea sartzen da. Azkenik, tefloian sintetizatu berri diren nanopartikulak etanol eta ur-desionizatuarekin 5 aldiz garbitu dira. Azkenik, magnetita nanopartikulak, 12 orduz 60°C-an lehortu dira.

3.2.3. Koprezipitazio metodoa

Koprezipitazioak, nahiz eta solbotermala bezalako zehaztasunik ez duen, metodo sinple eta merkea da (Stara, J.V. eta Klabunde, K.J., 1996). Lehenik eta behin 10 g burdina(II) sulfato heptahidrato ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) eta 21.11 g burdina(III) kloruro (FeCl_3) 100 mL ur destilatuan disolbatu dira. Nahastura homogeneoa denean tantaka 25°C-an dagoen NH_4OH (8M) gehitu zaizkio pH 10 lortu arte. Disoluzioaren kolorea berdetik beltzera aldatu da eta prezipitatu bat sortu da. Momentu horretan disoluzioa 80°C-ra berotu da eta ordu erdiz tenperatura horretan mantendu da. Ondoren, iman baten laguntzaz nanopartikulak berreskuratu dira eta etanola eta ur destilatuarekin garbitu dira.

3.3. Materialen karakterizazioa

Fase guztien identifikazioa X izpien bidezko difrakzioaren bitartez egin dira. Horretarako Eukal Herriko Unibertsitatearen Zerbitzu Orokorretan (SGiKeR) dagoen Philips PW1710 difraktometroa erabili da. Horretan $\text{CuK}\alpha$ erradiazioa, 40 kV eta 40 mA-ko korrontea zehaztu da eta difraktogramaren

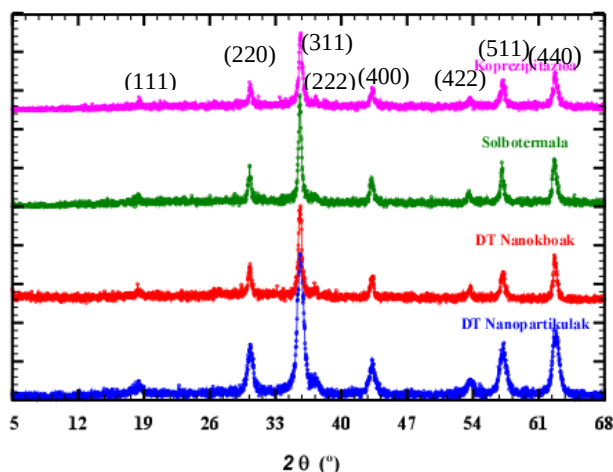
datuak 0.026° -ro jaso dira $5^\circ < 2\theta < 70^\circ$ tartean. Difrakzio datu guztiak FULLPROF programaren bitartez doitu dira (Rodriguez – Carval, 1993).

Analisi morfologikoa transmisiozko mikroskopia elektronikoaren bidez egin da. Honetan 200 kV-ko potentzialako Phillips CM200 mikroskopia erabili da, EDX mikroanalisis duena. Propietate magnetikoak Cryogenic Ltd. magnetometro baten bidez aztertu dira.

3.2.1. Egituraren inguruko karakterizazioa.

X izpien bidezko difrakzio teknikaren bitartez materiaren egitura kristalinoa aztertu da. Kasu honetan, nanopartikulak sintetizatu direnez, laginen tamaina txikiak difraktogramen difrakzio maximo zabalak izatea eragin du. Lagin bakoitzearen datuak FullProf programaren bidez doitu dira. 1 Irudian beha daitekeen bezala, kasu guztietan Fe_3O_4 fasea lortu da (Zhang *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Izan ere, fase horren plano kristalografikoekin bat datozen maximoak behatzen dira: (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511) eta (440).

1. Irudia. Sintetizatutako laginen difraktogramak.



Magnetita egitura kristalino kubikoa du, alderantzizko espinela motakoa. Metodo solbotermala eta koprezipitazioaren bidez sintetizatutako laginek $8.4 \text{ \AA}$ -eko gelaxka unitate parametro aurkeztu dute. Deskonposizio termikoz sintetizatutako nanopartikulek eta nanokuboek $8.3 \text{ \AA}$.

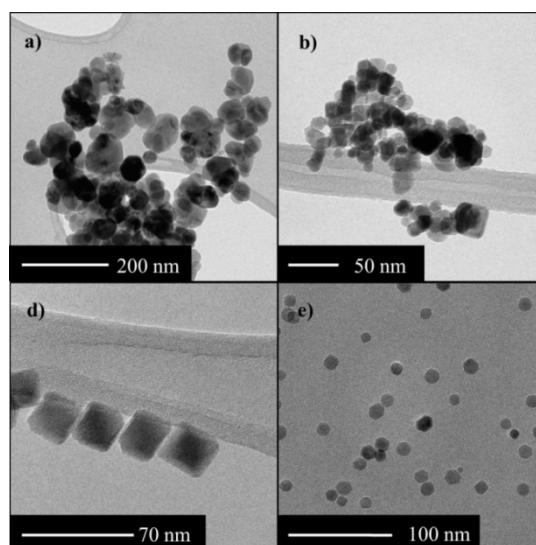
Honez gain, aipatu beharra dago magnetita (Fe_3O_4) eta maghemita ($\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$) faseak oso antzekoak direla eta X izpien difrakzioen bidez oso zaila dela haien artean bereiztea. Hortaz, baliteke sintetizatutako laginetan maghemita fasearen kantitatearen bat agertzea baina difrakzio bidez ez ikustea. Fase honen agerpena propietate magnetikoen bidez hautematea errazagoa izan daiteke, izan ere magnetita baino momentu magnetiko txikiagoa dauka.

3.2.2. Transmisiozko mikroskopia elektronikoa.

Transmisiozko mikroskopia elektronikoaren (TME) bidez nanopartikulen morfologia aztertu da (2. irudia). Alde batetik, metodo solbotermalez (2.a irudia) eta koprezipitazio bidez (2.b irudia) sintetizatutako nanopartikulak ez-homogeneoak eta tamaina dispersio handikoak dira eta multzokatuta daude.

Bestalde, deskonposizio termikoaren bidez sintetizatutako nanokuboak (2.d irudia) eta nanopartikulak (2.e irudia) tamaina dispersio homogeneoa eta morfologia zehatza dute. Nanokuboei dagokienez, 15 nm -ko tamaina dute eta oso kristalikoak dira. Nanopartikulak, aldiz, $14 - 18 \text{ nm}$ bitarteko tamaina eta geometria oktaedrikoa aurkeztu dute.

2. irudia. Metodo desberdinen bidez sintetizatutako nanoegituren TME irudiak. (a) sintesi solbotala; (b) koprezipitazioa; (c) DT nanokuboak; (d) DT nanopartikulak.



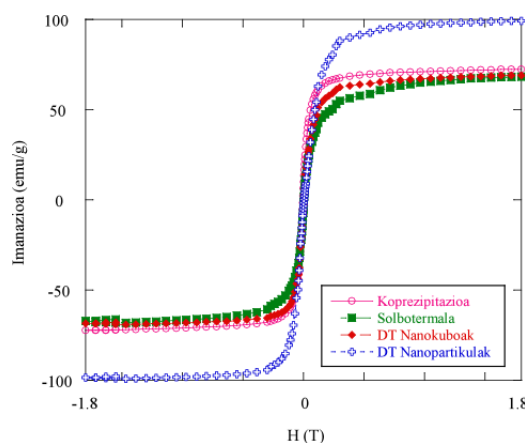
Lehenago aipatu den bezala, nahiz eta sintesi bide berdina izan eta metal aitzindari berdina erabili den, bi kasuetan erabili diren sintesi bolumena eta ligando erlazioa aldatu dira. Modu honetan, aldagai desberdin hauek material magnetiko nanometrikoen sintesian duten eragina aztertu nahi da, etorkizunean bestelako morfologia batzuk egin ahal izateko.

Mikroargazki hauetan behatu ez arren, nanopartikulak materia organikoz inguratutik daude, deskonposizioaren bidez sintetizatutakoak azido oleikoz eta sintesi solbotalaren bidez zitratoz. Materia organikoaren kantitatea kalkulatu ahal izateko, analisi termograbitmetrikoak burutu dira materia organiko portzentailak % 8 – 20 tartekoak izanik (1. taula).

3.2.3. Propietate magnetikoak.

Lagin mugikorrek magnetometria bidez, sintetizatutako nanomaterialen propietate magnetikoak aztertu dira. Propietate hauen ezagutza ezinbestekoa da: Izan ere, hipertermia magnetikoan aplikatu ahal izateko, gero eta imanazio-saturazio altuagoa, orduan eta bero ahalmen handiagoa izango dute eta eraginkorrak izango dira zelulen nekrosia sortzen. 3. irudian nanopartikulen imanazioa eremu magnetikoarekiko agertzen da. Kurba hauetatik, 1. taulan dauden saturazio-magnetizazioa (M_s), eremu koertzitiboa (H_c) eta hondar-magnetizazioa (M_r) balioak lortu dira. Datuak materia organikoaren masa kontutan hartuta zuzenduta daude.

3. irudia. Sintetizatutako nanomaterialen histeresi zikloak 300 K-ean.



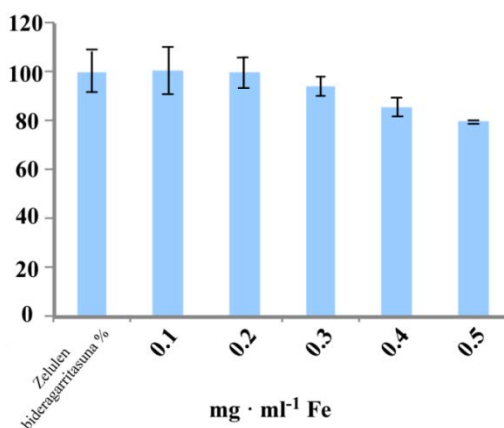
1. taula. Nanoegituren masa galera eta datu magnetikoak

Lagina	Masa galera (%)	Saturazio-magnetizazioa (M_s) (emu/g)	Hondar-magnetizazioa (M_r) (emu/g)	Eremu koertzitiboa (H_c) (T)
Koprezipitazioa	-	69.29	0.65	0.004
Solbotermala	10	65.21	0.17	0.001
DT Nanokuboak	8	70.1	0.025	0.00009
DT Nanopartikulak	20	99.17	0.09	0.00006

3. irudian eta 1. taulan ikus daitekeen bezala, sintetizatutako lagin guztiak superparamagnetikoak dira euren eremu koertzitiboa oso baxua baita inguruko tenperaturan. DT nanopartikulen kasuan izan ezik, laginen imanazio-saturazio balioak ez dira hurbiltzen magnetikak egoera masikoan duen saturazio-magnetizaziora (92 emu/g) (Cullity, 1972). Desbideraketa hauek, maghemitaren agerpenari eragotzi dakioke edo nanopartikulen gainezalean ager daitekeen desordenari (Batlle *et al.*, 2011). Izan ere, maghemitaren imanazio saturazio balioa 82 emu/g inguru dago eta magnetitarena 92 emu/g inguru.

3.2.4. Zitotoxizitatearen saikuntza.

Aurreko imanazio balioak ikusita, deskonposizio termikoz sintetizatutako nanopartikulak hautatu dira zitotoxizitate saiakerak egiteko. Horretarako PMAO (polimaleiko anhidrido-alt-1-oktadekano) polimeroz estali dira eta RGD (*Arg-Gly-Asp*) peptidoz funtzionalizatu dira biobateragarriak izan daitezen. PMAO - RGD ligandoz estalitako nanopartikulak “*Africangreen monkey*” giltzurrun epitelio Vero zeluletan frogatu dira kontzentrazio desberdinetan ($\text{Fe } 0.1 - 0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), 4. irudian ikusten den bezala. Kasu guztietan 24 orduko inkubazioa egin da (Mosmann, 1983).

4. irudia. Vero zeluletan PMAO-RGD ligadoarekin estalikako nanopartikulen zitotoxizitate saikuntza.

Zelulen bideragarritasuna MTT frogaren bidez aztertu da, zeinak deshidrogenasa entzima mitokondrialaren ekintza metabolikoaren maila neurtzen duen. In vitro toxizitate azterketa honek PMAO - RGD ligandoz estalitako nanopartikulek zitotoxizitate maila handia aurkezten ez dutela zehaztu du (ikusi 4. irudia). Dena den, honetan ere ikus daiteke, gero eta kontzentrazio altuagoa erabili orduan eta kalte handiago eragiten dutela nanopartikulek. Hortaz, kontzentrazio txikietan lan egin beharko da, edo kontzentrazio altuetan lan egiteko bestelako ligando organiko biobateragarri bilatu beharko da kalte txikiagoa eragin dezan.

4. Ondorioak

Ikusitakoaren arabera esan daiteke hipertermia magnetikoan aplikatzeko nanopartikularik egokienak deskonposizio termikoz sintetizatutakoak direla. Sintesi honetan erabiltzen diren oleilamina (OA) eta azido oleiko (AO) ligandoen erlazioek morfologia mota bat edo beste lortzea baimentzen du. Kasu honetan, nanopartikula esferikoak lortzeko 3:1 (OA : AO) erlazioa erabili da eta bestalde, 1:4 (OA : AO) nanokuboak lortzeko. Nahiz eta sintetizatutako material guztiak magnetita (Fe_3O_4) fasea diruditen, baliteke sintesiren batean maghemitaren (γ - Fe_2O_3) agerpena egotea. Honek imanazio balioen jaitsiera azalduko luke. Hortaz, deskonposizio termikoa ez diren beste sintesiak baztertuta geratuko dira minbizi tratamendu honetan aplikatu nahi diren nanopartikulen sintesia egiteko. Gainera teknika honen bidez dispersio tamaina txikia eta kristalinitate maila altua lortzen da. Nanokuboak nahiko interesgarriak dirudite, baina imanazio balio jaitsiera horren zergatia aztertzen jarraitu beharko da. Zitotoxizitate entseguaren aldetik esan daiteke nanopartikulak kontzentrazioa igo ahala gero eta toxikoak direla, hortaz, ahalik eta kalte gutxien eragingo duen kontzentrazioarekin lan egingo da.

5. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Etorkizunean hipertermia magnetikoa eragingo duten nukleo magnetikoen hobekuntza egin nahi da. Hau da, bero handiagoa eragingo lukeen nanoegituraren sintesia egin. Honetarako beste metal batzuen ferritak egingo dira: kobaltoa, manganesoa, zinka... Honekin batera, nanoegitura biobateragarria bihurtzeko beste ligando estalki batzuk aztertu nahi dira hauetara funtzio desberdinak izan ditzaketen bestelako ligando batzuk jartzeko, hala nola, “lokalizazio molekular”.

6. Erreferentziak

- Battle, X., Pérez, N., Guardia, P., Iglesias, O., Labarta, A., Bartolomé, F., Garca, L. M., Bartolomé, J., Roca, A. G., Morales, M. P., eta Serna, C. J. (2011) “Magnetic nanoparticles with bulklike properties”, *Journal of Applied Physics*, 109, 07B524-6
- Castellanos-Rubio, I.; Insausti, M.; Garaio, E.; Gil de Muro, I.; Plazaola, F.; Rojo, T.; Lezama, L. (2014), “ Fe_3O_4 nanoparticles prepared by the seeded-growth route for hyperthermia: electron magnetic resonance as a key tool to evaluate size distribution in magnetic nanoparticles”, *Nanoscale*, 6, 7542 – 7552.
- Cullity B. D. (1972), *Introduction to magnetic materials*, Addison-Wesley, Masssachusetts.
- Gleiter, H. (1992), “Nanostructured Materials”, *Advanced Materials*, 4, 474 - 481.
- Henglein, A. (1989), “Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles”. *Chemical Reviews*, 89, 1861 -1873.
- Herranz, F., Morales, M., Roca, A. G., Desco, M. eta Ruiz-Cabello, J. (2008), “A new method for the rapid synthesis of water stable superparamagnetic nanoparticles”, *Chemistry a European Journal*, 14, 9126 – 9130.
- Hufschmid, R., Arami, H., Ferguson, R. M., Gonzales, M., Teeman, E., Brush, L. N., Browning, N. D., Krishnan, K. M.(2015), “Synthesis of phase-pure and monodisperse iron oxide nanoparticles by thermal decomposition”, *Nanoscale*, 7, 11142 – 11154.
- Jiang, S., Eltoukhy, A. A., Love, K. T., Langer R. eta Anderson, D. G (2013) “Lipidoid-coated iron oxide nanoparticles for efficient dna and sirna delivery”, *Nano Letters*, 13, 1059- 1064.
- Koper, O.B. eta Klabunde, K.J. (1997), “Destructive adsorption of chlorinated hydrocarbons on ultrafine (nanoscale) particles of calcium oxide 3 chloroform, trichloroethene and tetrachloroethene”. *Chemistry of Materials*, 9, 2481 - 2485.
- Lartigue, L., Innocenti, C., Kalaivani, T., Awwad, A., Sanchez M. D. M., Guari, Y., Larionova, J., Guérin, C., Montero, J. L. G., Barragan-Montero, V., Arosio, P., Lascialfari, A., Gatteschi D. eta Sangregorio, C. (2011) “Water-dispersible sugar-coated iron oxide nanoparticles. an evaluation of

- their relaxometric and magnetic hyperthermia properties”, *Journal of American Chemical Society*, 133, 10459 - 10472.
- Marszall, M.P (2001), “Aplication of magnetic nanoparticles in pharmatheutical science. *Pharmatheutical Research*, 28, 480 – 483.
- Mosmann, T. (1983), “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays”, *Journal of Immunological Methods* , 65, 55–63.
- Ou P., Xu G., Xu C., Zhang Y., Hou X., Han G. (2010) “Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles by a simple solvothermal method”, *Material Science – Poland*, 28(4), 817 - 822.
- Roco, M.C. (2002), “Government nanotechnology funding:An international outlook”. *Journal of The Minerals, Metals & Materials Society*, 54, 22 - 23.
- Rodriguez – Carval, J. (1993) “Recent advances in magnetic structure determination by neutron powder diffraction” *Physica B: Condensed Matter*, 192, 55 – 69.
- Stara, J.V. eta Klabunde, K.J. (1996), “Nanoscale metal oxide particles/clusters as chemical reagents. adsorption of hydrogen halides, nitric oxide, and sulfur trioxide on magnesium oxide nanocrystals ans compared with microcrystals». *Chemistry of Materials*, 8, 1913 - 1918.
- Stara, J.V., Park, D.G., Lagadie, I. eta Klabunde, K.J. (1996), “Nanoscale metal oxide particles/clusters as chemical reagents. unique surface chemistry on magnesium oxide as pressure dependence” *Chemistry of Materials*, 8, 1904-1912
- Sun J, Zhou S, Hou P, Yang Y, Weng J, Li X. (2006), “Synthesis and characterization of biocompatible Fe₃O₄ nanoparticles”, *Journal of Biomedical Material Research Part A*. 80(2), 335 - 341.
- Sun, Y. eta Xia, Y. (2002), “Shape-Controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*, 298, 2176 - 2179.
- Wang T., Wang X, Lamontagne D., Wang Z., Wang Z. eta Cao Y.C. (2012) Shape-controlled synthesis of colloidal superparticles from nanocubes”, *Journal of American Chemical Society*, 134, 18225 – 18228.
- Weller, H. (2003), “Colloidal semiconductor q-particles: chemistry in the transition region between solid state and molecules”. *Angewandte Chemie International Edition*, 32, 41 - 53.
- Yan H., Liping Z., Weiwei H., Xiaojuan L., Xiangnong L., Yuxiang Y. (2010) “A study on synthesis and properties of Fe₃O₄ nanoparticles by solvothermal method”, *Glass Physical Chemistry*, 36(3), 325 - 331.
- Yang H., Ogawa T., Hasegawa D. eta Takashi M. (2008), “Synthesis and magnetic properties of monodisperse magnetite nanocubes”, *Journal of Applied Physics*. 103, 07D526
- Yong-Mei H., Mana C., Zhong-Bo H. (2010), “Effective removal of Cu (II) ions from aqueous solution by amino-functionalized magnetic nanoparticles”, *Journal Hazardous Materials*, 184, 392 – 399
- Zhang, L., He, R. eta Gu, H.-C. (2006) “Synthesis and kinetic shape and size evolution of magnetite nanoparticles“, *Materials Research Bulletin* , 41, 260 – 267.

7. Esker onak

Eskerrak eman nahi dizkiogu Eusko Jaurlaritzari GIC-IT-570-13 erreferiantziadun Ikerketa Taldearen laguntzagarik eta Ekonomia eta Lehiakortasun Espaniako Ministerioari MAT2016-78266-P proiektuagarik. Era berean, eskertu beharrekoak ditugu Euskal Herriko Unibertsitateko SGIKER zerbitzu orokorrak, neurketa guztiak han burutu baitira.

MAGI2-ren aldaera genetikoaren asoziazioa eta adierazpen alterazioa eritasun zeliakoan

Amaia Jauregi-Miguel¹, Izortze Santin², Irati Romero-Garmendia¹, Koldo Garcia-Etxebarria¹, Iñaki Irastorza³, Ainara Castellanos-Rubio^{1*}, Jose Ramon Bilbao^{1*}

¹*Immunogenetika laborategia, Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalia Fisiologia Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria, Espainia*

²*Endokrinologia eta Diabetes ikerketa taldea, BioCruces Ikerketa Institutua eta Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria, Espainia*

³*Haur Gastroenterologia, Gaixotasun zeliakoa, Nutrizioa eta digestio hodiko gaixotasunen ikerketa taldea, Pediatria Saila, BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria, Espainia*

amaia.jauregim@ehu.eus

Laburpena

Lotura hertsia (LH), zeluletan agertzen diren zelularteko loturak dira. Eritasun zeliakoan (EZ), heste meharreko LH egiturak erabat apurtuta daude eta ondorioz zelularteko fluxua emendatu egiten da, irentsitateko glutenaren barneraketa erraztuz. Ikerketa honen helburua, zeliakian LH-en galera funtzionalaren eragile genetikoak identifikatzea eta karakterizatzea izan da. Lehendik LH-en bidezidorrarekin erlazionatuta dagoen eskualde genomiko bat zeliakiarekin asoziatuta dagoela baieztatu dugu gaixo-talde berri batean. Asoziazioaz gain, eskualdean kokaturiko MAGI2 eta RP4-587D13.2 geneen adierazpena gutxitua dago gaixoetan. Gainera, analisi funtzionalen arabera, alterazio hauek LH funtzionalitateari eragin diezaioke.

Hitz gakoak: Eritasun zeliakoa, lotura hertsia, MAGI2, RP4-587D13.2

Abstract

In Celiac disease (CD), there is a loss of intestinal barrier function due to structural alterations in the Tight Junction (TJ) network, the most apical unions between epithelial cells. The association of TJ related gene variants points to an implication of this network in disease susceptibility. In the current study, we replicated the association of rs6962966, located in an intron of TJ-related MAGI2 gene and upstream of RP4-587D13.2 long non-coding RNA (lncRNA). We found that both, MAGI2 and RP4-587D13.2, are significantly downregulated in duodenal biopsies of active and treated CD patients. These findings show that the associated region is functionally altered in disease and suggest that RP4-587D13.2 and MAGI2 may be regulating the celiac disease related TJ alterations.

Keywords: Celiac disease, tight junctions, MAGI2, RP4-587D13.2

1. Sarrera eta motibazioa

Eritasun zeliakoa (EZ), gariaren glutenarekiko zein zekale eta garagarrean agertzen diren antzeko proteinekiko intolerantziaren eraginez garatzen den enteropatia autoimmune kronikoa da. Glutenaren gliadina proteinak, genetikoki suszeptibleak diren pertsonetan erantzun immune akasuna sortzen du, hesteetako mukosan lesioak eraginez. Horren ondorioz, elikagaien xurgapena nabarmen murrizten da hestean eta gaixoei, besteak beste, pisu galera, anemia, beherakoak eta masa muskularraren gutxitzea jasaten dute. Europar jatorrizko populazioan, %1eko maiztasuna du eta egun, tratamendu eraginkor bakarra biziarteko glutenik gabeko dieta hertsia da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Eritasun konplexua da zeliakia, ingurune-faktoreek eta faktore-genetikoek parte hartzen dutelarik. Horregatik, nahiz eta arrisku genetiko garrantzitsua ezaguna izan, Giza Antigeno Leukozitarioaren zenbait aldaera (ingelesez Human Leucocyte Antigen edo HLA), alegia, haien ekarpena ez da nahikoa eritasunaren garapena azaltzeko (Houlston R.S. *et al.*, 1996).

Genoma osoko asoziazio azterketek eta ondoko analisisiek HLA ez diren eta zeliakiarekin asoziatuak dauden beste hainbat eremu genomiko identifikatu dituzte (van Heel *et al.*, 2007; Dubois *et al.*, 2010; Trynka *et al.*, 2011; Garcia-Etxebarria *et al.*, 2016). Bertako geneak zeliakiaren erantzule funtzionalak izan daitezkeela iradoki da eta ikerketa ugari egin dira hauen inguruan. Dena den, asoziatuak aldaera gehienak (nukleotido bakarrek aldaerak edo SNP), iradokitako gene kodetzaile hauetatik kanpo kokatzen direla ikusi da eta honek, genomaren erregulaziorako sistema konplexuaren atzean dauden elementu ez-kodetzaileen garrantzia azpimarratu du (hala nola aldaera estrukturalak eta epigenetikoak). Horien artean, RNA ez-kodetzaile luzeak (lncRNA), >200 base-pareko luzera duten eta proteina kodetzen ez duten RNA molekulak, interes handia piztu dute, geneen adierazpenaren erregulatzaile garrantzitsuak direla ikusi baita eta berriki, EZaren garapenean partaide direla baieztatu da (Castellanos A. *et al.*, 2016).

Bestalde, ezaguna den sistema immunitarioaren erantzun bortitzez gain, eragin txikiagoz baina gaixotasuna garatzeko beharrezkoak diren beste bidezidor biologikoen (eta beste hainbat arrisku genetikoek) garrantzia azpimarratu da eta besteak beste, zelularteko loturak ikertu dira (Castellanos-Rubio A. *et al.*, 2010). Zelularteko loturak ehunen osotasuna mantentzen laguntzen dute. Egitura apikalenak, lotura hertsiek (LH), zelulen artean gerriko estu eta jarrai bat eratzen dute, eta haien bidez kontrolatzen da zelularteko fluxua, kanpo ingurunearekiko hesi selektibo gisa jokatzuz (Tsukita S. *et al.*, 2001). EZdun gaixoei LHen morfologia eraldatua eta hesteetako iragazkortasuna emendatua daukate, gliadinaren zelularteko fluxu libre baimenduz eta sistema immunitarioaren erantzuna areagotuz (Schulzke J.D. *et al.*, 1998; Ciccocioppo R. *et al.*, 2006; Jauregi-Miguel A., *et al.*, 2014). Disfuntzio horrek oinarri genetikoak izan dezakeela iradoki da, alde batetik gaixotasunaren hasierako faseetan agertzen delako eta bestetik, glutenik gabeko dieta jarraitzen duten sintomarik gabeko gaixoei kalteak irauten dutelako (Bjarnason I., *et al.* 1984; Bjarnason I., *et al.* 1985). Hau horrela, LHen bidezidorrarekin erlazionatuta dauden geneak gaixotasunaren susceptibilitaterako hautagai potentzialak direla ondorioztatzen da.

Ikerketa honen helburua, zeliakian gertatzen den LHen bidezidorraren funtzio galeraren erantzule genetikoak identifikatzea eta karakterizatzea izan da eta horretarako, asoziazio analisiak eta analisi funtzionalak egin dira.

3. Ikerketaren muina

3.1 *MAGI2* genearen aldaera introniko bat zeliakiarekin asoziatuta dago

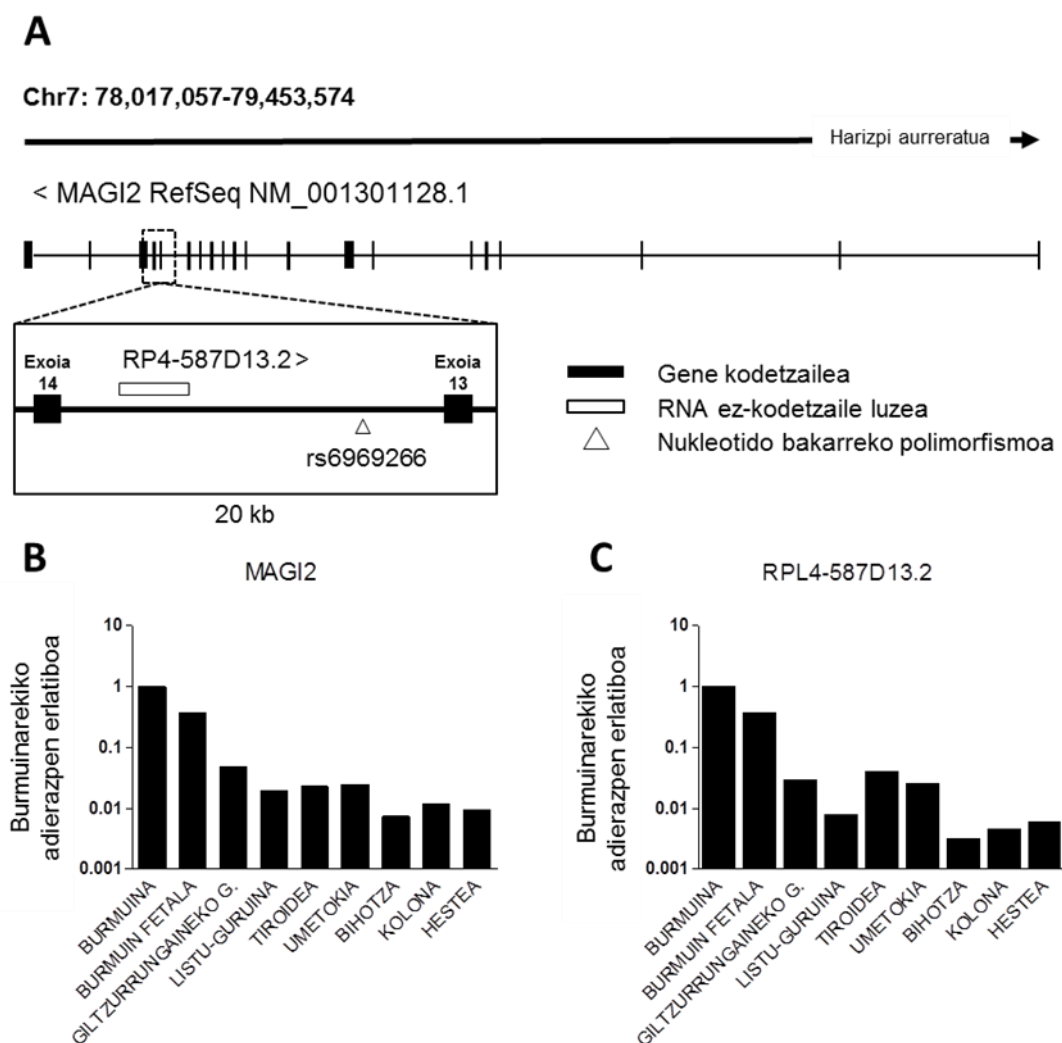
MYO9B, *PARD3* eta *MAGI2* geneetako hainbat SNP hesteetako gaixotasunetan ematen den iragazkortasun emendatuarekin asoziatu dira (Wapenaar MC. *et al.*, 2008). Gene horiek LHen bidezidorrarekin partaide direnez, aldaera hauek zeliakian ohikoa den LHen disfuntzioaren eragile ote diren aztertu nahi izan dugu. Horretarako, *MAGI2*-ko 3 SNP, *PARD3*-ko 2 SNP eta *MYO9B*-ko 3 SNP genotipatu ziren 270 eri zeliakoen (kasuak) eta 91 kontrol ez zeliakoen DNA laginetan, eta asoziazio analisia burutu zen. *MAGI2* geneko introi batean kokatuta dagoen rs6962966*A aldaera EZ gaixotasunarekin asoziatuta dagoela ikusi genuen (P balioa = 0,0029; OR =1,88 [%95 KT 1,24-2,87]), hau da, genomako gune honetan G edo A nukleotidoa ager daiteke populazioan eta gure emaitzen arabera, A aldaeraren maiztasuna altuagoa da gaixoei kontrolatzen baino. Honek, aldaera hori EZaren garapenarekin erlazionatuta egon daitekeela baieztatzen du, aurretik Holanda eta Erresuma Batuko populazioetan ikusitakoa berretsiz (Wapenaar MC. *et al.*, 2008). *PARD3* eta *MYO9B* geneen kasuan aldiz, ez dugu asoziaziorik aurkitu zeliakiarekin, aldaera horiek hesteetako beste hanturazko gaixotasunarekin lotuta badaude ere (Chen YQ. *et al.*, 2016).

SNParen asoziazioa egon arren, jarraipen azterketarik ez da oraindik burutu eta ez dago frogatuta aldaera horrek *MAGI2* genearen funtzioan edota beste elementu erregulatzaileran batean eraginik duenik. *MAGI2* genearen inguru genomikoa aztertzean (1. irudia) *MAGI2* genetik 3,8 kb-tara zentromero aldera, RP4-587D13.2 funtzio biologiko ezezaguneko RNA luze

ez-kodetzailea (lncRNA) dagoela ikusi genuen. Azken urteotan genoma ez-kodetzaileak erregulazio genomikoan duen garrantziaz jabetuta, hura ere aztertzea erabaki genuen.

LncRNA honen funtzio biologikoa ezezaguna denez, gizakiaren organo ezberdinetan bere adierazpena aztertu genuen. *MAGI2* genearen antzera, RP4-587D13.2 aztertutako organo guztietan adierazten da, burmuinean adierazpen maila nabarmenki altua izanik (1. irudia). Jakina da *MAGI2* geneak funtzio ezberdinak dituela neuronetan, botoi sinpatikoetan moldatzaile gisa edota neuritoen hedapenaren erregulatzaile gisa, esaterako (Hisata S., *et al.*, 2007; Nagashima S., *et al.*, 2015). Hala ere, ehun ez neuronaletan ere LHen bidezidorreko partaide modura zelula estrukturan osotasuna mantentzeko funtsezkoa dela ikusi da. Bestaldetik, *MAGI2* genearen eta RP4-587D13.2 lncRNA-ren adierazpen joera antzekoa izateak bien funtzioak erlazionatuta egon daitezkeela iradokitzen digu eta beraz, RP4-587D13.2 LHen bidezidorraren erregulazioaren partaide izan daiteke.

1. irudia. A) EZarekin asoziatutako rs6962966 SNParen inguru genomikoa. SNP hautagaiaren inguruko 20 kb-ko eskualdea ere irudikatzen da. B eta C) *MAGI2* genearen eta RPL4-587D13.2 lncRNA-ren adierazpen profila 9 giza organotan. Balioak adierazpen maila altuena duen ehunarekiko (burmuina) erlatibizatu dira.

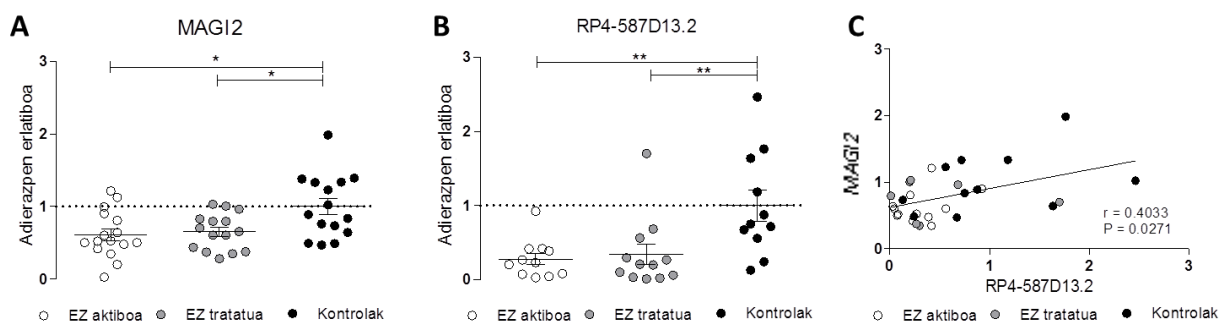


3.2 *MAGI2* eta RP4-587D13.2 adierazpenak gutxituak daude EZan

Gure emaitzek, rs6962966*A aldaera zeliakiarekin asoziatuta dagoela baieztatu dute eta beraz, gune horretan dauden *MAGI2* genearen eta RP4-587D13.2 lncRNAren funtzioa gaixotasunean aldatua dagoen ikertu dugu. Horretarako, bi elementuen adierazpena aztertu genuen 16 EZ gaixoen eta 16 kontrol osasuntsuen heste mukosan. Gaixoak bi egoera ezberdinetan aztertu ziren: batetik diagnostikoaren unean (EZ aktiboan) eta bestetik, glutenik gabeko dietaz (GGD) tratatu ostean (EZ tratatua). Bai RP4-587D13.2-ren zein *MAGI2*-ren adierazpena baxuagoa da gaixoetan kontrol osasuntsuetan baino (p balorea = 0,017 eta 0,048, hurrenez hurren) (2. irudia). Gainera, gaixoak glutenik gabeko dietaz tratatu eta hesteetako atrofia sendatu ostean ere, azpiadierazpena mantendu egiten da (p baloreak = 0,023 eta 0,007 RP4-587D13.2 eta *MAGI2*rako, hurrenez hurren) (2. irudia). Hau horrela, ez dirudi eskualde genomikoaren adierazpen aldaketak glutenaren irenketak eragindako erantzun immunitarioaren ondorio direnik. Gure emaitzek pazienteek erakutsitako eskualde genomikoaren alterazioa berezkoa dela adierazten dute, inplikazio genetikoak iradokiz. Gainera, kasu honetan ere, *MAGI2* eta RP4-587D13.2 koadierazita daude (p balorea = 0,027), gaixotasunean biek antzera jokatzuz (2. irudia). Azken honek, bi elementuen funtzioa erlazionatuta dagoela eta ziurrenik prozesu biologiko berdinak erregulatzen dituztela iradokitzen du.

Hasiera batean aldaketa hauek asoziatutako rs6962966 SNParen ondorio zirela pentsatu bagenuen ere, heste mukosako lagin hauen genotipaketak erakutsi zuen adierazpenaren alterazioa ez datorrela A aleloaren presentziarekin bat.

2. irudia. A) *MAGI2* genearen eta B) RPL4-587D13.2 lncRNA-ren adierazpen mailak gaixoen (EZ aktibo eta EZ tratatu) eta kontrol osasuntsuen heste mukosan. Adierazpen balioak kontrolen batz bestearikiko erlatibizatu dira. Grafikoetan lagingen batz bestekoa eta batez bestekoaren errore tipikoa erakusten dira. Asteriskoek adierazpen aldaketa esanguratsuak irudikatzen dituzte (* p balioa 0,01 eta 0,05 artean; ** p balioa 0,001 eta 0,01 artean). C) *MAGI2* eta RPL4-587D13.2 adierazpen mailen arteko korrelazioa. Erregresio linealaren r eta P balioak erakusten dira.

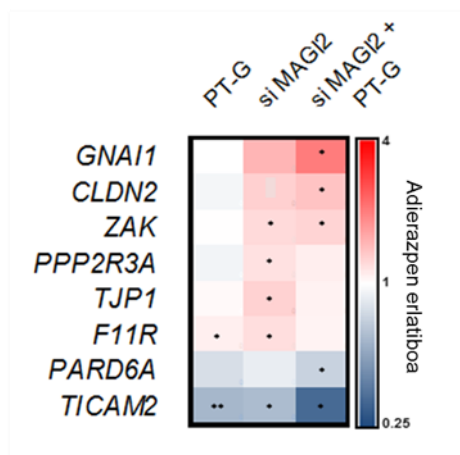


3.3 *MAGI2*-ren isilarazpenak LH bidezidorreko geneen alterazioa eragiten du

EZ gaixoetan ikusitako adierazpen aldaketek eragin biologiko bat duten aztertu nahi izan genuen hurrena. *MAGI2* genea LHen bidezidorreko parte denez, honen adierazpen baxuak LH bidezidorraren funtzionalitatean eragina izan zezakeela hipotetizatu genuen. Interferentzia RNA txikiak edo siRNAk, gene baten funtzioa aztertzeke eta gaixotasunaren garapenean izan dezakeen eginkizuna ikertzeke tresna oso aproposak dira. Metodo horren bidez, *MAGI2* genearen adierazpena isilarazi genuen *in vitro*, hesteko zelula lerro baten kulturaren, eta *MAGI2*-ren isilarazpenak LHen bidezidorreko gainontzeko geneen adierazpenean zuen eragina neurtu genuen. Gainera, gaixoen heste meharreko egoera erreproduzitzeko helburuarekin, glutenaren irenketak gene hauen adierazpenean izan dezakeen eragina ere neurtu genuen. Horretarako, *MAGI2* genea isilarazita zuten zelulak, gliadinaz kitzikatu ziren 4 orduz, urdailean dauden pepsina eta tripsina entzimez digeritutako gliadinaz (PT-G) hain zuzen. Isilarazpen eta kitzikapen guztien ostean, 22 geneko multzoaren adierazpena neurtu zen, denak LHen bidezidorrarekin erlazionatutakoak.

3. irudian ikus daitekeen moduan, 22 geneetatik 8k aldaketak jasan zituzten isilarazpenen eta kitzikapenen ostean. Orokorrean, *MAGI2* genearen isilarazpenak gliadinaren kitzikapenak baino eragin handiagoa izan zuen, bere funtzioa LHen bidezidorraren osotasunerako garrantzitsua dela adieraziz. Bestalde, gliadinaren efektuak *MAGI2*ren isilarazpenak sortutako adierazpen aldaketak areagotu zituen. Eredu zelular hau zeliakiaren eredu baliogarritzat hartzen badugu, baliteke *MAGI2*ren azpiadierazpena LH bidezidorraren osotasunean eragiten egotea eta glutenaren irenketak alterazio horiek indartzea.

3. irudia. LHen bidezidorreko gene hautagaien adierazpen profila tratamendu zelular ezberdinen ostean. Adierazpen balioak isilarazi eta kitzikatu gabeko zelula kontrolen batzuekiko erlatibizatu dira eta kolore eskala baten arabera irudikatu. Zutabek tratamenduak eta lerroak aldaketa esanguratsuak jasan dituzten gene hautagaiak. Asteriskoek adierazpen aldaketa esanguratsuak irudikatzen (*p balioa 0,01 eta 0,05 artean; **p balioa 0,001 eta 0,01 artean).



4. Ondorioak

Laburbilduz, zeliakian adierazpena aldatuta duen eta asoziatuta dagoen eskualde genomiko bat identifikatu dugu, gaixotasunaren garapenean zerikusia izan dezakeena. Gaixoetan ikusitako eskualde honetako RP4-587D13.2ren eta *MAGI2* genearen berezko azpiadierazpenak, LHen egituren funtzionalitatean eragiten duela iradokitzen du. LHen egituren desantolaketa honek, gaixoen hesteetako iragazkortasunaren emendioa eragingo luke, irentsitako glutenarekiko erantzuna emendatuz.

5. Etorkizunerako planteatzeko den norabidea

Etorkizunean, asoziatutako eskualde genomikoa hobeto karakterizatu nahiko genuke. Alde batetik, RP4-587D13.2 eta *MAGI2* genearen arteko erlazioa baieztatu nahi dugu, lncRNAren gainadierazpenak *MAGI2*an duen eragina aztertuz. Bestalde, analisi funtzional sakonagoak egin ahal izateko, CRISPR teknikaren bidez RP4-587D13.2 eta *MAGI2* mutatu duten zelula-lerroak sortu eta LHen bidezidorrean gertatzen diren aldaketak ikertuko ditugu, eskualde honen erregulazio mekanismoak identifikatzeko.

6. Erreferentziak

- Bjarnason I., *et al.* (1984), In vitro determination of small intestinal permeability: demonstration of a persistent defect in patients with coeliac disease, *Gut*, 25,145–50.
- Bjarnason I., *et al.* (1985), Intestinal permeability in patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis, *Gut*,26,1214–9.
- Castellanos-Rubio, A., *et al.* (2010), Long-term and acute effects of gliadin on small intestine of patients on potentially pathogenic networks in celiac disease, *Autoimmunity*, 43, 131-9.
- Castellanos-Rubio, A., *et al.* (2016), A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease, *Science*, 352,91-5.
- Chen YQ., *et al.* (2016), Lack of Association between MYO9B Gene Polymorphisms and Susceptibility to Coeliac Disease in Caucasians: Evidence from a Meta-Analysis, *Immunol Invest.*, 45, 396-405.
- Ciccocioppo R., *et al.* (2006), Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease, *Am J Clin Pathol*, 125, 502–11.
- Dubois, P., *et al.* (2010), Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression, *Nat. Genet.*, 42, 295-302.
- Garcia-Etxebarria, K., *et al.* (2016), Ancestry-based stratified analysis of ImmunoChip data identifies novel associations with celiac disease, *Eur. J. Hum. Genet.*, 1-4.
- Hisata S., *et al.* (2007), Rap1-PDZ-GEF1 interacts with a neurotrophin receptor at late endosomes, leading to sustained activation of Rap1 and ERK and neurite outgrowth, *J Cell Biol.*, 27, 843-60.
- Houlston RS., *et al.* (1996), Genetics of coeliac disease, *QJM*, 89, 737–43.
- Jauregi-Miguel A., *et al.*, (2014), Alteration of tight junction gene expression in celiac disease, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 58, 762-7.
- Nagashima S., *et al.* (2015), MAGI2/S-SCAM outside brain. *J Biochem.*,157, 177-84.
- Schulzke JD, *et al.* (1995), Epithelial barrier and ion transport in coeliac sprue: electrical measurements on intestinal aspiration biopsy specimens. *Gut* 1995;37:777–82.
- Schulzke JD., *et al.* (1998), Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue, *Pediatr Res* 43, 435–41.
- Trynka G., *et al.* (2011), Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease, *Nat Genet*, 43, 1193–201.
- Tsukita S., *et al.* (2001), Multifunctional strands in tight junctions, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 285–93.
- van Heel, D.A., *et al.* (2007), A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the región harboring IL2 and IL21, *Nat. Genet.*, 39, 827-9.
- Wapenaar MC., *et al.* (2008), Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis, *Gut*, 57, 463-7.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau ISCIII (PI13/01201) ikerketa proiektuaren bitartez finantzatu da. Egileek SGikerrek (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, EGEF eta EGIF) emandako laguntza teknikoa eta gizatiarra eskertzen dute.

Glutamatoaren eta kannabinoideen neurohartzaileak hipokanpoko hilusean

Medrano A, Gómez SM, Grandes P

“Sistema endokannabinoidea burmuin osasuntsu eta gaixoa”, Neurozientzia kliniko, basiko eta funtzional integratuko unitatea.

Neurozientzia Saila.

Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea.

Euskal Herriko Unibertsitatea - EHU.

Aitor.medrano.peral@gmail.com

Laburpena

Garuneko hipokanpoan horzdun zirkunboluzioa dago, zeinek geruza molekularra, granularra eta hilusa dituen. Azkenengo estratu horren barnean CB1 errezeptore endokannabinoideak aurkezten duen, mGlu1 eta mGlu5 errezeptore glutamatergikoenganako hartuemonak egiaztatu da, baina, oraindik, CB-ek beste errezeptore glutamatergikoekiko harremanik ez da baieztatu. Hau dela eta, bai hiluseko neuronetan, bai zelula glialetan, mGlu2, mGlu3 eta CB1-aren arteko erlazioak eszitabilitatearen kontrolean duen parte-hartzea frogatzeko, sagu-horzdun zirkunboluzioaren aurremurgiltze teknika immunohistokimikoak gauzatu ziren, mGlu2, mGlu3 eta CB1 neurohartzaileak markatuz, gero ehuna mikroskopio elektronikoan aztertzeko. Bi motetako errezeptore hauen kokapen hurbila ikusi zen hilusean.

Hitz gakoak: Hilusa, glutamatoa, sistema endokannabinoidea, immunohistokimika

Abstract

The dentate gyrus is a part of the hippocampus in the brain formed by three layers: molecular, granular and the hilus. In the last later, there is crosstalk between glutamatergic mGlu1 and mGlu5 receptors and endocannabinoid receptor CB1, but its underlying relationships with any other glutamatergic receptor are presently unknown. Here, we want to test the possibility of an interplay between metabotropic glutamate receptors mGlu2 and mGlu3 and CB1 receptor, both in neuronal and glial cells by showing their location at subcellular level. In order to prove this, we performed immunohistochemical reactions double labelling mGlu2/3 and CB1 in mouse brain to examine tissue under the electron microscope. Both kinds of receptors were found in close vicinity in the hilus.

Keywords: Hilus, glutamate, endocannabinoid system, immunohistochemistry

1. Sarrera eta motibazioa

Hipokanpoa zirkuitu eszitatzaileek bereizitako egitura zerebrala da eta bere bide eszitatzaile nagusia, bestek beste, bide zulatzailea. Zirukuitu eta bide horien erretroalimentazio positiborako gaitasunak, euren aktibazioa eta eszitazioaren mantentzea ahalbidetzen du. Ezaugarri hori oroimen-sormenaren oinarria da, baina, batzutan, erretroalimentazio positibo horrek, neurona taldeen etengabeko eszitazio mantendu eta nahaspilatua eragiten du eta krisi epileptikoak gertatzen dira. Egoera horrek, zelulen barnean kaltzio kontzentrazio kaltegarriak metatzea ahalbidetzen du, eta, eszitotoxiko deritzogun mekanismoaren bidez, lesio zelularra eta apoptosia sortzen da (Ben-Ari, 2002; Zhang et al., 2015).

Neuronen eszitazioaren oreka mantentzeko badaude hipokanpoan kontrol mekanismo espezifiko batzuk, eretroalimentazio negatiboko sistemak. Sistema horietariko batzuek maila molekularrean daukate eragina eta sinapsi eszitatzaileetan kokatzen dira, errezeptoreen bidez zelula ezitatzaileak inhibituz, inpultsu eszitatzailea blokeatuz edota hauen transmisioa mugatuz.

Horzdun zirkunboluzioa hipokanpoan kokatzen da eta molekular, granular eta hilus geruzak ditu. Geruza molekularrean bide zulatzaileko zuntzek zelula granularrekin sinapsia egiten dute modu oso espezifikoan (Van Groen et al., 2002). Aldi berean, zelula granularrek bultzada eszitatzailea hau hipokanpoko beste egituretara zabaltzen dute. Bide eferente horrek hiluseko zeluletan egiten du sinapsi, albo-adarren bidez eta hauen eszitazioa eragiten dute (Amaral, 1978).

Geruza molekularrean glutamato errezeptoreen bidez, hauen artean mGlu2 eta 3 errezeptore metabotropikoak, sinapsiaren kontrola erregulatzen da. Errezeptore hauen presentzia bai neuronetan eta bai glia zeluletan ikus daiteke (Petreria et al., 1996, Neki et al., 1996, Shigemoto et al., 1997) eta iraupen luzeko oroimenaren eraketan parte hartzen dute botoi sinaptikoan transmisioa modulatu (Altinbilek eta Manahan-Vaughan, 2009). Badago beste errezeptore mota bat neurona postsinaptikoan, neurona presinaptikoak askatzen dituen substantzien arabera erreakzionatzen duena, CB1 errezeptore endokannabinoida. Orokorrean errezeptore hau neurona GABAergikoetan kokatzen da (Tsou et al., 1999, Kawamura et al., 2006), baina, terminal sinaptiko eszitatzaileetan ere aurkitu izan da (Uchigashima et al., 2011). Aldi berean, mGlu3 sinapsi glutamatergikoen inguruan dauden zelula glial eta terminal pre eta postsinaptikoetan agertzen da (Tamaru et al., 2001), eta eszitazioaren kontrolean parte hartzen du.

Errezeptore hauen kokapena eta hartuemonak, hilusa osotzen duten elementuetan, oinarritzkoak izan daitezke hilusaren zelulek inpultsu eszitatzailea zelan kontrolatzen duten ulertzerako orduan. Hipokanpoko transmisio eszitatzailea epilepsiaren moduko prozesu kliniko larrien arduraduna denez, puntu espezifiko honetako interakzio ahalmenaren ulerpenera ezagutza garrantzitsua izan daiteke klinikara estrapolatzerako orduan.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

2.1 Hipotesia

Gure hipotesia hau da: hipokanpoaren beste eremuetako sistema erregulatuzaileek hilusean eduki dezaketela erreplika, zuntz goroldiosuetatik datorren informazioarekin batera, eretroalimentazio negatibozko sistema moduan jarduteko bide zulatzaile eta zelula granularren arteko transmisioan.

2.2 Helburuak

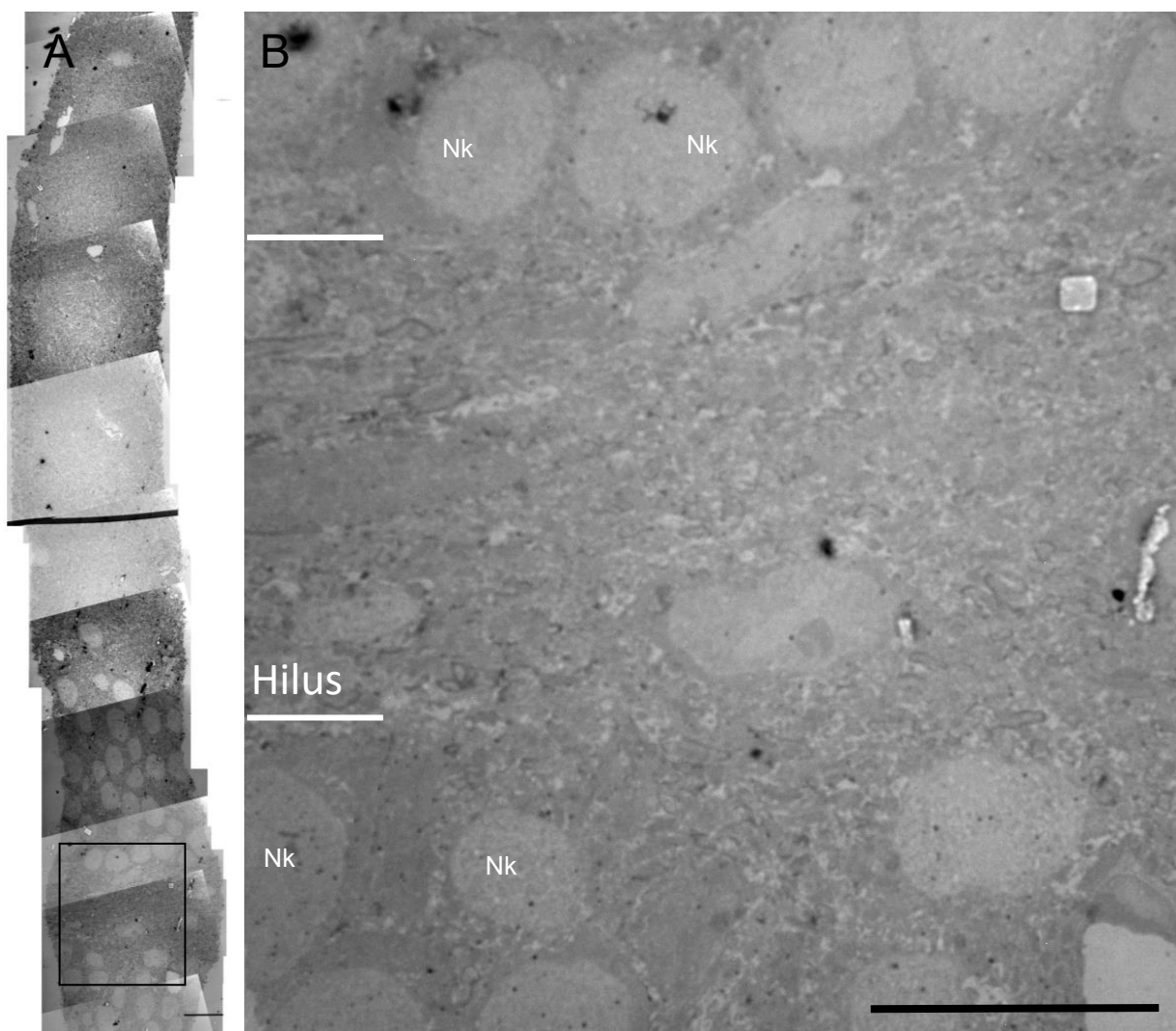
- CB1, mGlu2 eta mGlu3 errezeptoreen hiluseko presentzia egiaztatu
- CB1, mGlu2 eta mGlu3 errezeptoreen arteko erlazio espaziala zehaztu, maila zelular eta sinaptikoan, erresoluzio handiko mikroskopiaren bidez.

3. Ikerketaren muina

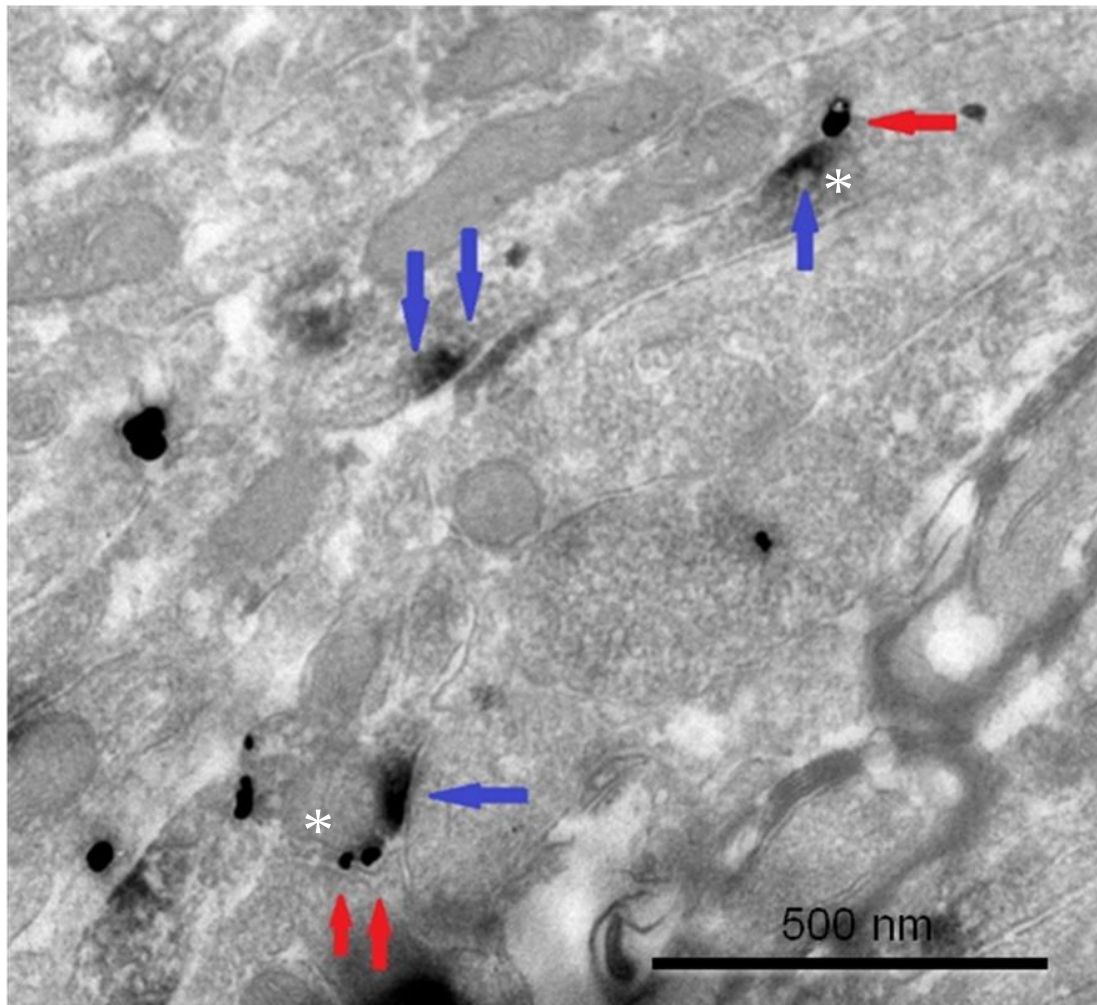
Sagu hipokanpoetan mGlu2/3 eta CB1errezeptoreak markatu ostean, ehuna mikroskopia elektronikoan aztertu zen, bi motatako errezeptoreen arteko erlazioa argitzeko, hilus eremuan. Hilusa identifikatu genuen, hortzdun zirkunboluzioan (1. Irudia), eta magnifikazio handiko argazkiak atera genituen.

Magnifikazio handiko argazkietan diaminobenzidinaren (DAB) markaketa ikusten zen glutamatoko mGlu2eta3 errezeptoreen presentzia adieraziz. Halaber, urre-partikulak ikusten ziren CB1 errezeptoreak markatuz. Bi markaketen hurbiltasuna eta erlazio topografikoa ere egiaztatu zen hiluseko eremuan.

3.1 Irudiak



1. **Irudia.** **A** Hortzdun zirkunboluzioa, mikroskopia elektroniko bidezko argazkietan. **B.** A irudiko laukiaren barruan dagoen eremua magnifikazio handiagoz ikusita, hilus geruza bereizteko. Hilusa mikroskopia elektronikoaren bidez ateratako argazkietan. Hilusa bi geruza granularren artean dago. Hilusaren goi eta behe alderdietan geruza granularreko zelula-nukleoak (Nk) argi ikus daitezke. Neurri-marra: 10µm.



2. **Irudia.** Diaminobenzidina eta urre markaketa bikoitza mGlu2 eta mGlu3, 2. taldeko glutamatoaren errezeptore metabotropiko eta CB1 errezeptore endokannabinoideetarako sagu baten hilusaren mozte baten. Gezi urdina: DAB-a mGlu2/3 errezeptorearen markatzean. Gezi gorria: nanogold urre partikulak CB1 errezeptorearen markatzean. Puntu batzuetan (asteriskoak) bi markaketak kontaktuan daude, axoi presinaptikoen ezaugarriak dituzten egituretan (besikula batzuk ikusten dira).

4. Ondorioak

Mikroskopio elektronikopean ikusitako materialean agertzen denez, badago erlazio topografikoa CB1 eta mGlu2/3 errezeptoreen artean, bi erregulazio mekanismoen arteko erlazio fisiologikoaren oinarria izan daitekeena.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Planteatzen diren hurrengo urratsak hurrengoak izango dira. Alde batetik, bereiztea bi errezeptore metabotropikoetatik zein den CB1errezeptore kannabinoidearekin erlazionatzen dena. Bestetik, erregulazioa, mekanismo postsinaptikoa edo gliagaitik bideratutakoa den bereiztea.

6. Erreferentziak

- Altinbilek B eta Manahan-Vaughan D. (2009) A specific role for group II metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term depression and spatial memory. *Neuroscience*, 158, 149-158.
- Amaral DG (1978) A Golgi study of the cell types in the hilar region of the hippocampus of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 182, 851-914.
- Ben-Ari Y. (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3,728-739.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T eta 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.
- Neki A, Ohishi H, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S eta Mizuno N (1996) Pre- and postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the rat brain: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci. Lett.*, 202, 197-200.
- Petralia RS, Wang Y-X, Niedzielski AS eta Wenthold RJ (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience*, 71, 949-976.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S eta Mizuno N. (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 17, 7503-7522.
- Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N eta Shigemoto R (2001) Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: Differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience*, 106, 481-503.
- Tsou K, Mackie K, Sañudo-Peña MC eta Walker JM (1999) Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*, 93, 969-975.
- Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M eta Watanabe M (2011) Molecular and morphological configuration for 2-Arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 31,7700-7714.
- Van Groen T, Kadish I eta Wyss JM (2002) Species differences in the projections from the entorhinal cortex to the hippocampus. *Brain Res. Bull.*, 57,553-556.
- Zhang LN, Hao L, Wang HY, Su HN, Sun YJ, Yang XY, Che B, Xue J eta Gao ZB. (2015) Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 24,161-165.

7. Eskerrak eta oharrak

Egileek eskerrak eman nahi dizkiete J Egañari, bere laguntza teknigoengaitik, N Puente doktoreari, arazo teknikoak gainditzeko bere laguntzagatik eta A Gutiérrez doktoreari bere GFAP eta CB1-aren inguruko lanak ikerketa honen abiapuntua izan delako.

Lan hau “*Relación topográfica entre las localización subcelular de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo 2 (mGlu2/3) y del receptor cannabinoide CB1 en la región del hilus del giro dentado del ratón*” izeneko tesi proiektuaren barnean garatu da Euskal Herriko Unibertsitatearen Neurozientzia Sailean eta Eusko Jaurlaritzako diru-laguntzaz (IT-764-13).

Melanomaren biomarkatzaile lipidikoak

Pérez-Valle Arantza¹, Garate Jone³, Fernández Roberto³, Penas Cristina¹, Lage Sergio¹, Guevara Laura², Herraiz Ainara⁴, Astigarraga Egoitz⁴, Barreda-Gómez Gabriel⁴, Fernández Jose Andrés³, Boyano María Dolores¹, Ochoa Begoña², Asumendi Aintzane¹.

¹Zelulen Biologia eta Histologia saila, ²Fisiologia saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, ³Kimika Fisikoa saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, ⁴IMG Pharma Biotech, Derio

Arantza.perezv@ehu.eus

Laburpena

Lipidoak molekula oso heterogeneoak dira, eta hortaz, horien funtzioak anitzak dira. Izan ere, besteak beste, zelulen biziraupenean, hazkuntzan, euren arteko elkarrekintzetan eta heriotzean ezinbesteko zeregina dute. Funtzio horiek guztiek lotura zuzena dute zelulen gaiztotzearekin; hain zuzen ere, eraldaketa, progresio eta metastasiarekin. Azken urteotan, minbiziaren markatzaile genetikoak, epigenetikoak eta proteikoak ikerkuntzan aurrera pausuak eman diren arren, asko dago aztertzeke oraindik gaixotasun honen lipidomikari buruz. Horregatik, lan honen helburua melanomaren diagnostikoan, iragarpenean eta terapiaren hautaketan lagunduko duten biomarkatzaile lipidikoak aurkitzea da.

Hitz gakoak: minbizia, melanoma, biomarkatzaile, lipidomika

Abstract

Since lipids are very heterogeneous molecules, they perform very distinct functions. For instance, they play a critical role in cell survival, proliferation, cell-interactions and death. All these processes are directly linked to the malignification of the cells, concretely to the transformation, progression and metastasis. Despite the great progression made lately in the research of new genetic, epigenetic and proteomic biomarkers for cancer, there is still a lot to know about the lipidomics of this illness. Therefore, the aim of this study is to find new lipidomic biomarkers which will help in the diagnosis, prognosis and therapy election in melanoma.

Keywords: cancer, melanoma, biomarker, lipidomics

1. Sarrera eta motibazioa

Minbizia, ehun baten zelula normalen hazkuntza anomaloaren ondorioz sortzen da. Zelula hauek kontrol gabe hazten dira, eta sortzen duten masari tumorea deritzo. Gaur egun, minbizia mundu osoan ematen diren heriotzen erdiaren erantzule da. Gaixotasunaren estadio aurreratuetan beste ehun eta organo ezberdin batzuetara ere heda daiteke, azkeneko horien egiturari eta funtzioari eraginez; horri, metastasia deritzo eta minbiziak sortzen dituen heriotzen %90aren erantzule da.

Melanoma, konkretuki, azalean dauden melanozitoen gaiztotzearen ondorioz sortzen da. Izan ere, 200.000 bat kasu berri diagnostikatzen dira urtero mundu mailan. Minbizi kasu guztien artean %1,5a melanoma da¹, eta larruazaleko minbizien %4a den arren, horiek eragindako heriotzen %80aren erantzule da, 41.000 heriotza urtero mundu osoan², hain zuzen ere. Urteetan zehar melanoma kasuek gora egin duten arren, honen heriotza tasa ez da proportzionalki hazi. Biziraupenaren areagotzea tratamendu antitumoral eraginkorragoen agerpenari eta batez ere, diagnostiko goiztiarrari sor zaizkio (Karagiannis et al., 2015). Arrazoi horregatik,

¹<https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/MELANOMA/Paginas/incidencia.aspx>

²<https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/MELANOMA/Paginas/pronostico.aspx>

biomarkatzaile berrien identifikazioak eta farmako antitumoral berrien garapenak etorkizun zabala izango dute medikuntzaren arlo honetan.

Larruazalean *nevi*-ak ere ager daitezke. Horiek, melanozitoak era anormal batean haztean sortzen diren masak dira. Tumore onberatzat hartzen diren arren, batzuk lesio gaiztoaren aurrekoak izan daitezke; hau da, denborarekin melanoma bat gara dezakete. *Nevi*-ak nahiko ohikoak dira eta normalean ez dute garrantzi klinikorik, baina askotan kendu eta aztertzen dira, melanoma ez direla ziurtatzeko. Lesio gaiztoaren aurrekoak izan daitezkeenez, lan honetan aztertuko dira, melanozito normalak eta melanoma alderatuz.

Azkeneko urteotan biomarkatzaile berriak aurkitu diren arren, melanomaren heterogeneotasuna dela medio, ezin izan dira markatzaile guztiz fidagarriak aurkitu (Gogas et al., 2009). Biomarkatzaileen ikerketa batez ere minbiziaren genetika, epigenetika eta proteomikan oinarrituta burutu da, baina gutxi dakigu gaur egun gaixotasun honen lipidomikari buruz. Hala ere, azkenaldian lipidoek eta haien metabolismoak minbizian duten garrantzia nabarmendu da. Aipatu bezala, melanoma oso heterogeneoa da, beraz, tumorea osatzen duten osagai guztiak aztertzea da gaur egungo joera. Horregatik, lan honetan larruazal normaleko melanozitoen eta melanomaren lipidomika aztertu da, bi horien arteko ezberdintasunak ikertu nahian.

Lipidomika-analisen helburua zelula edo ehun jakin bateko lipido guztien identifikazioa eta kuantifikazioa da. Horrez gain, lipidoek beste lipidoekin, proteinekin zein gene-adierazpenarekin duten erlazioa aztertzen da (Perrotti et al., 2016). Arlo berri hau, 2003an sortu zen eta ordutik etengabe garatzen ari da, gero eta garrantzi handiagoa hartu duelarik ehun normal eta tumoralak sailkatu eta ezberdintzeko (Yang eta Han, 2016).

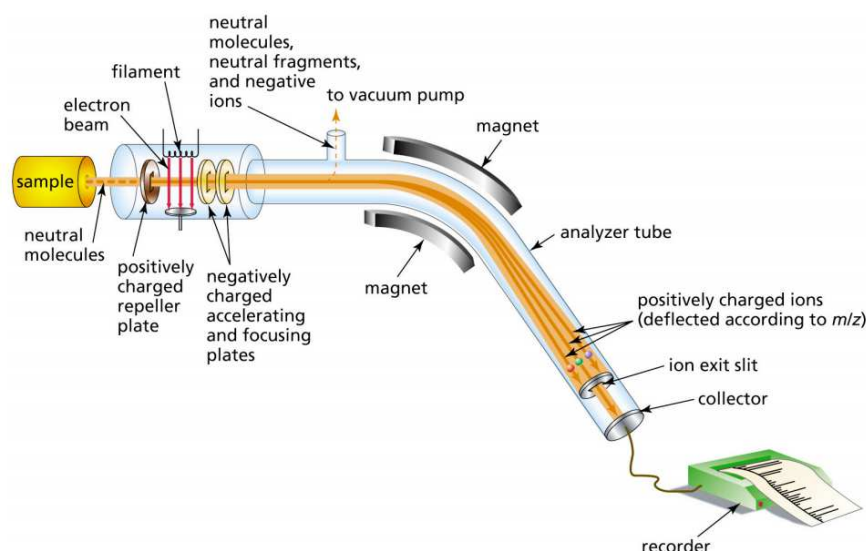
Zelulen lipidoma izugarri konplexua da, lipido mota bakoitzeko espezie ugari baitaude. Esaterako, ugaztun zelula bakar batean 1.500 lipido espezie baino gehiago egon daitezke. Horien artean minbiziarekin lotura duten ezagunenak gantz azidoak, glizerofosfolipidoak, glizerolipidoak, prenolak, sakarolipidoak, esfingolipidoak eta esterolak dira (Perrotti et al., 2016).

Lipidoek, ezinbesteko eginkizunak betetzen dituzte zeluletan. Orokorrean, zelulen mintzetako nahitaezko osagaiak dira eta babes funtzioa burutzen dute, energia kimikoa gorde, zelulen seinaleztapena ahalbidetu, eta ehunetan zelulen arteko elkarrekintzetan parte hartu, besteak beste. Funtzio horiek guztiak kartzinogenesi prozesuarekin estuki lotuta daude, zelulen eraldaketa, progresio eta metastasiarekin, hain zuzen ere. Fosfolipidoek, esaterako, seinaleen transdukzioa, post-transdukzio modifikazioak, homeostasia, zelula-atxikidura, migrazioa, apoptosia, neurotransmisioa, besikulen garraioa eta energia-biltegiak arautzen dituzte (Perrotti et al., 2016).

Lan honen atal bat egiteko, erabili diren zeluletatik zelula-mintzak isolatu dira mikroarraiak egiteko. Horietan, mintzak immobilizatu eta inprimatu dira teknologia berri batez baliatuta. Horrela, mintzen ingurumen lipidikoa mantentzen da, horien egitura eta funtzionalitatea mantenduz. Horrez gain, mikroarrai formatuaren abantailak kontserbatzen dira, hau da, ehunka lagin immobilizatuta porta baten tamainako azalera batean.

Aipaturiko analisiak burutzeko masa-espektrometria erabiltzen da; lipido-molekula bakoitzari masa bat dagokionez, lagin batean lipido ezberdinak identifikatu daitezke. Analisisien lehenengo urratsean laginetako molekulak apurtzen dira ionizazio metodo ezberdinak erabiliz (*ESI-Electrospray ionization*; *MALDI-Matrix-assisted laser desorption/ionization*, besteak beste). Sortzen diren ioiak positiboak edo negatiboak izango dira, molekulen egituraren arabera; beraz, lagin baten molekula guztiak aztertzeko, lagin bakoitzean bi analisi egin behar dira, bat ioi positiboak aztertzeko, eta bestea ioi negatiboak aztertzeko. Jarraian, ioiak laginketa konotik pasatzen dira eta analizatzailerara helduko dira. Bertan, bakoitzaren intentsitatea eta masa molekularra aztertuko da, euren karga/masa erlazioan (m/z) oinarrituz. Azkenik, emaitzak masa espektroetan ematen dira. Hauek, grafika moduan islatzen dira, non piko bakoitza masa jakin bati dagokion, eta piko bakoitzaren tamainak masa jakin horren kantitate erlatiboa adierazten du.

1. Irudia. Masa-espektrometro baten eskema.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Esan bezala, lipidomika 2003an ezarri zen, beraz zientziaren arlo berri bat da. Duela gutxi arte, biomarkatzaile genetiko zein proteikoetan oinarritu da minbiziaren ikerketa. Aldiz, azkeneko urteotan lipidoek minbiziaren sorreran eta hedakuntzan duten garrantzia frogatu da. Esaterako, lipidoek minbiziarekin duten lotura ikertuz, 2000. urtetik 2012. urtera 13 artikulua baino ez ziren argitaratu; oster, 2012tik gaur egun arte 91 publikatu dira. Melanomaren kasuan konkretuki, artikulua bakarra aurkitu da, beraz, lan honen garrantzia premiazkoa da.

Aipaturikoan oinarrituz, lan honetan planteaturiko helburua hurrengoa izan da:

- Analisi lipidomiko ezberdinak erabiliz, melanomaren biomarkatzaile lipidikoak aurkitzea, ehun normal eta minbizidunak ezberdintzeko gai direnak. Hori, zelula-lerroetan zein biopsietan aztertu da, masa-espektrometria bidezko analisi ezberdinak erabiliz.

3. Ikerketaren muina

Ikerketa hau, zelula-lerroetan eta biopsietan burutu da. Horretarako, zelula-lerro ezberdinak hazi egin dira: pigmentazio ezberdineko 3 melanozito-lerro, nevus biopsietatik isolatutako 9 melanozito-lerro, eta 15 melanoma-lerro. Azken horien artean, tumore primarioetatik isolatutakoak eta metastasi batetik isolatutakoak ezberdintzen dira (1. Taula).

1. Taula. Lan honetan erabilitako lerro zelularren jatorria eta izena.

Melanozitoak	Nevi	Melanoma Primarioak	Melanoma Metastasikoak
HEMn-LP	N1	Mel-Ho	Colo-800
HEMn-MP	N2	A375	RPMI-7951
HEMn-DP	N3	G-361	Hs294t
	N4	Sk-Mel-28	A2058
	N5	Sk-Mel-31	Sk-Mel-3
	N6	ME4405	WM-266-4
	N7		Sk-Mel-2
	N8		HT144
	N9		VMM1

Nevi biopsietatik melanozitoak isolatzeko, digestio mekaniko eta entzimatikoa erabili dira, estroma desagerrarazi eta zelulak soilik lortzeko asmoz. Horien artean, melanozitoak daude, baina baita keratinozitoak eta fibroblastoak ere. Horregatik, kultiboan jarri ondoren purifikatuz joan dira, melanozitoen kultibo puruak izan arte.

Zelula-lerro horiek guztiak kultibatu eta bertatik lipidoak eta mintzak isolatu dira, bi lipidomika analisi ezberdin burutzeko. Alde batetik, lehenengo analisisian, lipidoak isolatzeko Bligh & Dyer isolamendu metodoa erabili da. Horretan kloroformoa, metanola eta ur destilatua erabiltzen dira eta estraktuak zentrifugazio ezberdinak eginez lortzen dira. Jarraian, lipidoma oso konplexua denez eta konposatu ezberdinek masa oso berdintsuak izan dezaketenez, likido kromatografia ultra-azkarra (UHPLC) erabiliz lipido mota ezberdinak bereizten dira. Ondoren, lipidoak QTOF masa-espektrometroan sartzen dira, ionizazio-iturrian sartuz molekulek karga positiboa edo negatiboa hartzen dutelarik. Azkenik, ioi bakoitzari masa bat esleitzen zaio, eta bakoitzaren intentsitatea neurtzen da, lagin horretan duten kontzentrazio erlatiboa jakiteko (Guevara, 2016).

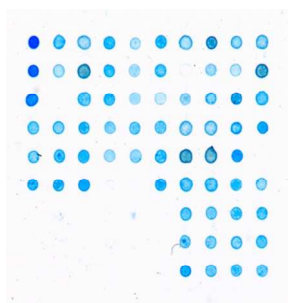
Beste alde batetik, MALDI bidezko analisisa egiteko, lehenik eta behin lagin bakoitzetik zelula-mintzak isolatu dira, sakarosarekin zelulak apurtuz eta zentrifugazioen bitartez mintzak isolatuz. Horiek, porta batean jarri dira mikroarrai bat osatuz. Zelula-lerro bakoitzeko 3 erreplika jarri dira, beraz, mikroarrai osoan 100 bat lagin aztertu dira momentu berean. Analisi lipidomikoa egiteko, puntu guztien gainetik matrize organiko bat jarri da, horrek molekulen ionizazioa ahalbidetzen baitu. Ioi positiboak lortzeko MBT-a (2-merkaptobenzotiazol) erabili da, eta aldiz, ioi negatiboak lortzeko DAN-a (1,5-diaminonaftaleno). Hau, MALDI masa-espektrometroan sartu, eta puntu bakoitzean dauden lipidoak aztertu dira. Beste teknikan ez bezala, ez da aurretik lipidoen banatze bat egiten, beraz, baliteke masa jakin baterako lipido mota bat baino gehiago egotea. Aldiz, teknika honen bitartez, lipido bakoitzaren antolamendu espaziala jakin dezakegu. Ondorioz, mikroarrai hauetan mintzak ditugunez, lipido bakoitza mintzetan nola antolatzen den aztertu daiteke.

2. Irudia. Zelula-mintzez egindako mikroarraien eskema eta analisi lipidomikoa. A- Zelula-lerro ezberdinen kokapena arraietan, puntu bakoitza lagin bat da. Horia: inprimazioaren kontrola. Laranja: Melanozitoak. Marroia: *Nevi*-ak. Urdina: Melanoma primarioak. Berdea: Melanoma metastasikoak. Zuria: lipido-estraktuak. B- Arraien tindaketa Bradford metodoarekin (proteinak tindatzeko). D- Arraietan, lipido jakin baten agerpena: gorria- presentzia urria; morea- presentzia ugaria. 1. irudia ionizazio positiboan, 2. Ionizazio negatiboan eginda.

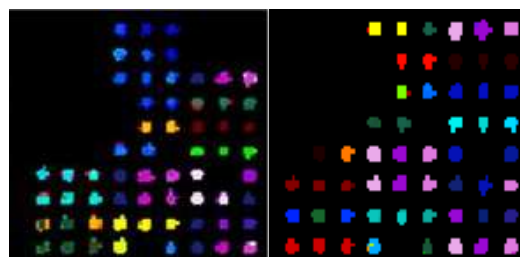
A

Kontrola	Kontrola	HEMn-MP	SK-MEL-3	WM-266-4	SK-MEL-31	NEVUS 1	NEVUS 4	NEVUS 7	HEMn-MP
Kontrola	Kontrola	HEMn-DP	SK-MEL-3	WM-266-4	SK-MEL-31	NEVUS 2	NEVUS 5	NEVUS 8	HEMn-DP
Kontrola		HEMn-LP	SK-MEL-3	WM-266-4	SK-MEL-31	NEVUS 3	NEVUS 6	NEVUS 9	HEMn-LP
A375	Hs294t	RPMI 7951	A2058	SK-MEL-28	ME4405	HEMn-MP	HEMn-MP	VMM1	SK-MEL-2
A375	Hs294t	RPMI 7951	A2058	SK-MEL-28	ME4405	HEMn-DP	HEMn-DP	VMM1	SK-MEL-2
A375	Hs294t	RPMI 7951	A2058	SK-MEL-28	ME4405	HEMn-LP	HEMn-LP	VMM1	SK-MEL-2
Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	MEL-HO	G361	COLO-800	HT144
Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	MEL-HO	G361	COLO-800	HT144
Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	MEL-HO	G361	COLO-800	HT144

B



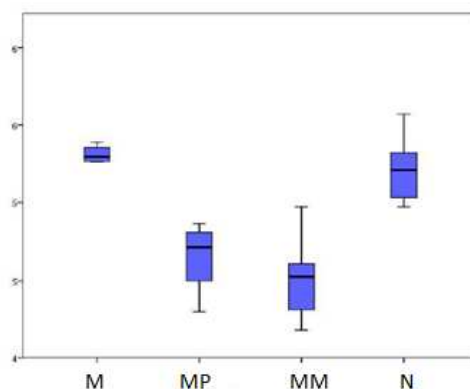
D



Aipaturiko bi analisi-teknikak osagarriak direnez, bien emaitzak batera aztertu dira lipidoen identifikazio zehatzago bat egiteko. Horrela, MALDI analisiaren bitartez ezin bada jakin masa konkritu bat zer molekulari dagokion, UHPLC-QTOF-etik lortutako emaitzetan ikusten da. Beti ere, lipido berdinak bi analisisen emaitzetan agertzen badira, emaitza horrek pisu handiagoa izango du.

Lan honetan lortutako emaitzak oso itxaropentsuak dira. Lagin bakoitzean 500 lipido inguru aurkitu dira. Horien artean, badaude beraien espresioa esanguratsuki ezberdina dutenak ehun osasuntsuan eta minbizian (3. Irudia). Gainera, aipatu beharra dago, emaitzak bi tekniketan errepikatzen direla; beraz, esan dezakegu metodologia hau baliagarria dela melanoman markatzaile lipidomikoak aurkitzeko.

3. Irudia. Lipido jakin baten espresioa aztertutako lau zelula mota ezberdinetan. M – Melanozitoak. MP- Melanoma primarioak. MM- Melanoma metastasikoak. N- *Nevi*.



4. Ondorioak

Erabilitako metodologia biomarkatzaile lipidomikoak aurkitzeko egokia dela frogatu da. Gainera, lan honek aurrerapen esanguratsuak eragingo ditu gaixotasun honen diagnostiko goiztiarra hobetzeko. Beti ere, hori da minbiziaren garapena ekiditeko modurik eraginkorrena. Gainera, melanomaren iragarpenean eta terapiaren hautaketan ere lagunduko dute. Gaur egun, terapia desberdinak erabil daitezke melanoma tratatzeko, eta gaixo batetik bestera tumoreak hain dira desberdinak, bakoitzarentzat terapia egokiena zein den erabakitzen lagunduko duten biomarkatzaileak aurkitzea ezinbestekoa den.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lortutako emaitzen garrantzia ikusita, minbizidun ehunetan espresioa esanguratsuki ezberdina duten lipidoen funtzioa eta garrantzia aztertuko da aurrerantzean. Horien artean klinikoki interesgarriak izan daitezkeenak erabakiko da. Gainera, azkeneko horiek biomarkatzaile potentzial modura patentatzea aztertuko da.

Bestalde, lana borobiltzeko, MALDI irudi-masa-espektrometria erabiliko da pazienteetatik lortutako *nevus*- eta melanoma-biopsietatik egindako mozketetan lipido ezberdinen kokapena aztertzeko. Hori histologia-irudiekin alderatuko da tumorearen ikuspegi zabalago bat izateko. Horrela, espresioa esanguratsuki ezberdina duten lipidoen garrantzia eta funtzioa finkatuko da biopsietan duten kokapena jakinda.

Bukatzeko, zelula-mintzez osatutako mikrotxipak erabiliz, plataforma bioteknologiko berri bat garatu nahi da, biomarkatzaile lipidikoak aztertu, identifikatu eta kuantifikatu ahal izango dituenak.

6. Erreferentziak

- Gogas, H. et al. (2009): Biomarkers in Melanoma, *Annals of oncology*, 20 (Supplement 6), vi8-vi13.
- Guevara, L. (2016): Lipidómica en oncología: Aplicación al diagnóstico y pronóstico del melanoma maligno cutáneo, *Master amaierako lana*, Medikuntza fakultatea – UPV/EHU.
- Karagiannis, P. et al. (2015): Evaluating biomarkers in melanoma, *Frontiers in oncology*, 4, Article 383.
- Perrotti, F. et al. (2016): Advances in Lipidomics for Cancer Biomarkers Discovery, *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (12).
- Yang, K. eta Han, X. (2016): Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences, *Trends in Biochemical Sciences*, 41, 954-969.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Espainiako Ekonomia, Industria eta Lehiakortasuneko Ministerioak finantzatutako ONCOFINDER proiektuaren barruan egin da.

Zelulen banan-banako atxikipena lortzeko “Microcontact Printing” teknikaren garapena.

Garcia-Hernando Maite.¹, Etxebarria-Elezgarai Jaione.², Benito-Lopez Fernando.^{1,3}, Basabe-Desmonts Lourdes.^{2,4}

¹AMMa-LOAC Ikerkuntza Taldea, Microfluidics Cluster UPV/EHU, Kimika Analitika Departamentua, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz.

²BIOMICS Microfluidics Ikerkuntza Taldea, Microfluidics Cluster UPV/EHU, Lascaray Ikergunea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz.

³Sentsoreen Ikerkuntzarako Zentro Nazionala, Dublin Hiriko Unibertsitatea, Dublin, Irlanda.

⁴IKERBASQUE, Zientziarako Euskal Fundazioa, Bilbo.

mgar93@gmail.com

Laburpena

Lan honetan, kuantifikazio digitalaren bidez zelula-proteina interakzioak neurtzeko teknika zehatza eta azkarra azaltzen da. Horretarako, “Microcontact Printing (μ CP)” deritzon “patterning” edo egituraketa teknikaz baliatuz, zelulen banan-banako atxikipena indultzeko proteina-patroi optimizatua sortu da. Patroia atxikipen gune independenteak diren proteina irlez osatuta dago, sare bat osatuz, eta zelula-proteina interakzioak okupazio portzentai eran kuantitatiboki adieraziz. Lan honetan lortutako jakintzak terapia zelularretan eta medikuntza pertsonalizatuan eragina izatea du helburu.

Hitz gakoak: zelula-proteina, patterning, Microcontact Printing, banako zelula, okupazio portzentai.

Abstract

In this paper, we report an accurate and rapid method to make digital quantifications of cell-protein interactions. We use a patterning technique called “Microcontact Printing (μ CP)” to form a protein pattern which creates an array optimised to promote single cell adhesion. Thanks to this array with independent adhesion sites, cell-protein interactions can be quantitatively measured as occupation percentage. The knowledge gained from this work aims to make an impact in cellular therapies and personalised medicine.

Keywords: cell-protein, patterning, Microcontact-Printing, single-cell, occupation percentage.

1. Sarrera eta motibazioa

Zelulen *in vivo* hazkuntza hauen ingurune hainbat faktoreengatik mugatuta dago, mikro-ingurune deritzonagatik. Mikro-ingurune horretan daude inguruko zelulek igorritako seinale biokimiko, biomekaniko eta bioelektrikoak, matrize extrazelularra (MEZ), medioko faktore solugarriak, topografia edo MEZ-eko propietate fisikoak eta ingurune fluidikoa. Aurreko faktore guzti horiek zelularen portaera modula dezakete, honen patu finalean eraginez. Matrize extrazelularra zelulen inguruan eta zelula desberdinen artean dagoen espazioa da, gehienbat proteinez eta substantzia solugarriez osatuta dagoena. Bertan zelulentzako elikagaiak egoteaz aparte, hauen jardura modulatu duten seinale biokimikoak ere badaude, seinale hauen adibide MEZ-eko proteinen eta zelulen arteko interakzioak izanik. Matrize extrazelularreko proteinetarikoa bat fibronektina da, zelula mota guztietan dauden errezeptore batzuekin loturak sortzen dituen, eta honetan zelulen portaera erregulatzeko seinaleak igorritzen.

Dena den, gaur egun erabiltzen diren teknika konbentzionalak ez dira gai zelulen mikro-ingurunea zehazki kontrolatzeko, ezta zelulek proteinekiko duten afinitatea kuantitatiboki neurtzeko. Horri aurre egiteko, azken bi hamarkadetan zehar, mikroteknologiaren garapenak zelulen mikro-ingurune hainbat faktoreen kontrol zehatzagoa lortzen lagundu du, ondorioz, zelula hazkuntza hobe eta konplexuagoetara helduz (Lautenschläger eta Piel, 2013; Halldorsson *et al.* 2015). Mikroteknologia horien barne dago “protein micropatterning” deritzon teknika multzoa. “Patterning” edo egituraketa zelula bizidunek substratu edo gainazal batean duten

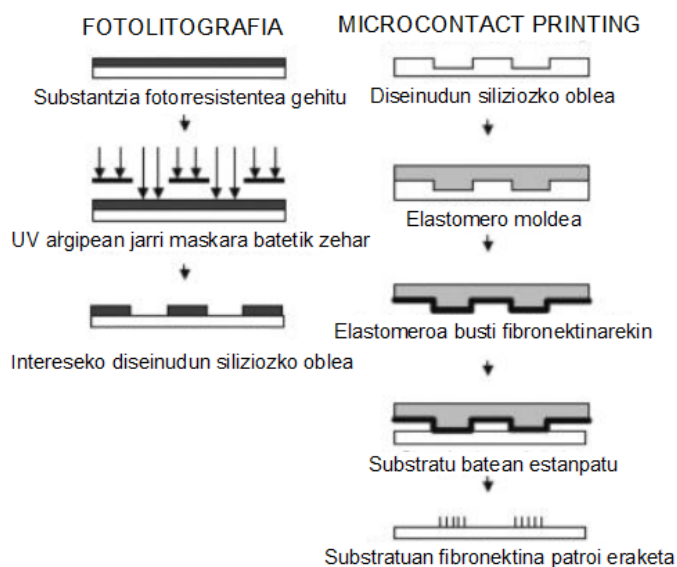
kokapena eta egituraketa kontrolatzeko tresna baliogarria da, eta zelulen biologian, farmakologia pertsonalizatuan eta ehunen injeniaritzan oso erabilia izan da 1990 -eko hamarkadan agertu zenetik. Proteina mikro-patroiei esker, zelulek gainazal batean sortzen dituzten egiturak kontrola daitezke, eta ondorioz, hauen kokapena tamaina, forma, migrazioa (Jiang *et al.* 2005), bideragarritasuna (Chen *et al.* 1997), eta baita proliferazio (Nelson eta Chen 2002) eta diferentziazio (McBeath *et al.* 2004) prozesuak ere.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honetan proteina-patroiak gauzatzeko erabiltzen den teknika litografia leunean oinarritutako “Microcontact Printing (μ CP)” deritzona da. Litografia patroiei ezberdinen erreplikak egiteko fabrikazio teknika bat da, eta zigilu gisa elastomerozko molde bigunak erabiltzen direnean, litografia leuna deitzen zaio. Elastomerozko moldeak beste molde zurrun batetik lortzen denez, lehendabiziko pausua proteina-patroiaren diseinua ekoiztea da, fotolitografia fabrikazio teknikaren bidez, siliziozko substratu zurrun baten gainean. Ondoren, molde zurrunean proteiaren egitura elastomerozko zigilu bigunera transferitzen da, substratu edo gainazal batera molekula zehatzak kokapen espezifikoarekin transferitzeko (1. irudia). Teknika honetan onarrituta, substratutzat proteina ezberdinak erabiliz eta hauekin tamaina ezberdineko irudiez osatutako patroiak osatuz, plaketan atxikipen espezifikoa frogatu izan da (Basabe-Desmonts *et al.* 2010). Gainera, lan horretan plaketekiko afinitate handieneko substratua aztertzeaz gain, proteina irla bakoitzeko atxikitutako plaketa kantitatea kontrolatzeko gaitasuna ere erakutsi du teknikak. Ildo horretatik jarraituz, plaketak banan banan atxikitze teknika ere garatu izan da (Lopez-Alonso *et al.* 2013), banakako monitorizazioa gauzatzeko baliogarria izan dena bai diagnostiko bai tratamendurako. Hori dela eta, aurrekoan oinarrituta, lan honen helburua animalia zelulak banan-banan atxiki eta monitorizatzeko teknikaren garapena jorratzea da, hori burutzeko hurrengo azpihelburuak daudelarik:

- Zelulak banan-banan itsasteko proteina-patroi egokiaren diseinua
- Fotolitografia prozesuaren optimizazioa intereseko diseinua duen molde zurruna sintetizatzeko.
- Molde zurrunean egiturak elastomerozko molde bigunera transferitzea.
- Microcontact printing teknikaren optimizazioa fibronektinazko patroiak substratura transferitzeko.
- Zelulen banakako atxikipen frogak fibronektina patroien funtzionamendua balidatzeko.

1. Irudia. Litografia leunaren diagrama, Fotolitografia (ezkerra) eta “Microcontact Printing” (eskuina) teknikak adierazita.



3. Ikerketaren muina

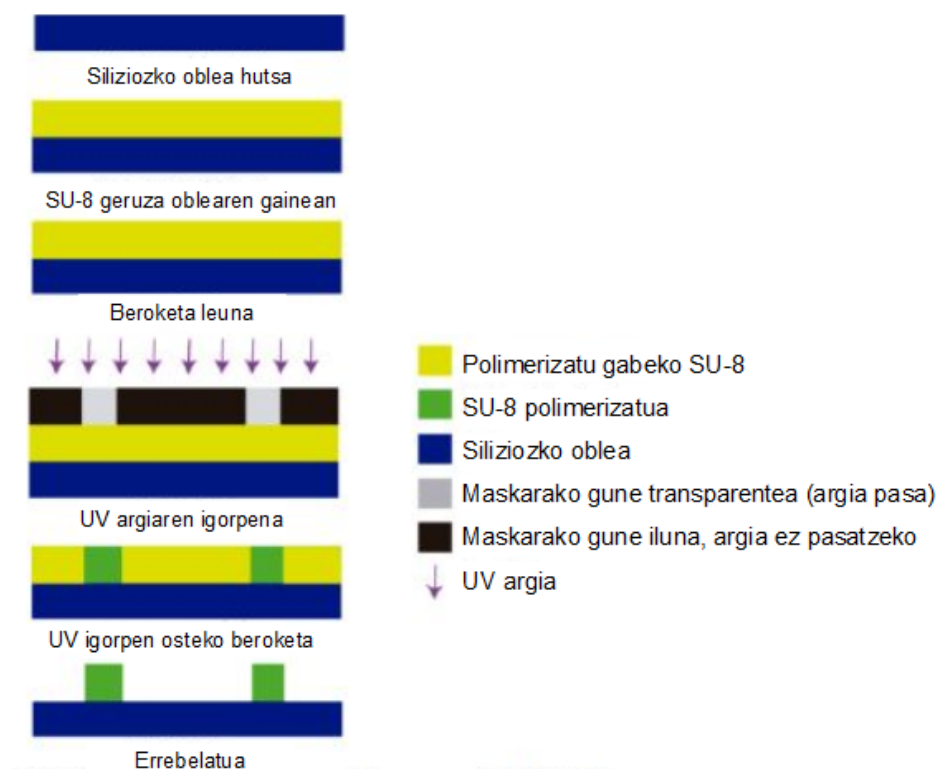
a) Zelulak banan-banan atxikitzeke patroiarene diseinua

Taldeak aurretik frogatu du 20 μm -ko diametroko fibronektina irlak direla zelulak bakarka atxikitzeke egokienak, irlen artean 50 μm -ko distantzia utziz elkarren artean interakzio fisikorik ez dagoela ziurtatzeko. Beraz halako irudiez osatutako patroia laukiak (1 cm x 1 cm) diseinatu dira.

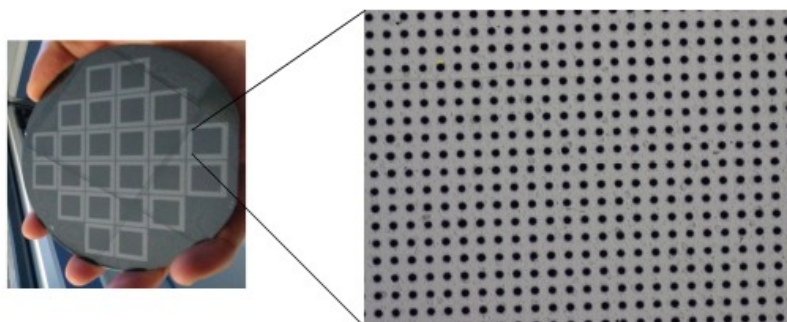
b) Litografia leuna

Goian aipaturiko patroiarene diseinua duen molde zurruna fabrikatu da lehenik, silizioko substratu baten gainean SU-8 deritzon erretxina fotosentikorrarekin egiturak irudikatuz. Hortarako, “lab-on-a-chip” gailuak fabrikatzeko ezaguna den fotolitografia (2. irudia) mikrofabrikazio teknika optimizatu da. Fotolitografia hurrengoan datza: siliziozko substratu hutsaren gainean SU-8 geruza gehitu (“spin coating”), beroketa leuna egin, argi utramorea (UV) irradiatu, irradiaketa ondorengo beroketa eta errebelatu. SU-8 geruza gehituta, lehenengo beroketa burutzeko silizio substratua 4 minutuz 65° C-tan eta 7 minutuz 95°C-tan eduki da. Ondoren, 160 mJ/cm² indarreko argipean jarri da 7 segunduz. Egiturak osatzeko maskara bat erabiltzen da, zeinak zonalde opaku eta gardenak dituen, argia ekidin edo pasatzen uzteko eta horrela intereseke patroiak lortzeko. Izan ere, argia pasatzen den SU-8 geruzaren guneetan aldaketa kimiko batzuk ematen dira, SU-8 polimerizazioa eraginez eta erretxina gogortuz. Hurrengo beroketa SU-8 polimerizazioa indartzeko egiten da, 1 minutu 65 °C-tan eta 5 minutu 95 °C. Azkenik, errebelatuan, disolbatzaile batean sartzen da SU-8 dun moldea eta gogortu ez diren guneak, hau da, argirik jaso ez dutenak, disolbatu egingo dira. 3. irudian ikusten den bezala, eta fotolitografiak emango duen emaitza argia jaso duten guneek osatutako erliebe-irudia izango da.

2. Irudia. Fotolitografia prozesuaren eskema, pauso guztiak irudikatuta.



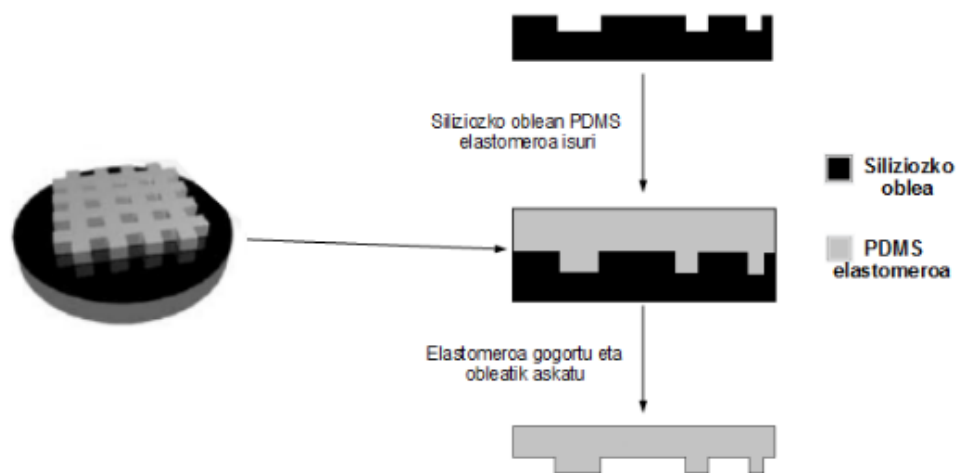
3. Irudia. Fotolitrografiaren emaitzak: fabrikatutako siliziozko oblearen itxura begibistaz (ezkerra) eta 20 μm -ko diametrodun irlez osatutako sarea erreflexio-mikroskopiaarekin begiratuta 5x handipenarekin (eskuina).



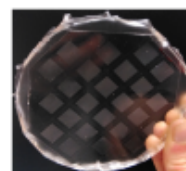
Intereseko egituradun molde zurruna polidimetilsiloxano (PDMS) elastomeroz osatutako zigilua egiteko erabili da. 4. irudian adierazten den bezala, lehenik eta behin moldearen gainean elastomero eta erreakzio haslearen arteko nahaste likidoa isurtzen da eta ondoren labean sartzen da tenperatura altuetan elastomeroaren solidifikazioa azkartu dadin. Era honetan, solidifikatzean, silikonazko zigilu bat lortzen da, siliziozko molde zurruneke egituren osagarriak izango dituen.

4. Irudia. PDMS zigiluaren fabrikazioa. PDMS zigiluarenfabrikazio prozesua (a) eta laborategian fabrikatutako zigiluaren argazkia (b).

a)

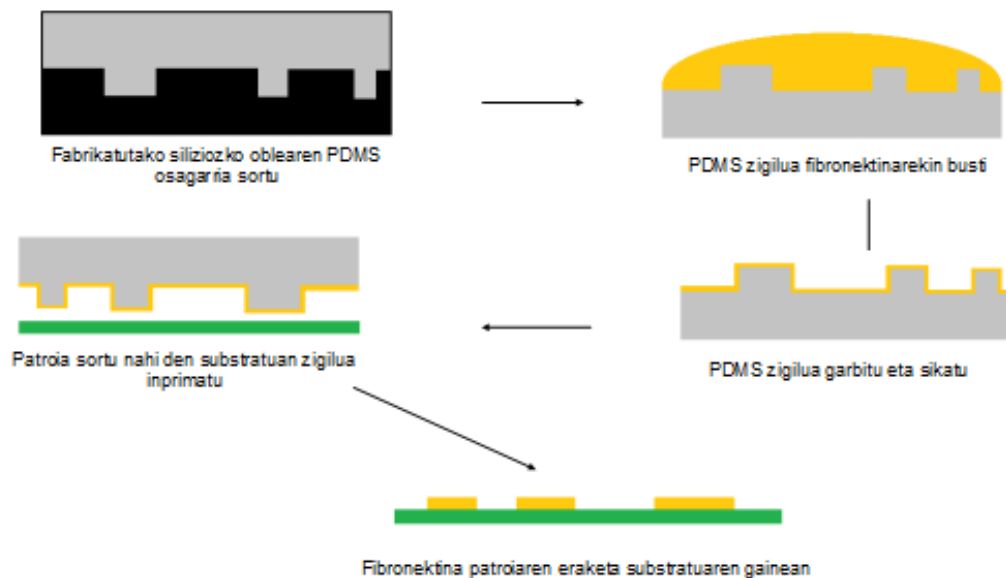


b)



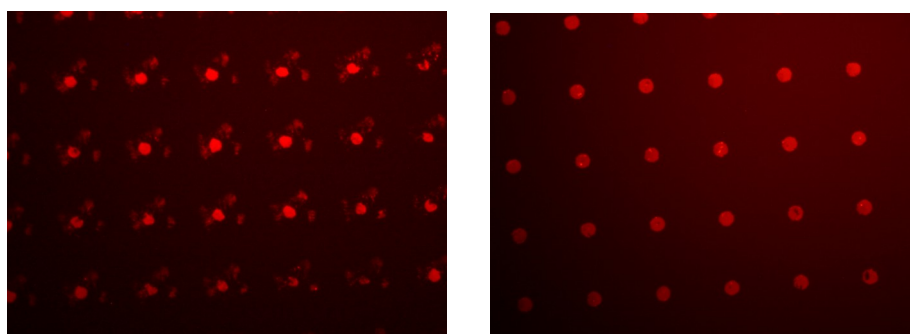
Proteina-patroiaren inprimaketa lortzeko azken pausoa “Microcontact Printing-a” da. Berau gauzatzeko, PDMS zigilua hartu, eta lehenik eta behin proteina disoluzioarekin inpregnatu behar da. Kasu honetan, soluzioak bi proteina ditu, fibronektina batetik, zelulen atxikipena indultzeko, eta BSA-TAMRA proteina fluoreszentea bestetik, kolorea emateko eta proteina patroia behatu ahal izateko. Behin zigiluak bere gainazalean proteinak xurgatzeko denbora izan duenean disoluzio hori kendu, zigilua sikatu eta substratuaren gainean imprimatu zen, 5. irudiko 4. pausoa ikusten den bezala. 30 minutu igaro eta gero, PDMS zigilua kendu, eta amaierako pausoa intereseko patroia, hau da, hasieran siliziozko oblean fabrikatutakoa lortzen da, substratu baten gainazalean proteinez osatuta.

5. Irudia. Microcontact Printing teknikaren eskema.



Pauso honen optimizazioan, PDMS sortzeko nahaste likidoan bi konposatuen arteko erlazioak printing-aren emaitzetan eragin zuzena daukela ikusi dugu (6. irudia). Erreakzio hasletzat diharduen konposatuaren kantitate handiagoekin, solidifikatze prozesuan zehar ematen diren lotura kimikoak direla eta, silikona zurrunagoa sortzen da. Konposatu haslearen kontzentrazio desberdinekin jokatzuz, egokiena PDMS zurrunagoa dela behatu dugu (6. irudia). Horren arrazoiak materialak jasaten duen tentsioa izan daiteke, hau da, μ CP teknikak eskulan handia esatzen du, eta PDMS zigiluek elastikotasun gehiago dutenean, manipulazio horretan tentsioa jasateko gaitasun txikiagoa dute, ondorioz, inprimatzerako orduan egiturek ez dute horrenbesteko egonkortasunik, patroieta zehaztasun falta emanez.

6. Irudia. Fluoreszentzia mikroskopioarekin behatutako proteina patroiak, BSA-TAMRA proteina da ikusgarri. Bi patroi ikus daitezke (20x handipena), PDMS sintesirako elastomero-erreakzio haslearen arteko erlazioa 10:1 izanik (ezkerra) eta PDMS sintesirako elastomero-erreakzio haslearen arteko erlazioa 5:1 izanik (eskuina).

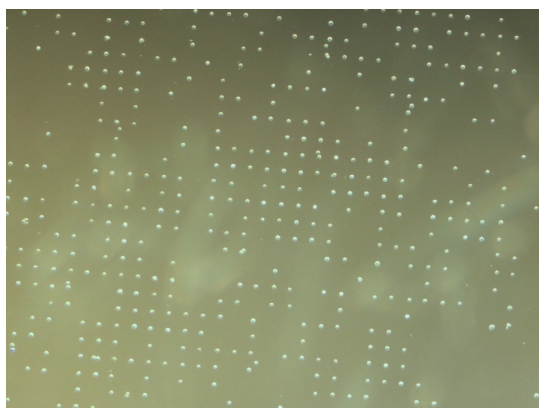


c) Zelulen hazkuntza proteina patroidun substratuetan

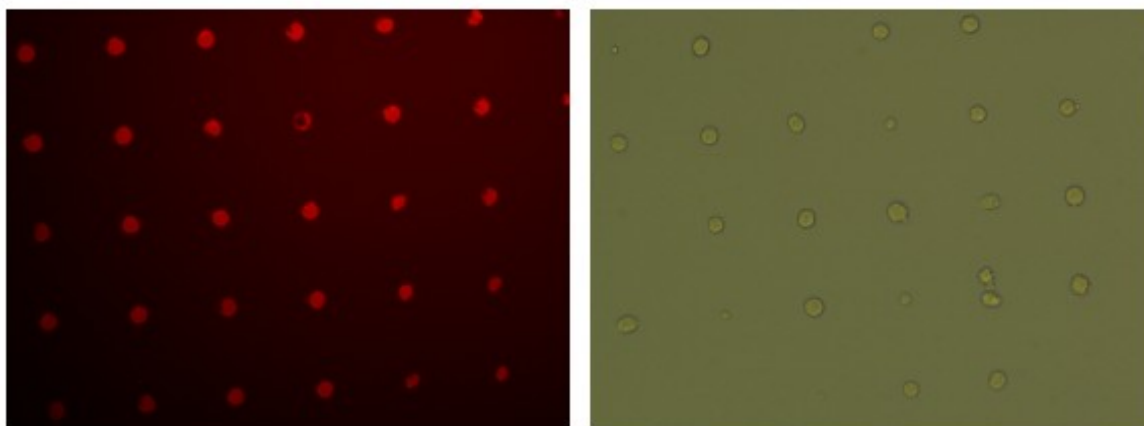
Azkenik, behin proteina-patroiak era egokian eratu direla ziurtatuta, zelulak erein dira horien gainean. Horretarako hazkuntzan dauden zelulaz beteriko flasketik gainazalean atxikita dauden zelulak askatu behar dira lehenik, tripsina entzima erabiliz, tripsinizazio deritzon prozesuan. Puntu honetan zelulak suspentsioan daudenez, hauen kontzentrazioa neurtu dugu zelula kontagailu batekin, ondoren 1 cm x 1 cm-ko proteina patroia bakoitzean 100.000 zelula ereiteko beharreko bolumena gehitzeko.

Behin zelulak ereinda, patroia guztian zehar itsatsi ahal izateko, bi noranzkotan mugitzen den dendunkarian jarri da zelulak ereinda zituen plaka, hauexek ondo heda daitezten. Inkubazio hau 37 °C-tan eta %5-eko CO₂ kontzentrazioan egin da, zelulen bideragarritasun egokia bermatzekotan. 90 minutuko inkubazio aldia pasa ondoren, plaka atera eta mikroskopio optikoan behatu da zelulen atxikipena (7. irudia).

7. Irudia. Mikroskopio optikoarekin ateratako argazkia (4x handipena). Ikusten den puntu bakoitza zelula bat da. Zelula bakarrez osatutako sarea ikusten da, diseinatutako patroia jarraiki.



8. Irudia. Zelulen atxikipen portzentaia kalkulatzeko, gune berebean fluoreszentzia mikroskopioarekin behatutako patroia (20x handipena) (ezkerra) eta mikroskopio optikoarekin behatutako zelulak (20x handipena) (eskuina) konparatzen dira.



Behaketa honetatik atxikipen portzentaia kalkulatu daiteke hurrengo formula aplikatuz:

$$\text{Okupazio portzentaia} = \frac{\text{zelula atxikita duten irla kopurua}}{\text{irla kopuru totala}} \times 100 = \frac{23}{30} \times 100 = \% 76,67$$

4. Ondorioak

Lan honetan zelulen banan-banako kokapena zehaztasunez kontrolatzeko diseinua eta teknika garatu da. 20 μm -ko diametroko fibronektina irlak inprimatuz eta hauen artean 50 μm -ko distantzia utziz, adhesio-gune independenteak sortu dira zelulak espezifikoki eta banan-banan kontrolatu ahal izateko.

Gainera, fibronektina proteina erabiliz, zelula mota honek proteina honekiko afinitate altua duela ikusi da, %76,67-ko atxikipena agertu baitute. Hortaz, fibronektinak MEZ-ean duen funtsezko papera agerian geratu da, hau da, *in vivo* zelulek fibronektinarekin loturak lotzeko duten joera baieztatu da, proteina honek seinalizazioan eta hortaz zelulen jarreran duen garrantzia baieztatuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Teknika hau oraindik oso berria dela kontuan harturik, ikerkuntza sakonagoa espero da ondorengo urteetan. Gainera, zelulen banako kontrolak zelulen biologia ezagutzeko aukera ematen duenez, orain arteko teknika konbentzionalek dituzten mugak gainditzeko aukera zabala eskaintzen du. Zelulen biologian garrantzi itzela dauka zelula eta proteina desberdinen arteko interakzioak ezagutzea, baina baita ehunen injeniaritzan ere, izan ere, arlo honek gaur egun duen erronkarik handiena da zelulen mikroingurunearen mimetizazioa. Mimetizazio horretara heltzeko, funtsezkoa da zelulen biologia eta hauen beharrianak ezagutzea, hazkuntzak optimizatzeko aukera egon dadin.

6. Erreferentziak

- Basabe-Desmonts L., Ramström S., Meade G., O'Neill S., Riaz A., Lee L.P., Ricco A.J. eta Kenny D. (2010). Single-step separation of platelets from whole blood coupled with digital quantification by interfacial platelet cytometry (iPC). *American Chemical Society Publications (Langmuir)*, 26 (18), 14700-14706.
- Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., eta Ingber D.E. (1997). Geometric control of cell life and death. *Science*, 276, 1425-1428.
- Halldorsson S., Lucumi E., Gómez-Sjöberg R. eta Fleming R.M.T. (2015). Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosensors & bioelectronics*, 63, 218-231, DOI 10.1016/j.bios.2014.07.029.
- Jiang X.Y., Bruzewicz D.A., Wong A.P., Piel M., eta Whitesides M. (2005). Directing Cell migration with asymmetric micropatterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 102, 975-978.
- Lautenschläger F. eta Piel M. (2013). Microfabricated devices for cell biology: all for one and one for all. *Current opinion in cell biology*, 25, 116, DOI 10.1016/j.ceb.2012.10.017.
- Lopez-Alonso A., Jose B., Somers M., Egan K., Foley D.P., Ricco A.J., Ramström S., Basabe-Desmonts L., eta Kenny D. (2013). Individual platelet adhesion assay: measuring platelet function and antiplatelet therapies in whole blood via digital quantification of cell adhesion. *Analytical Chemistry*, 85 (13), 6497-6504.
- McBeath R., Pirone D.M., Celeste M.N., Bhadriraju K eta Chen C.S. (2004). Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Developmental Cell*, 6, 483-495.
- Nelson C.M. eta Chen C.S. (2002) Cell-cell signaling by direct contact increases cell proliferation via a PI3K-dependent signal. *FEBS Letters*, 514, 238-242.

7. Eskerrak eta oharrak

Egileok gure esker ona adierazi nahiko genuke Eusko Jaurlaritzako Industria, berrikuntza, merkataritza eta turismo Sailari ELKARTEK 2015 deialdiko KK-2015/0000088 zenbakidun diru laguntzarekin ikerketa hau babesteagatik.

Bestalde, egileok Euskal Herriko Unibertsitateko Marian Martínez de Pancorbo katedruna eskertu nahiko genuke UPV/EHUko laborategi instalazioen erabilera gure eskura jartzeagati, baita DNA Bankuko (SGIker) Maite Álvarez Doktores, laguntza tekniko eta pertsonalarekin eta Europako finantziazioarekin (FEDER eta FSE) laguntzeagatik. Baita eskertu nahiko lukete “NANBIOSIS” ICTS-ak emandako asistentzia tekniko eta intelektuala, zehazki Bioinjeniaritza, Biomaterialak eta Nanomedikuntza (CIBER-BBN) elkarteko Farmako Formulazio taldeak (U10).

Maite Garcia-Hernandok “2016ko UPV/EHUn ikertzaile prestakuntzarako kontratatzeko diru laguntzen deialdia” eskertu nahiko luke PIF16/204 zenbakidun laguntzarekin ikerketa hau babesteagatik, baita Ainhoa Gonzalez Pujana doktoregaiari, laneko azken ataleko elulen atxikipen saiakuntzetan bere laguntzagatik.

Fernando Benito-Lopezek, Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioko Ramón y Cajal” programako onuraduna denak, “European Union’s Seventh Framework Programme (FP7) for Research, Technological Development and Demonstration, 604241” proiektua eskertu nahiko luke.

Endokannabinoideak eta zerebeloaren garapena

Buceta Ianire, Rico Irantzu, Egaña Jon, Gerrikagoitia Inmaculada, Grandes Pedro, Elezgarai Izaskun.

*Neurozientziak saila, Medikuntza eta Enfermeria Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea
E-48940 Leioa,*

Laburpena

Endokannabinoide-sistemak (EKS), helduan, neurotransmisoreen askatzea doitzeaz gain, garapeneko prozesuetan parte hartzen duela baieztatu dute azken urteotako ikerketek. Enbrioi eta baita animalia helduetan ere EKS zerebeloan dela jakina da. Karraskarien zerebeloaren garapena enbrioi aroan hasten bada ere, jaio ondorengo 3 asteetara arte ez da bukatzen. Horretaz baliatu gara EKSak garapeneko prozesuetan parte hartzen duen aztertzeo mikroskopio elektronikoaren bitartez. EKSko osagai desberdinek, helduarekin alderatuz, kokapen berezitua aurkezten dutela ikusi dugu; helduan eta garapenean duten funtzio desberdinaren adierazle. Bestalde, CB₁ kannabinoideen hartzailearen gabeziak izan dezakeen eragina ezagutu nahi izan genuen. Horretarako, funtzio aldetik desberdinak diren eta erasoan aurrean sentibiltasune desberdina erakusten duten zerebeloaren bi eskualdetan, ultraegiturari mailako zenbait parametro neurtu genituen aldaketa nabarmenak aurkituz.

Hitz gakoak: endokannabinoide sistema, zerebeloa, garapena, zuntz paraleloak, CB₁-KO, mikroskopio elektronikoa.

Abstract

The endocannabinoid system (ECS) in the adult modulates the neurotransmitter release but last investigations have confirmed that it also participates in developmental processes. This system is present in the cerebellum at embryonic state as well as in the adult. The development of the rodent's cerebellum starts at embryonic state and continues until the third week after birth. We have used this fact in order to analyze whether the ECS participates at these developmental processes by electron microscopy approach. Our results show the different components of the ECS present specific locations different to the adult indicative of the different functions that they exert in the development and in the adult. Apart from that, we also wondered the possible effects that could have had the lack of the CB₁ cannabinoid receptor at two cerebellar functional divisions which have a different sensitivity to be damaged. We carried out the analysis of different ultrastructural parameters at those divisions where we observed significant changes.

Keywords: endocannabinoid system, cerebellum, development, parallel fibres, CB₁-KO, electron microscopy.

1. Sarrera eta motibazioa

Fitokakannabinoideak landareek eta endokannabinoideak (eKB) animaliek baldintza fisiologikoetan ekoizten dituzten substantziak dira. 2-arakidonilglizerola (2-AG) eta anandamida (AEA) dira ugaztunetan agertzen diren eKB ezagunenak.

eKBek funtzio oso desberdinetan hartzen dutela parte ikusi da baina bere funtzio ezagunena nerbio-sisteman neurotransmisoreen askatzea doitzean datza. Horrez gain, azken aldian ikusi da, nerbio-sistemaren garapeneko prozesuetan parte hartze garrantzitsua izan dezakeela, hala nola, proliferazioan (Aguado et al., 2006), neurogenesian (Berghuis et al., 2007; de Salas-Quiroga et al., 2015), desberdintzapenean (Gaffuri et al., 2012), axoi-hazkuntzan eta gidan (Williams et al., 2003), migrazioan (Zhou et al., 2015) eta sinaptogenesian (Fernandez-Ruiz et al., 2000; Berghuis et al., 2005; Keimpema et al., 2011).

Endokannabinoide sistema (EKS), eKBek, kannabinoideen hartzaileek, eKBen sintesi eta degradazio entzimek eta endokannabinoideek erregulatutako zelula barneko seinaleztapenak osatzen dute (Fride, 2005; Chevalleyre et al., 2006). Beraien artean guk ikergai izan ditugunak 2-AGarekin erlazioa dutenak izan dira, bera baita garapen prozesuekin gehien erlazionatu den eKBa: DAGL- α eta MAGL bere sintesi eta degradazio entzimak dira.

Lan honetan, karraskarien zerebeloa izan dugu ikerketa eredu. EKSak funtzio motorretan hartzen du parte eta zerebeloa mugimenduen doikuntzaz eta ikasketa motorraz arduratzen den nerbio-

sistemako egitura den heinean, bere funtzioan EKSak jokatzeko duen papera, ezinbestekoa da. Zerebeloak duen berezitasunetarikoa bat da bere garapena enbrioi fasean hasi eta jaio osteko 3 asteetan bukatzen dela (Biran et al., 2012). Ildo honetatik, pikor zelulak zerebelo kortexeko neurona ugariak dira eta beraien morfogenesi osoa jaio ostean ematen da (De la Torre-Ubieta eta Azad Bonni, 2011). Enbrioi eta jaio osteko garapenean eta baita animalia helduetan ere EKS zerebeloan espresatzen dela jakina da. Helduan, EKSak ikasketa motorrean parte hartzen duela ezagutzen den arren, sistema honek zerebeloaren kortexeko jaio osteko garapenean jokatzeko duen papera eta kokapena ez ziren ezagutzen.

Guzti honez gain, kannabinoideen CB₁ hartzailea espresatzen ez duten genetikoki moldatutako saguetan (CB₁-KO) burututako ikerketek, zerebeloarekin erlazionatuta dagoen ikasketa motorrean urritasunak dituztela erakutsi dute (Patel eta Hillard, 2001; Kishimoto eta Kano, 2006). Harrigarria den arren, zerebeloaren menpe dagoen koordinazio motorra, ordea, ez da kaltetzen (Bilkei-Gorzo et al., 2005; Kishimoto eta Kano, 2006; Kishimoto et al., 2006) nahiz eta EKSak zerebeloak burutzen duen funtzio horretan parte hartzen duen. Hori argitzeko asmoz, animalia hauetan, ultraegitura mailako zenbait parametroren azterketa anatomiko sakona egin genuen, funtzio aldetik desberdinak diren eta erasoen aurrean sentsibilitate desberdina erakusten duten zerebeloaren bi eskualdetan.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aipatu den bezala, eKBek funtzio zeharo desberdinak bete ditzakete nerbio-sisteman, garapenean eta helduan. Helduan burutzen duen funtzioa ezagunagoa bada ere, garapenean jokatzeko duen papera, ezezagunagoa izanik, oso esanguratsua izan daiteke. Garapenarekin erlazionatuta, *in vivo* eta *in vitro* garatutako ikerketek, eKBen seinaleztapenak axoien ibilbidean funtsezko ekintza burutzen duela berretsi dute (Galve-Ropehr et al., 2009); era horretara, eKBak, CB₁ hartzailearen aktibazioaren ondorioz, axoiaren mutur mugikorraren, hots, axoi-konoaren morfologia, mugikortasuna eta norabidea modulatu dute, beraien berariazko ituetara heltzea ahalbidetuz (Gaffuri et al., 2012). Karraskarien zerebeloaren ezaugarri bat da, aldaketa morfologikoak jasaten dituela jaio osteko lehenengo 3 asteetan zehar, lehen aipatu bezala, eta ezaugarri horrek zerebeloaren eredu bikaina bilakatzen du neuronen garapenaren ikerketarako, askoz arazo gehiago ematen dituen enbrioi aroko azterketak saihestuz. Zentzu honetan, gaur egunera arte zerebeloan egin diren azterketak ez dira jaio osteko garai goiztiar hauetan burutu. Zerebelo helduan neurotransmisioa modulatu duela eta hartzaileen mezulariak enbrioi aroan aurkitu dituztela (Berrendero et al., 1998; Buckley et al., 1998) kontutan izanik, pentsatzekoa zen, jaio osteko garapen goiztiarrean ere espresatuko zirela.

Aztergai izan ditugun pikor zelulen garapenari dagokionez, enbrioi garaian sortzen dira zelula hauen aitzindariak diren zelulak. Aitzindari hauetatik, pikor zelulak baino ez dira sortzen (neurogenesia). Sortu berri diren neurona hauek, berain kopurua handiagotzen dute, proliferazioa deritzon prozesuaren bitartez. Neurona mota bakoitza berariazko morfologia hartzeraren daraman prozesuari, desberdintzapena deritzo. Neuronen desberdintzapenaren lehen urratsa neuritogenesia da, hau da, neuronek, hedaturak garatuko dituzte aurkako polo bietan, zeintzuk axoi batetan eta zenbait dendritetan bilakatuko diren. Polarizazioa amaitzean, hedaturak, kasu honetan pikor zelulen axoi-prozesuak hazte-prozesuan sartuko dira. Aldi berean, pikor zelulek bi prozesu horizontalekiko elkartzuta den hirugarren prozesu bat hedatzen dute eta somari jarraituz behin-betiko lekura migratuko dute. Paraleloki, prozesu horizontal bien fusioa ematen da, beraien ezaugarria den “T” forma duten pikor zelulen axoiak, zuntz paraleloak (ZP) sortuz eta bertan, kontaktu sinaptikoak ezarriko dituzte Purkinje zelulen arantza dendritikoekin geruza molekularrean (GM) (De la Torre-Ubieta eta Azad Bonni, 2011). Purkinje zelulak zerebeloaren ardatza dira eta beraiek integratzen dute zerebelora heltzen den informazio guztia.

Helduaren eta heltzen dagoen zerebeloaren betekizunak desberdinak izanik, itxaron genezakeen EKSaren osagaiek ultraegitura mailako aldaketak izatea beraien kokapenean. Horretan oinarrituta planteatu genuen gure lehen helburua:

- 1-. CB₁ kannabinoide hartzailea eta 2-AG endokannabinoidea sintetizatu eta degradatzen duten entzimek, DAGL- α eta MAGL hurrenez hurren, kokapenaren ultraegitura mailako azterketa, jaio osteko garapeneko prozesuak jasaten dauden zerebelo kortexeko pikor zeluletan.

EKS zerebeloaren garapenean guztiz garrantzitsua izan daitekeela kontutan izanda, CB₁ kannabinoideen hartzailearen gabeziak izan dezakeen eragina ezagutu nahi izan genuen CB₁ hartzailea espresatzen ez duten genetikoki moldatutako saguetan (CB₁-KO). Hori aztertze asmoz ezarri genuen 2. helburua honakoa izan zen:

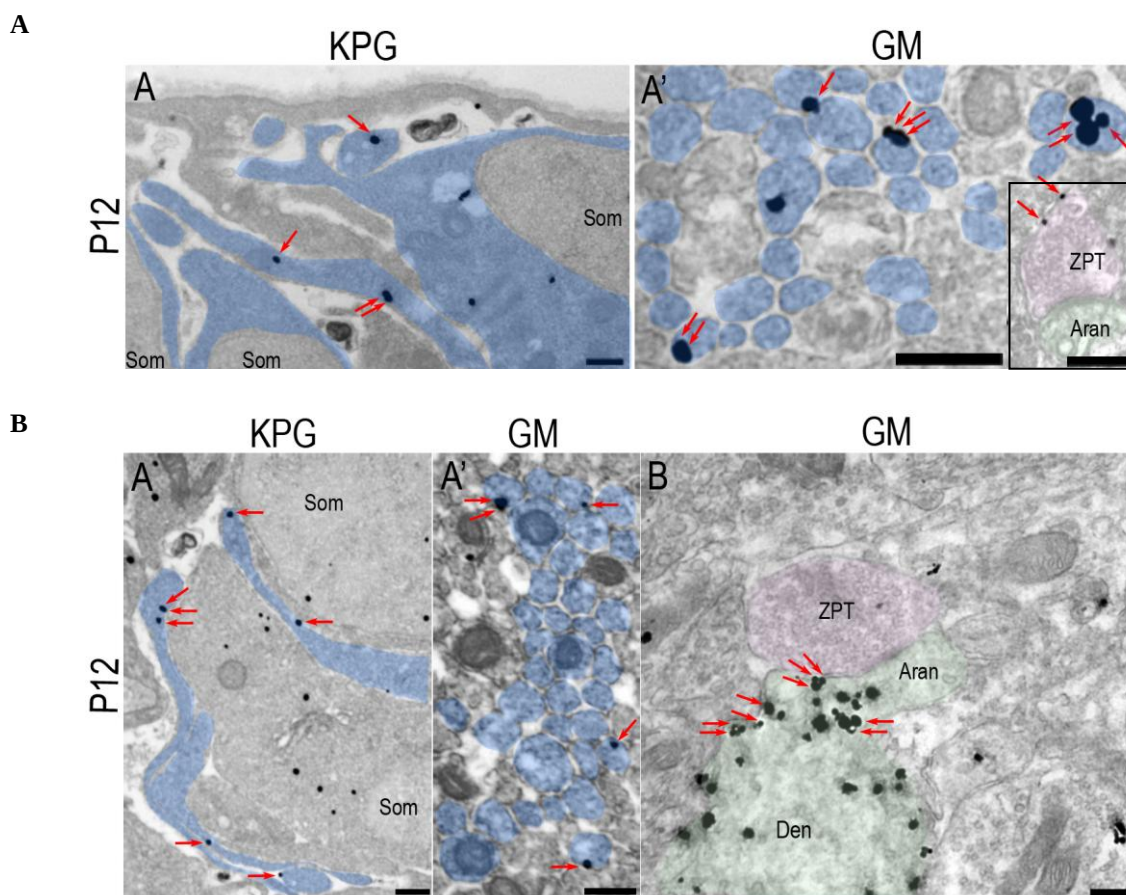
- 2- CB_1 ez duten zuntz paraleloen bukaera sinaptikoek (ZPT) helduan erakusten duten morfologia aztertuko da. Horretarako, jatorrizko sagu helduen zuntz paraleloen ultraegitura mailako parametro desberdinak neurtuko dira eta CB_1 -KO saguek erakusten dituztenekin alderatu.

3. Ikerketaren muina

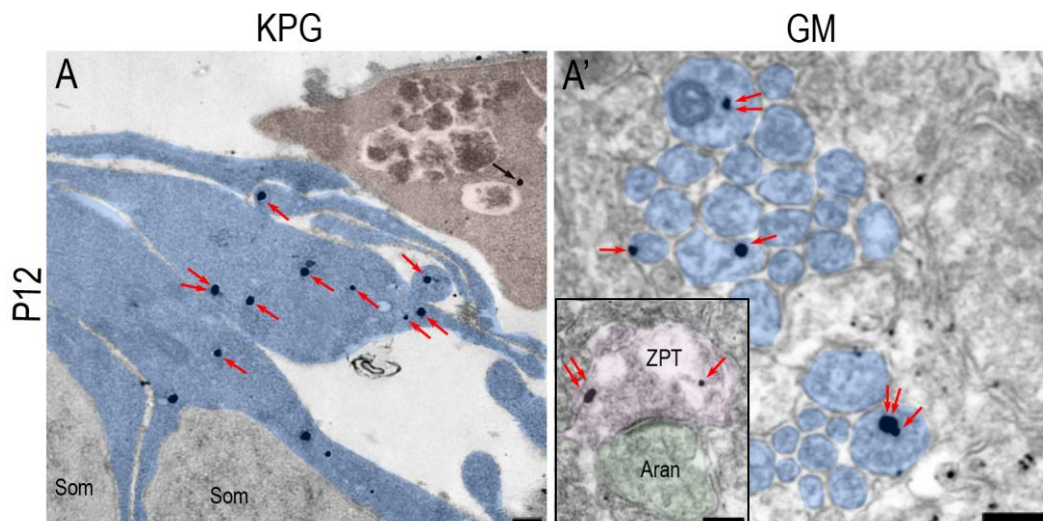
Aurkeztutako helburuak burutzeko, berariazko antigorputzak erabili genituen, teknika immunohistokimikoekin konbinatuz. Lagin desberdinak, handipen handiko mikroskopio elektronikorako prestatu genituen ezinbestekoa baita zehaztasun handiz zelulen mintza, organulu txikienak eta proteinen kokapen zehatza ikusi ahal izateko. Zehazki, garapenean EKSak parte hartzerik duen argitzeko asmoz, burututako azterketarako jaio osteko 0, 5 eta 12 egun (P0, P5 eta P12) dituzten arratoiak erabili genituen. ZPT-en ezaugarri fenotipikoak ultraegitura mailan aztertzeko, sagu helduen zerebeloaren ehuna aztertu zen zuzenean, antigorputzik erabili gabe. Azken hauetan, parametro morfologiko desberdinak aztertu genituen, hala nola, sinapsien kopurua, sinapsien tamaina, terminalen tamaina, besikulen kopurua eta arantza dendritikoen tamaina.

Laburbilduz, erabilitako animaliak honako hauek izan ziren:

- **Sprague Dawley** jatorrizko arratoiak, jaio osteko adin desberdinetakoak: P0, P5 eta P12.
- **CB_1 -WT**: C57 anduiko jatorrizko saguak (CB_1 -WT izendaturikoak; ingeleseko CB_1 -wild-type). Animalia hauek, CB_1 hartzailearen distribuzio normala dute.
- **CB_1 -KO**: C57 anduiko saguak dira; hauek, ez dute CB_1 hartzailerik (CB_1 -KO; ingeleseko CB_1 -knock-out).



C



1. Irudia: CB₁ hartzailleak (A), DAGL- α (B) eta MAGL entzimek (C) zerebeloaren kortexeko pikor zeluletan duten ultraegitura mailako kokapena, jaio osteko P12. egunean, zeinetan garapeneko prozesu guztiak erakusten diren. Kanpoko pikor geruzan (KPG) dauden pikor zelulen somak migrazioan eta beraien hazten dauden axoi-prozesuak erakusten dira (urdinez). GMan, zuntz paraleloen axoiak adieraten dira (urdinez). Profil hauetan, urre partikulak mintzean agertzen dira hartzaillea identifikatuz (A) eta mintzaren hurretasunean entzimen kasuan (B,C) gezien bitartez adierazita. A irudiko A' argazkian, B irudiko B argazkian eta C irudiko A' argazkian, sinapsia sortzean duten kokapena erakusten da. CB₁ hartzaillea eta MAGL alde presinaptikoan geratzen dira behin-betiko eta DAGL- α , berriz, elementu postsinaptiko edo Purkinje zelulen arantza eta dendritetan kokatzen da. KPG, kanpoko pikor geruza; GM, geruza molekularra; P, jaio osteko eguna; Som, soma, ZPT, zuntz paraleloen axoi-botoia; Aran, arantza; Den, dendrita.

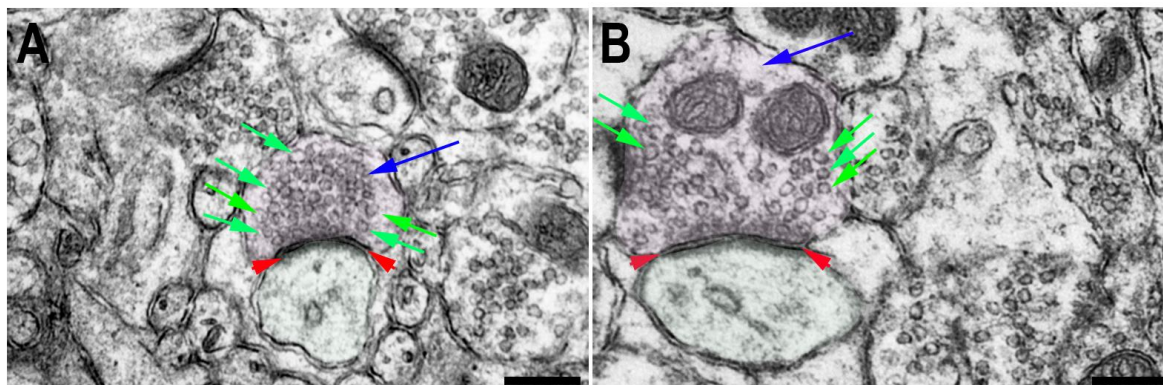
Mikroskopia elektronikoa gure intereseko proteinak ikuskatzeko antigorputzak erabili genituen. Antigorputz horiek metal partikula bat izango dute atxikia, beraz, aztertzen gabiltzan proteinak kokatzen diren lekuan metal partikula bat agertuko zaigu. Modu horretara, CB₁ hartzaillearen eta DAGL- α eta MAGL proteinak identifikatu eta kuantifikazioa egin genuen. Gure emaitzen arabera, jaio osteko garapenean (P0, P5 eta P12) osagai guztiak kanpoko pikor geruzaren zabalera osoan zehar agertzen dira, luzatzen ari den axoi-prozesu horizontalen eta baita prozesu bertikalean ere, mintzean eta mintzaren hurretasunean ere (1. irudia). Hirurak pikor zelulen axoi-prozesuetan batera egoteak, hau da, konpartimendu berean, modu autokrinoan lan egin dezaketela iradokitzen du. Horrela, eKBen sintesia, hartzaillearekiko lotura eta ondoriozko zelula-barneko seinaleztapena toki berebetean gertatzen dira. Axoiaren hazkuntza eta migrazio prozesuak dirauten bitartean, eta sinapsiak guztiz ezarri arte, osagai hauen kokapena mantendu egiten da. Axoiaren muturra bere helburura heltzerakoan eta sinapsia gaitzen denean, EKSko osagai hauek aldaketa topografiko bat erakusten dute. Aldaketa hau, sistemaren eskakizun funtzionalarekin batera doa: garapen neuronal hasieran eta, azkenik, neurotransmisioaren modulazioa. Zerebelo helduan, nerbio-sistemako beste eskualde askotan bezala, bigarren neuronak ekoiztutako eKBak, aurreko neuronan kokatuta dauden hartzailleak kitzikatzen ditu, modu parakrinoan neurona horren transmisioa doituz.

EKSak pikor zelulen garapenean erakusten duen kokapen espezifikoak prozesu horiekin estuki erlazionaturik dagoela adierazten du. Horregatik interesatu ginen horren gabeziak izango lituzkeen ondorioetatik eta kannabinoide hartzaillea espresatzen ez duten genetikoki moldatutako saguez baliatu ginen. Animalia-mota hauetan burututako lanek, zerebeloarekin erlazionatuta dauden urritasun funtzionalak erakusten dute, adibidez, ikasketa motorrean. Zerebeloaren menpe dagoen koordinazio motorra, berriz, ez da kaltetua suertatzen eta faktu hori, harrigarria da, EKSak zerebeloak burutzen duen funtzio horretan parte hartzen baitu. Hori argitze aldera, animalia hauetan, ultraegitura mailako zenbait parametroren azterketa anatomiko zehatza egin genuen, hala nola, sinapsien kopurua, sinapsien tamaina, terminalen tamaina, besikulen kopurua eta arantza dendritikoen tamaina. Image-J programa (1.43u bertsioa, NIH, USA) erabili genuen mikroskopia elektronikoaren bitartez lortutako argazkietan parametro morfologiko hauek neurtzeko.

Funtzio aldetik desberdinak diren eta erasoen aurrean sentsibilitate desberdina erakusten duten zerebeloaren bi eskualde aztertu genituen; zehazki, 10. lobulua oreka-sistemearekin erlazionatua eta 5. lobulua giharren kontrolarekin erlazionatua. Azken hau, kalteberagoa da eta beraz, CB₁ hartzaillearen

gabeziak ondorio desberdinak izan zitzakeen (Clark et al., 2000; Tolbert eta Clark, 2000; Orvis et al., 2012). Zentzu honetan, CB₁ hartzailea ez duten animalietan, bukaera sinaptikoen morfologia zeharo aldatzen dela ikusi genuen baina aldaketa hau ez zen berdina izan lobulu bi hauentzat. 10. lobuluan aldaketak gertatzen diren arren, 5. lobulua da aldaketa nabarmenenak erakusten dituen, hain zuzen ere, kalteberena den lobulu hau.

CB₁ espresatzen duten saguenarekin (CB₁-WT) alderatuz, sinapsi kopurua txikiagoa da eta ezartzen dituzten sinapsiak luzeagoak dira. Bestalde, bukaera sinaptikoei tamaina edo azalera handiagoa erakusten dute eta barruko neurotransmisoreak metatzen dituzten besikulak, sakabanatuago daude.



2. Irudia: 5. lobuluan CB₁ hartzailearen gabeziak ZPen morfologian duen eragina. Pikor zelulen axoi diren ZPen botoi sinaptikoak arrosaz adierazten dira (gezi urdinez ere identifikatuak) eta Purkinje zelulen arantzak berdez koloreztatuta daude (A,B). A argazkia, CB₁ espresatzen duen saguari helduari dagokio eta B argazkia, berriz, CB₁ hartzailerik ez duen saguari dagokio. Gezi berdeak, besikulak adierazten dituzte. Gezi-buru gorriek, sinapsiaren luzera mugatzen dute. Eskala-barrak:0,25 µm.

1. taula. CB₁ hartzailearen gabeziak ZPTen botoi sinaptikoen morfologian dituen eraginak.

Aztertutako parametrua	CB ₁ -WT Batezbestekoa±errore estandarra	CB ₁ -KO Batezbestekoa±errore estandarra	Test estatistikoa
Botoi sinaptikoaren tamaina (µm ²)	0,31±0,008	0,43±0,013 ***	Mann-Whitney U
Sinapsiaren luzera (nm)	303,6±5,372	343,8±6,622 ***	Mann-Whitney U
Besikulen dentsitatea (µm ²)	381±16,01	249,9±13,13 ***	t-Student

*Mann-Whitney U eta t-Student, p<0,0001*** esanguratsua.*

4. Ondorioak

Endokannabinoiden sistemako aztertutako 3 osagaiak (hartzaile eta entzima biak) zerebeloaren kortexean jaio osteko garapenean pikor zelulen axoi-prozesuetan jasaten ari diren garapeneko prozesu guztietan zehar espresatzen dira. CB₁ hartzailea mintzean kokatzen da eta entzimak, mintzaren hurretasunean. Horrek adierazten du, eKBen sintesia zein seinaleztapena autokrinoki, zuntz paraleloetan bertan gertatzen dela. Proteina hauek adinarekin batera aldaketa topografikoa jasaten dute. CB₁ eta MAGL presinaptikoki mantentzen dira adin heldura arte zuntz paraleloen bukaera sinaptikoan; DAGL-α berriz, profil postsinaptikoan espresatzen hasten da, Purkinje zelulen arantza-dendritiko eta dendritetan. Horrek adierazten du, helduan eKBen sintesia alde postsinaptikoan emango dela eta alde presinaptikoan, hau da, zuntz paraleloen CB₁ hartzaileetan eragingo duela. Azken kokapen hau, helduan agertzen den kokapen ohikoa da eta transmisio sinaptikoan parte hartzearen adierazle. Aldaketa topografiko hau, sistemaren eskakizun funtzionalarekin batera doa: garapen neuronala hasieran eta, azkenik, neurotransmisioaren modulazioa.

EKSak, lehen esan bezala, neurotransmisioa doitzen du. Zuntz paraleloei dagokienez, botoi sinaptikoetako besikuletan metatzen da kitzikatzailea den glutamatoa neurotransmisore eta, beraz, glutamato honen askatzea kontrolatuko du CB₁ hartzaileak, neurotransmisore honen gehiegizko askapenak eragin toxikoak izan ditzazkeelako inguruko neuronetan, beraien biziraupena baldintzatuz.

CB₁en gabeziak ondorio larriak izan ditzake beraz zerebelo kortexean. Gure emaitzek ikustarazi dute CB₁ hartzailerik ez izateak, zuntz paraleloen bukaera sinaptikoen morfologiarengan aldaketa nabarmenak eragiten dituela, batez ere sentiberagoa den 5. lobuluan. Elementu postsinaptikoak, hau da, Purkinje zelulen arantza-dendritikoak aldaketa barik dira eta, beraz, CB₁ hartzailereen gabeziak elementu presinaptikoan baino ez du eragina. CB₁ ez duten saguetan (CB₁-KO), 5. lobulu honek, hain kaltebera ez den 10. lobuluak dituen ezaugarriak erakusten ditu. Beraz, animalia hauek CB₁ hartzailerearekiko duten gabeziak sor ditzakeen ondorioak hain larriak izanik, sistemak berak egokitzapen morfologikoak jasaten ditu, arrisku gutxiago suposatzen duen egitura eskainiz. Handiagoa den eta besikulak sakabanatuago dituen bukaera sinaptiko batek egoera fisiopatologikoen aurrean irmotasuna eskaini dezake, horrela, neurotransmisoreen askatze-probabilitatea jaitsiz. Izan ere, hauek dira kalteberatasun gutxiago duen 10. lobuluak aurkezten dituen ezaugarriak. Aldaketa hauek izan daitezke animalia hauek izan beharko lituzketen urritasun funtzionalak pentsa baino arinagoak izatearen erantzuleak.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Gure azterketen bitartez EKSren osagaien kokapen zehatza aztertu dugu zerebeloaren jaiosteko garapeneko zuntz paraleloetan. Kokapen hori, helduan agertzen denaren desberdina da garapenean duen funtzioa iradokiz. Etorkizunean, farmakologikoki saiakera desberdinak egitea gustatuko litzaiguke eKB mailak aldatuz eta hartzailera inhibituz horrek zuntz paraleloen heltze-prozesu zehatzetan zein ondorio duen aztertzeko.

Horrez gainera, edokannabinoidiek garapenean izan ditzaketen eragina ikusiz, haurdun dauden sagu kumeetan fitokannabinoidak kontsumitzeak eduki ditzakeen ondorioak ultraegitura mailan aztertzea interesgarria da, gizartean gerta daitekeen egoera bat baita.

Bestalde, ikusi da Dravet sindromea (epilepsia errefraktarioa) zein hipoxia perinatalean, umeetan gertatzen diren bi kasutan, kannabinoideetan oinarritutako tratamenduak oso eraginkorrak izan daitezkeela. Momentuz ez da ezagutzen tratamendu horiek neuronon garapenean eduki ditzaketen ondorioak. Gure asmoa da, tratamendu horiek gure eremuan duten eragina aztertzea etorkizunean albo efektu gutxien duten tratamenduak garatze aldera.

6. Erreferentziak

- Aguado T., Palazuelos J., Monory K., Stella N., Cravatt B., Lutz B., Marsicano G., Kokaia Z., Guzmán M., Galve-Roperh I. (2006): "The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells". *J Neurosci*, 26(5):1551-61.
- Berghuis P., Dobszay M.B., Wang X., Spano S., Ledda F., Sousa K.M., Schulte G., Ernfors P., Mackie K., Paratcha G., Hurd Y.L., Harkany T. (2005): "Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52):19115-20.
- Berghuis P., Rajnec A.M., Morozov Y.M., Ross R.A., Mulder J., Urbán G.M., Monory K., Marsicano G., Matteoli M., Canty A., Irving A.J., Katona I., Yanagawa Y., Rakic P., Lutz B., Mackie K., Harkany T. (2007): "Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity". *Science*, 316(5828):1212-6.
- Berrendero F., GarcíaGil L., Hernández M.L., Romero J., Cebeira M., de Miguel R., Ramos J.A., Fernández Ruiz J.J. (1998): "Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development". *Development*, 125(16):3179-88.
- Bilkei-Gorzo A., Racz I., Valverde O., Otto M., Michel K., Sastre M., Zimmer A. (2005): "Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(43):15670-5.
- Biran V., Verney C., Ferriero D.M. (2012): "Perinatal cerebellar injury in human and animal models". *Neurology research international*, 2012:858929.
- Buckley N.E., Hansson S., Harta G., Mezey E. (1998): "Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat". *Neuroscience*, 82(4):1131-49.
- Chevalyere V., Takahashi K.A., Castillo P.E. (2006): "Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS". *Annu Rev Neurosci*, 29:37-76.
- Clark B.R., LaRegina M., Tolbert D.L. (2000): "X-linked transmission of the shaker mutation in rats with hereditary Purkinje cell degeneration and ataxia". *Brain research*, 858(2), 264-73.
- de la Torre-Ubieta L., Bonni A. (2011): "Transcriptional regulation of neuronal polarity and morphogenesis in the mammalian brain". *Neuron*, 72(1):22-40.

- de Salas-Quiroga A., Díaz-Alonso J., García-Rincón D., Remmers F., Vega D., Gómez-Cañas M., Lutz B., Guzmán M., Galve-Roperh I. (2015): “Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB1 receptors on developing cortical neurons”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(44):13693-8.
- Gaffuri A.L., Ladarre D., Lenkei Z. (2012): “Type-1 cannabinoid receptor signaling in neuronal development”. *Pharmacology*, 90(1-2):19-39.
- 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(11):2991-3001.
- Keimpema E., Mackie K., Harkany T. (2011) “Molecular model of cannabis sensitivity in developing neuronal circuits. *Trends Pharmacol Sci*, 32(9):551-61.
- Kishimoto Y., Kano M. (2006): “Endogenous cannabinoid signaling through the CB1 receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning”. *J Neurosci*, 26(34):8829-37.
- Kishimoto Y., Nakazawa K., Tonegawa S., Kirino Y., Kano M. (2006): “Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for adaptive timing of trace eyeblink conditioned response”. *J Neurosci*, 26(5):1562-70.
- Orvis G.D., Hartzell A.L., Smith J.B., Barraza L.H., Wilson S.L., Szulc K.U., Turnbull D.H., Joyner A.L. (2012) “The engrailed homeobox genes are required in multiple cell lineages to coordinate sequential formation of fissures and growth of the cerebellum”. *Developmental biology*, 367(1):25–39.
- Patel S., Hillard C.J. (2001): “Cannabinoid CB(1) receptor agonists produce cerebellar dysfunction in mice”. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(2):629-37
- Tanimura A., Uchigashima M., Yamazaki M., Uesaka N., Mikuni T., Abe M., Hashimoto K., Watanabe M., Sakimura K., Kano M. (2012): “Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(30):12195-200.
- Tolbert D.L., Clark B.R. (2000): “Olivocerebellar projections modify hereditary Purkinje cell degeneration”. *Neuroscience*, 101(2):417-33.
- Williams E.J., Walsh F.S., Doherty P. (2003): “The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response”. *J Cell Biol*, 160(4):481-6.
- Yoshida T., Fukaya M., Uchigashima M., Miura E., Kamiya H., Kano M., Watanabe M. (2006): “Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor”. *J Neurosci*, 26(18):4740-51.
- Zhou Y., Oudin M.J., Gajendra S., Sonogo M., Falenta K., Williams G., Lalli G., Doherty P. (2015): “Regional effects of endocannabinoid, BDNF and FGF receptor signalling on neuroblast motility and guidance along the rostral migratory stream”. *Mol Cell Neurosci*, 64:32-43.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa honek honako diru-laguntzak izan ditu: Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) beka; Eusko Jaurlaritza GIC07/70-IT-432-07; Zientzia eta Berrikuntza Ministerioa SAF2009-07065; Euskal Herriko Unibertsitatea UFI11/41; Droga-menpekotasun Arazoen Sarea (RTA)-Carlos III. Osasun-Institutua RD12/0028/0004; Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioa (MINECO) BFU2012-33334; Eusko Jaurlaritza IT764-13.

Morfinak H3K27me3 histonaren antolamenduan sortutako eraldaketak inpronta genomikodun geneen adierazpenean duen eragin zuzenaren egiaztapena, ChIP-seq teknikaren bidez

Iraia Muñoa-Hoyos¹; Marta Gianzo¹; Paloma Garcia²; Jon Irazusta¹ eta Nerea Subirán¹

¹Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

²University of Birmingham (Ingalaterra)

iraia.munoa@ehu.eus

Laburpena

Kanpo faktore edo estimuluek banakoan duten eragina epigenetikaren bitartez aztertzen da. Aldaketa epigenetikoak ez dira DNA-ren sekuentzia ematen diren mutazioak, DNA-ri itsasten zaizkion molekula kimiko batzuk baizik, geneen adierazpenaren erregulazioan eragina izan dezaketenak. Kanpo faktoreek banako helduan aldaketa fisiologiko ugari sortzen dituztela erakutsi dute ikerketa ezberdinek. Baina pentsa dezagun nolako eragina izango luketen kanpo estimuluek fetuan eta zein ondorio ekarriko lituzke fetuaren garapen prozesuan eta ondorioz banakoan. Lan honen helburua, kanpo estimulua den morfinak, saguaren zelula ametan sortzen dituen aldaketa epigenetikoak aztertzea da, zehazki, errepresio marka bat den histona batean eta genomaren zehar berari lotuta agertzen zaizkion geneetan.

Hitz gakoak: aldaketa epigenetikoak, H3K27me3 histona, inpronta genomikoa duten geneak, morfina.

Abstract

Epigenetics is the study of how environmental factors or external stimuli can affect the individual. Epigenetic modifications don't involve changes in the underlying DNA sequence or mutations; in fact, they are small biochemical molecules that stick to the DNA, regulating the expression of different genes. In the last years, lots of research groups have described that environmental factors have direct impact in physiological traits of adult individuals. But what do we know about the effect of the external stimuli in the fetus, and the consequences that those stimuli can produce in the early stages of the developmental process? The aim of this research is to analyze the epigenetic modifications caused by morphine in mouse embryonic stem cells, more specifically, we have focused the study on a repressive mark histone and the genes attached to this histone throughout the genome.

Key words: epigenetic modifications, histone H3K27me3, imprinted genes, morphine.

1. Sarrera eta motibazioa

Epigenetikak, kanpo faktore edo inguruneak, gure DNA-n izan dezakeen eragina aztertzen du. Ideia hau, Aristotelesek aipatu zuen lehenengoz bere garaian, eta Lamarckek berretsi orain dela mende batzuk. XXI.mendeko zientzian, garrantzia handiko arloa bihurtu da, ikerkuntza askok erakutsi baitute, genomaren sekuentzia aldatu gabe, geneak erregulatzen dituzten mekanismoak badaudela. Mekanismo hauek osatzen dute epigenetika, eta aldaketa epigenetikoak kanpo faktore edo estimuluek sortuko lituzkete. Esaterako, dietak, toxiko ezberdinen kontsumoak (hala nola, tabakoak, drogak), jarduerak fisikoak, pairatzen dugun estresak, hartzen ditugun farmakoek etab.

Aldaketa epigenetikoak

Aldaketa epigenetikoak DNA-ri itsasten zaizkion molekula kimikoak dira, geneen adierazpena kontrolatzen dutenak, baina aipatu bezala, DNA-ren sekuentzia inolako aldaketarik sortu gabe (Marx 2012). Orokorrean, hiru dira geneen adierazpena erregulatzen duten mekanismo epigenetikoak:

- **DNA-ren metilazioa.** DNA-ren puntu zehatz batean metilo talde bat (talde kimiko bat) gehitzeari deritzo, orokorrean dietatik lortzen duguna. DNA-ren sekuentzia zati bat zenbat eta metilatuagoa egon, orduan eta posibleagoa izango da zati horretako informazio genetikoa inaktibatu edo isilaraztea, hain zuzen ere, metilo taldea gene adierazpenaren etengailu modura arituko da (Baylin eta lank., 2005).

- **Histonaren eraldaketa.** Zelulen nukleoetan DNA-ren sekuentzia (2-3metroko luzerakoa) pilatuta agertzen da nukleosoma izeneko konplexua osatzen duten proteina batzuen inguruan. Proteina horiek dira histonak eta hauek eraldaketa epigenetiko ugari jasan ditzakete aldaketa kimiko ezberdinen bitartez, fosforilazioak, metilazioak eta azetilazioak, besteak beste (Rice eta lank., 2001). Hauek metilazioen kasuan bezala geneen adierazpen prozesuan dute eragina. Histonek eraldaketak jasotzen dituztenean, beregan biltzen duten DNA erlaxatu edo trinkotzen dute eta ondorioz, sekuentziako informazioa erakutsi edo ezkutatu. Hau da, geneen adierazpena kontrolatzen dute, hura bultzatuz edo etenez (Turner, 2011).

- **Kodifikatu gabeko RNA-ren sorrera.** RNA molekula hauek geneen adierazpena itzaltzea bultzatzen dute (Costa eta lank., 2005). Esparru honetan ez dago ikerketa lan askorik oraindik ere, baina epigenetika arloan garrantzia handia izan dezakeela aurreikusten da.

Aipatzekoa da H3K27me3 histona (histona honen 27.posizioan dagoen lisina metilatu agertzen da 3 aldiz), hau, marka epigenetiko errepresibo bezala ezagutzen da eta ondorioz, bere inguruko DNA trinkotu egiten du geneen adierazpena etenaraziz (Brykczynska eta lank., 2010). Gure laborategian egindako aurreko ikerketei jarraituz, lan honetan H3K27me3 histonak jasaten dituen aldaketak aztertuko ditugu, kanpo faktore edo estimulu bezala morfina erabiliz.

Sistem opioidea

Sistema opioidea, fisiologian garrantzi handiko prozesu zelularrak erregulatzen dituen komunikazio zelularreko sistema bat da. Batez ere, minaren eta plazeraren erregulazioarekin erlazionatua izan da Nerbio Sistema Zentralean, eta pixkana, ugalkortasuna eta garapena bezalako beste prozesu fisiologikoekin zerikusia duela frogatu da (Fabri eta lank., 1989, Subiran eta lank., 2011). Morfina, opioaren osagai aktiboa, beste edozein narkotiko baino gehiago erabili izan da medikuntzan bere balio terapeutikoagatik, baina erabilpen kroniko batek bigarren mailako efektuak sor ditzakeela deskribatu da, horien artean garrantzitsuena analgesiarekiko tolerantziaren garapena izanik (Dumas & Pollack, 2008, Michael & MacDonald, 2011).

Aurreko atalean aipatzen genituen kanpo faktore edo estimulu horien taldean morfina kontsumoa kontsideratu dezakegu. Honen harira, asko dira bibliografian zehar morfina sortzen dituen aldaketa epigenetikoak aztertzen dituzten ikerketa ezberdinak (Godfrey eta lank., 2007) eta honen ondorioak azaltzen dituztenak bai bizi kalitatean eta baita ondorengo belaunaldien transmisioan, batez ere droga kontsumoari lotuta (Ornoy eta lank., 1996). Adibidez, Tapocik eta lankideek 2009 urtean egindako ikerketa batean morfina tratamenduaren ondorioz sagu helduek, beraien burmuinetan, aldaketa fisiologiko eta estrukturalak jasaten zituztela deskribatu zuten (Tapocik eta lank., 2009).

Morfina bezalako kanpo estimulu batek, banakoan efektu esanguratsua eragiten baldin badu, pentsa dezagun banakoaren sortze prozesuan zehar, hau da, enbrioaren garapenean zehar egon daitekeen edozein estimulu ere efektu ezberdinak sorraraziko dituela prozesu ezberdinetan. Ideia honi jarraituz, lan honetan saguaren zelula ama enbrionarioak (mESC) erabili dira. Hauek, enbrioia blastozisto garapen mailara iristen den unean (sagueta

haurdunaldiko 3.5-4.5 egunean gertatzen da), barneko zelula-masa osatzen duten zelulak dira. Zelula ama enbrionarioen ezaugarrien artean aipagarrienak bi dira: lehenengoa, zelula desberdindu gabekoak direla, hau da, zatitzeko gaitasuna mugarik gabe mantendu dezaketela, eta bigarrenkoa pluripotenteak direla, ondorioz enbrioi-ehun espezializatu guztiak sortu ditzaketela, hots, zelula hauek izango dira fetua emango dutenak eta ondorioz, banakoa. Beraz, mESC-en “in vitro” modeloa erabiliko dugu, zelula hauek morfinarekin tratatu eta bere eragina ikusteko batez ere H3K27me3 histona ardatz bezala hartuta.

Inpronta genomikoa duten geneak

Morfinaren eragina, inpronta genomikoa duten geneekin lotzen duten ikerketak geroz eta ugariagoak dira (Gioiosa eta lank., 2007, Gioiosa eta lank., 2008, Tapocik eta lank., 2009). Inpronta genomikoa prozesu biologiko bat da, gene bat edo genomaren eremu bat biokimikoki markarazten duena jatorri parentala adieraziz, hau da, gene jakin bat amaren edo aitarengatik jasotako aleloaren kopia den adierazten digute. Inprontaren ondorioz, aleloetako bat bakarrik adieraziko da eta bestea itzalita mantenduko da. Ugaztunon garapen egokia eman dadin, amaren eta aitaren inpronta duten geneen ekarpena beharrezkoa da, prozesu horretan aldaketarik emanez gero hainbat eta hainbat gaixotasun edo sindrome sortu daitezke eta (Knoll eta lank., 1989, Nicholls eta lank., 2001, Horsthemke eta lank., 2008, Bartolomei eta Ferguson-Smith 2011).

Gaur egun, 150 inpronta genomikodun gene baino gehiago deskribatu dira bibliografian, batzuetan banaka eta bestetan taldeka edo “clusterretan” haritzen direnak (Williamson eta lank., 2013). Clusterretako gene hauen inpronta genomikoa orokorrean, Inprontaren Kontrol Eremua (Imprinting Control Region edo ICR) izeneko elementu erregulatzaileen bidez burutzen da (Dindot eta lank., 2009). Hauek, gurasoekiko espezifikoak diren aldaketa epigenetikoak izaten dituzte, hau da metilatuak egon daitezke edo histonaren eraldaketaren ondorio izan (Li et al. 1993). ICR eremu hauek zitosina eta guanina nukleotidoetan aberatsak dira (CpG irlak ere deiturikoak), eta beraz, metilazioa emateko leku aproposenak dira. ICR eremuak osatzen dituzten CpG irlak metilazio ezberdintasunak erakusten dituzte clusterretako gene konkretuetan, DMR deituak (ingelesezko Differentially Methylated Regions) (Edwards and Ferguson-Smith 2007). Hau dela eta inpronta genomikoa duten geneak gure ikerketa honen jomuga dira, beraiei ICR eta DMR eremuak aldaketa epigenetikoak pilatzeko leku aproposa baitira.

Guzti honekin, morfinaren ondorioz H3K27me3 histonan sorturiko antolamendu aldaketek inpronta genomikoa duten geneetan izan dezakeen eragina aztertuko dugu lan honen bidez.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Taldeak burutu dituen aurreko ikerketa eta bibliografiako hainbat lan uztartuz ikusi dugu, H3K27me3 errepresio marka epigenetikoak konplexu erregulatzaile baten parte dela eta hainbat prozesuren kontrolean parte hartzen duela, hala nola, zelulen arteko memorian, inpronta genomikoan, X kromosomaren inaktibazioan edota belaunaldiz-belaunaldi transmititzen den memoria epigenetikoan (McEwen eta Ferguson-Smith 2010).

Jarraian aurkezten den lanaren bitartez, kanpo estimuluek, morfinak kasu, H3K27me3 histonaren antolamenduaren eraldaketaren bitartez, inpronta genomikoa duten geneetan izan dezakeen eragina aztertu nahi dugu. Era honetan morfinak sorturiko aldaketa epigenetikoak identifikatu ahal izango ditugu eta H3K27me3 errepresio markaren jarduera prozesua deskribatzen lagundu ahal izango dugu.

2.1. Helburu Orokorrak: Saguaren zelula ama enbrionarioetan, morfinaren tratamendu kronikoak izan dezakeen eragina aztertzea, maila epigenetiko eta transkripzionalean.

2.2. Helburu Espezifikokoak:

- 1) H3K23me3 histonaren bilakaera globala hautematea kontrol laginetan eta morfinarekin tratatutako laginetan.
- 2) Morfinak inpronta genomikoa duten geneetan eragin zuzena duen identifikatzea.
- 3) H3K27me3 histonan, morfinak sortutako antolamenduaren aldaketak ikertzea eta inpronta genomikoa duten geneetan duen eragina behatzea.

3. Ikerketaren muina

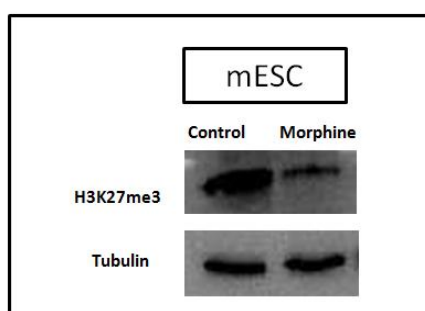
Saguaren zelula amak, 2i+LIF hazkuntza medioan hazi ziren, 37°C-tan eta CO₂ %5-ean. Medio hau, hainbat inhibitzailez osaturiko hazkuntza medioa da zelula amen pluripotentsia mantentzeko ezinbestekoa dena. Morfinaren tratamendu kronikoa, 10⁻⁵ M kontzentrazioan egin zen 24 ordutan inkubatuz. Horrela bi lagin izan genituen esperimenduak egiterako orduan, tratatu gabeko zelulak edo kontrol-laginak, eta tratatutako zelulak edo morfina-laginak.

3.1 Morfinak eragindako bilakaera H3K27me3 histonan – Western Blot Teknika

H3K27me3 histonaren adierazpenean morfinak eragin dezakeen bilakaera aztertzeko Western Blot teknika erabili dugu. Kontrol eta morfina-laginetako zelula kopurua berdindu ondoren, laginen proteinak beraien tamainaren arabera banatu dira eta ondoren, mintz batera transferitu dira, bertan H3K27me3-a detektatzen duen antigorputz espezifikoaren bitartez proteinaren adierazpena aztertzeko. Lortutako banden barne kontrol gisa, tubulina erabili da, aztertutako proteina kopurua bi kasuetan berdina dela ziurtatzeko.

Horrela, morfinak H3K27me3 histonan efektu negatibo global bat eragiten duela ikusi dugu (1.irudia). Histona metilatu kopuruaren jaitsierak adierazten du, morfinaren tratamenduaren ondoren kromatinaren kondentsazioa aldatu egiten dela, trinkoa izatetik erlaxatuagoa izatera pasatzen da eta beraz, geneen adierazpen prozesua ahalbidetzea ekar dezake.

1. Irudia. H3K27me3 histonaren bilakaera kontrol eta morfina laginetan.



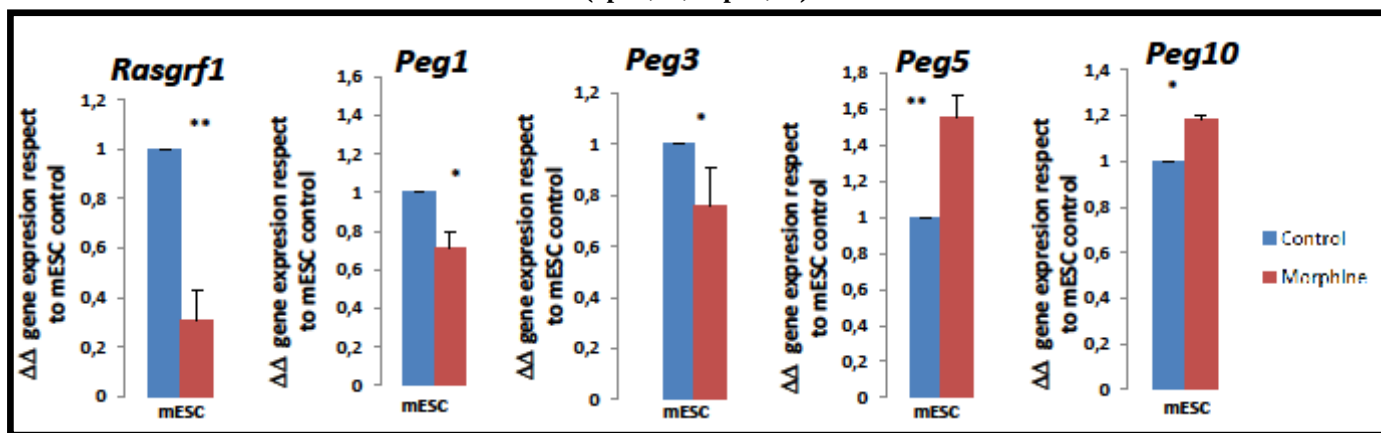
3.2. Morfinaren eragina inpronta genomidun geneen adierazpenean-qRT-PCR Teknika

Morfinaren tratamenduaren azterkari nagusiak inpronta genomikoa duten geneak dira gure lanean. Morfinak gene hauetan eraginen bat ote duen ikusteko, qRT-PCR teknikarekin inprontadun gene familiarren adierazpen aldaketak neurtu ditugu kontrol eta morfina laginetan.

Teknika honen bitartez inpronta genomikoa duten geneetan adierazpen aldaketa esanguratsuak identifikatu ditugu morfinarekin trataturiko laginak kontrol laginekin alderatuta (2.irudia). Adibidez, aitaren aldeko inpronta genomikoa duten gene diren Rasgrf1, Peg1 eta

Peg3-k beherakada adierazgarria erakutsi dute beraien adierazpenean eta Peg5 eta Peg10 geneek aldiz, adierazpena areagotu dute.

2. Irudia. Inpronta genomikoa duten geneen adierazpena kontrol eta morfina laginetan (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).



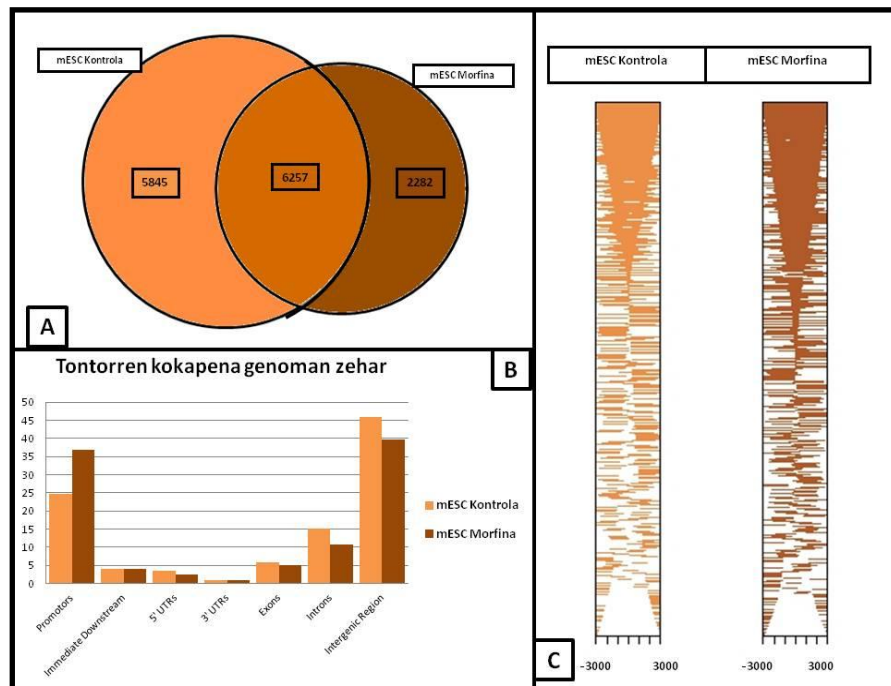
3.3 H3K27me3 histonaren antolamenduan eraldaketak – ChIP-seq Teknika

H3K27me3 histonaren analisi sakon bat egin eta bere antolamenduan morfina eragindako eraldaketak aztertzeko ChIP teknika erabili dugu. Lan teknika honen bidez histonari lotuta dagoen DNA guztia immunoprezipitatu dugu H3K27me3-arentzat espezifikoa den antigorputz baten bitartez, hots, H3K27me3 histonari lotutako DNA guztia erauzi da. Gero DNA hori purifikatu egin dugu eta sekuentziatu. Sekuentziazioaren teknika, Next Generation Sequencing delako teknika berrien parte da. Izan ere teknika honen bidez, H3K27me3 histonak, genoma osoko geneak zein puntu erregulatzen dituen ikusi dezakegu eta morfina ondoz sortutako ezberdintasunak aztertu.

Behin immunoprezipitaziotik lortutako DNA-aren sekuentziak izanik, analisi bioinformatiko baten bitartez landu dira. Lehenengo pausua, DNA hori, erreferentziazko genoma batekin lerrokatzea izan da, puzzle bat izango balitz bezala gure DNA genomaren zehar kokatuz. Ondoren, DNA puzketa horien pilaketaren arabera, beraien intentsitatea neurtu da eta genomaren zehar marrazten dituzten “tontor” bezala adierazi dira. Azkenik, tontor horien inguruan dauden geneen izenak identifikatu dira eta horiek, zein puntutan erregulatzen diren aztertu da, hau da, promotoreetan, genearen gorputzean, exoietan, introietan etab.

ChIP-seq teknikaren emaitza orokorrean aurreko ondorioa indartzen dute, morfina tratamenduen ondoren lortu dugun tontor kopuruan jaitsiera nabarmen bat ageri delako (3.irudia A). Kontrol laginean 12102 tontor zenbatu ditugu eta morfina laginean aldiz 8539 tontor. Honek adierazten duenez, morfina tratamenduak H3K27me3 eta DNA-ren arteko lotura puntuak murrizten ditu. Behin tontor bakoitzari dagokion geneak identifikatu ondoren, ikus dezakegu orokorrean H3K27me3 histonaren eta DNAren arteko lotura guinea, promotoreetan eta gene intergenikoetan ematen dela gehien bat (3.irudia B). Izan ere morfina tratamenduak promotoreetako loturetan igoera bat dakar. Emaitza hau bat dator, transkripzioaren hasiera guinearekiko histonak duen loturaren intentsitatearen mapa egiten dugunean (3.irudia C). Bertan ikus daiteke nola morfina tratamenduak transkripzioaren hasiera guinearekiko lotura areagotzen duen.

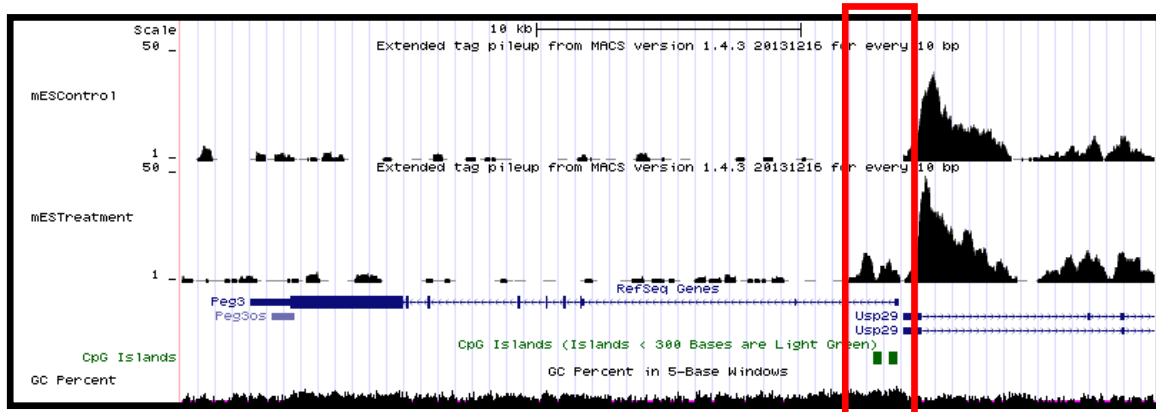
3. Irudia: ChIP-Seq teknikaren emaitza orokorrak. A) Tontor kopuruak lagin bakoitzeko, lagin bakoitzak propio dituenak eta bi laginek partekatzen dituztenak. B) Tontorren kokapenaren portzentaiak genomaren zehar. C) H3K27me3 histonaren antolamendua transkripzioaren hasiera guinearekiko duen intentsitatea.



Erreferentzia genomarekiko egindako lerroketak sakonago aztertuz, morfina eragindako H3K27me3 histonaren antolamendu aldaketak ikusteko, inpronta genomikoa duten geneetara zuzendu gara. Horretarako UCSC Genome Browser nabigatzaile genomikoa erabili da (Kent eta lank., 2002). Kontrol laginean sortzen diren tontorrak morfina laginarekin alderatuz ikusi dugu, aldaketa gehienak CpG irlak dauden zonaldean ematen direla, orokorrean zonalde hauek genearen ICR edo DMR gunearekin bat etorritik.

Emaita hau sakontasunean azaltzeko, inpronta genomikoa duen gene bat hartuko dugu kasu konkretuaren adibide bezala: Peg3, aitarene inpronta genomikoa duen genea (4.irudia). Lehenengo panelean irudiko genomaren zatiaren eskala ageri da, 10 Kb-koa. Bigarren eta hirugarren panelean kontrol eta morfina laginaren tontorrak azaltzen dira hurrenez hurren. Laugarren panelean genomako posizio horretako geneak izendatzen dira beraie exoi eta introiekin urdinez, Peg3 eta berari jarraiki doan Usp29 geneak alegia. Eta azkenik, bosgarren panelean, CpG irlen posizioak marrazten dira berdez. Irudi honetan ikusi dezakegu kontrol eta morfina laginen H3K27me3 histonaren antolamendua alderatuz, bigarrenengoan bi tontor agertzen direla CpG irlen posizioarekin bat datorren puntuan (lauki gorria).

4.irudia: H3K27me3 histonaren antolamendua genomaz zehar (Peg3 genearen posizioa)



Bibliografiak deskribatzen du Peg3 genea, sarreran aipaturiko cluster horien partaide dela, 7. kromosoman hain zuzen ere (Kim eta lank., 2012). Cluster honek osatzen duen ICR-a Peg3 genearen promotorean dago kokatua (Hanna eta Kelsey, 2014). Guk morfinaren tratamenduaren ondoren agerian ikusten ditugun bi tontor horiek ere Peg3 genearen promotorearekin bat datoz eta baita CpG irlaren posizioarekin.

4. Ondorioak

Lan honen ondorio bezala esan dezakegu, morfinak H3K27me3 histonaren aktibitatean jaitsiera bat eragiten duela eta gainera, bere antolamenduan aldaketa zuzenak burutzen dituela, inpronta genomiko duten geneekiko lotura handiagotuz. Zehazki, lotura hau ICR eta DMR guneeetan gertatzen da, erregulazio bat emanez. Honek morfinaren eraginez eraldatu daitekeen mekanismo epigenetiko bat eskaintzen digu, aztertzen jarraitzea merezi duena. Izan ere, morfinak, inpronta genomikoa duten geneengan sortzen duen efektu horrek inpaktu handia izan dezake bai memoria zelularrean, inpronta genomikoan, X kromosomaren inaktibazioan, enbrioiaaren garapenean edota belaunaldiz belaunaldiko oinordekotza epigenetikoan.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honen bitartez, in vitro eredu bat sortu nahi izan dugu, kanpo estimulu batek zelula enbrionikoetan izan dezakeen eragina aztertzeko. Etorkizuneko lana izango litzateke, morfina ez den beste motako kanpo estimuluek ere, ondorio hauek sortzen dituzten edo ez aztertzea, mekanismo epigenetikoaren oinarriak finkatu ahal izateko.

Bestalde lana in vitro mailatik in vivo mailara estrapolatzea izango litzateke beste pausuetako bat, fetu garaian izandako estimulu batek, banakoaren garapenean izan dezakeen eragina aztertzeko eta kaltetuak egon daitezkeen prozesuak identifikatzeko.

6. Erreferentziak

- Bartolomei M. S. eta Ferguson-Smith A. C. (2011). Mammalian Genomic Imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 3: a002592.
- Baylin S. B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2, S4–S11.
- Brykczynska U., Hisano M., Erkek S., Ramos L., Oakeley E. J., Roloff T. C., Beisel C., Schübeler D., Stadler M. B. eta Peters A. H. (2010). Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 679–687. doi:10.1038/nsmb.1821
- Costa F. F. (2005). Non-coding RNA: new players in eukaryotic biology. *Gene* 357, 83–94.
- Dindot S. V., Person R., Strivens M., Garcia R. eta Beaudet A. L. (2009). Epigenetic profiling at mouse imprinted gene clusters reveals novel epigenetic and genetic features at differentially methylated regions. *Genome Res*; 19(8): 1374–1383. doi: 10.1101/gr.089185.108.
- Dumas E. O. eta Pollack G. M. (2008). Opioid tolerance development: a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *AAPS J*; 10(4): 537. doi:10.1208/s12248-008-9056-1.
- Edwards C.A eta Ferguson-Smith A.C. (2007). Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Jun;19(3):281-9.
- Fabbri A., Jannini E. A., Gnassi L., Ulisse S., Moretti C. eta Isidori A. (1989). Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as a model of control at multiple sites. *J Steroid Biochem.* 32(1B):145-150.
- Godfrey K. M., Lillycrop K.A., Burdge G.C., Gluckman P.D. eta Hanson M.A. (2007). Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease. *Pediatr*;61:5R–10R.
- Gioiosa L., Chen X., Watkins R., Klanfer N., Bryant C. D., Evans C. J. eta Arthur P. Arnold A. P. (2008). Sex Chromosome Complement Affects Nociception in Tests of Acute and

- Chronic Exposure to Morphine in Mice. *Horm Behav*; 53(1): 124-130. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.09.003.
- Gioiosa L., Chen X., Watkins R., Umeda E. A., eta Arthur P. Arnold A. P. (2009). Sex Chromosome Complement Affects Nociception and Analgesia in Newborn Mice. *J Pain*; 9(10): 962–969. doi: 10.1016/j.jpain.2008.06.001.
- Hanna C. W. eta Kelsey G. (2014). The specification of imprints in mammals. *Heredity*; 113, 176–183; doi:10.1038/hdy.2014.54.
- Horsthemke B. eta Wagstaff J. (2008). Mechanisms of imprinting of the Prader–Willi/Angelman region. *Am J Med Genet A* 146A: 2041–2052.
- Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M. eta Haussler D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res*.12(6):996-1006.
- Kim J., Ekram M. B. Kim H., Faisal M., Frey W. D., Huang J. M., Tran K., M. Kim M. M. eta Yu S. (2012). Imprinting control region (ICR) of the Peg3 domain. *Hum Mol Genet*; 21(12): 2677–2687. doi: 10.1093/hmg/ddc092
- Knoll J. H. M., Nicholls R. D., Magenis R. E., Graham J. M. J., Lalande M. eta Latt S. A. (1989). Angelman and Prader–Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* 32: 285–290.
- Li E., Beard C. eta Jaenisch R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*; 366:362-365.
- Marx V. (2012). Epigenetics: Reading the second genomic code. *Nature*. 491,143–147. doi:10.1038/491143a.
- McEwen K.R. eta Ferguson-Smith A.C. (2010). Distinguishing epigenetic marks of developmental and imprinting regulation. *Epigenetics & Chromatin* 3(1): 2. doi: 10.1186/1756-8935-3-2.
- Michael M. M. eta MacDonald J. C. (2011). Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *Br J Pharmacol*; 164(4): 1322–1334. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01335.x
- Nicholls R.D. eta Knepper J.L. (2001). Genome organization, function, and imprinting in Prader–Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 153–175.
- Ornoy A., Michalevskaya V., Lukashov I., Bar-Hamburger R. eta Harel S. (1996). The developmental outcome of children born to heroin-dependent mothers, raised at home or adopted. *Child Abuse Negl.*, 20(5):385-96.
- Rice, J. C. eta Allis, C. D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 263-273.
- Subirán S., Casis L., eta Irazusta J. (2011). Regulation of Male Fertility by the Opioid System. *Mol Med*; 17(7-8): 846–853. doi: 10.2119/molmed.2010.00268.
- Tapocik J. D., Letwin N, Mayo C.L., Frank B., Luu T., Achinike O., House C., Williams R., Elmer G. I. eta Lee N.H. (2009). Identification of candidate genes and gene networks specifically associated with analgesic tolerance to morphine. *J Neurosci.*;29:5295–307.
- Turner, B. M. (2011). Environmental sensing by chromatin: an epigenetic contribution to evolutionary change. *FEBS Lett.* 585, 2032-2040.
- Williamson C.M., Blake A., Thomas S., Beechey C.V., Hancock J., Cattanaach B.M. eta Peters J. (2013). MRC Harwell, Oxfordshire. World Wide Web Site - Mouse Imprinting Data and References - http://www.har.mrc.ac.uk/research/genomic_imprinting/

7. Eskerrak eta oharrak

Iraia Muñoa Hoyosek Eusko Jaurlaritzako laguntza predoktorala jaso du eta Marta Gianzo Citoresek Eusko Jaurlaritzako Zabalduz diru laguntza predoktorala. Bestalde, aipatu beharra dago lan honetan azaltzen diren emaitzak, Birminghameko Unibertsitatearekin hasitako kolaborazio lan baten ondorio direla.

Sistema kannabinoidearen funtzioa sagu oozitoen heltze-prozesuan, ernalketan eta enbrioia-aren garapenean

Totorikaguena, Lide; Olabarrieta, Esti; Agirregoitia, Ekaitz; Agirregoitia, Naiara; López-Cardona, Ángela Patricia.

Fisiologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Sarriena auzoa, Leioa-48940, Bizkaia.

lide.totorikaguena@ehu.eus

Laburpena

Gaur egun, gero eta gehiago dira ugalketa tekniken beharra dutenak haurdun geratu ahal izateko bai ugalkortasunarekin lotutako arazoak emendatu direlako baita familia ereduak aldatu direlako ere. Zorritzarrez, oraindik zailtasunak daude lagundutako ugaltze-tekniken bidez haurdunaldia lortzeko. Teknika horien artean badago berebiziko garrantzia duena oozitoa ernaldia izateko: oozitoen in vitro heltzea (IVM). Gutxi erabiltzen den teknika da oraindik bestelako tekniken emaitzen arrakastara heldu ez delako. Hala ere, hainbat emakumerentzat oso aukera aproposa izan liteke eta beste zenbaitentzat haurdunaldia lortzeko aukera bakarra. Oozitoaren heltze-prozesuan lagungarriak izan litezkeen ligando interesgarri batzuk kannabinoideak ditugu: haiek eragiten duten seinaleztapena eta oozitoen heltze-prozesua hasteko gertatu behar den seinaleztapena berdina delako. Horregatik, egokia ikusi dugu kannabinoideen erabilera terapeutikoa aztertzea IVM medioen eraginkortasuna hobetzeko. Horretarako, gure ikerketa taldeak sistema kannabinoidearen funtzioa aztertu du sagu oozitoen heltze-prozesuan, ernalketan eta enbrioia-aren garapenean eta baieztatu dugu haren parte-hartzea; ez hori bakarrik, izan ere, THC fitokannabinoideak oozitoen heltze-prozesua modulatzeko duela ikusi dugu.

Ugalkortasuna, oozitoen heltzea , IVM, sistema kannabinoidea, THC fitokannabinoidea

Abstract

Every year, the amount of couples using assisted reproduction techniques to get pregnant, due to the increase of fertility problems and the changes in family patterns, is increasing. Even though, the application of reproduction techniques still finds multiple difficulties. Among these techniques there is one of vital importance to ensure the fertilization of the oocyte: the in vitro maturation of oocytes (IVM). This technique is less used than others because of its poor success. However, it is a good option for several women and, in some cases, the only chance to get pregnant. Cannabinoids could be interesting ligands to improve oocyte maturation, as cannabinoid's molecular pathway is similar to the one by which oocyte's meiosis resumption is activated. Therefore, we consider the analysis of therapeutic use of cannabinoids useful to improve the efficiency of IVM media. That's why, our research team has studied the function of the cannabinoid system in the process of maturation, fertilization and embryo development in mice, and we have confirmed its participation. Beyond that, we have seen that in fact, the fitocannabinoid (THC) modulates oocyte maturation.

Fertility, oocyte maturation , IVM, cannabinoid system, THC cannabinoid

1. Sarrera eta motibazioa

Ugalkortasun zentroen estatistikak aztertuta, ikusten da gero eta gehiago direla oozitoen *in vitro* heltzea (IVM) jasateko balizko egoeran dauden pazienteak. Gure gizartean gero eta ohikoagoa da seme-alabak berandu izatea (Jose-Miller eta lank., 2007). Gero eta arruntagoa den amatasun eta aitatasun berantiar horrek zelula germinalen kalitatean eragina du, horregatik, zelula germinalen kalitatea hobetuko duen kanpo-laguntzaren beharra handituz doa. Laguntza berdina eska dezakete arruntagoak diren familia monoparentalek edota bikote homosexualek (Díez eta lank., 2007; Sánchez Morales, 2007) izan ere, normalean ugalkortasunik eza ez duten pertsonak izanda, IVM izango litzateke hormona jaso behar ez izateko aukerarik onena. Bestalde, obario polikistikoa deituriko gaitza jasateko probabilitatea % 3tik % 7ra igo da azken urteotan eta paziente horientzako hormonon estimulazioa kontraindikaturik dago (Eilertsen, 2012). Bukatzeko, azken hamarkadatan % 1,5 igo da ugaltze-aldian dauden emakumeen minbizia izateko arriskua (Rodríguez-Wallberg eta Oktay, 2014), hortaz, hormona tratamenduetarako denborarik ez dagoen kasuetarako ere IVM izango litzateke teknikarik egokiena. Baina, oraindik, IVM teknika berria da eta, duen arrakasta txikiagatik eta haren inguruan dagoen ezjakintasunagatik, gutxi erabiltzen da. Oozitoen *in vitro* heltzean, pazienteari hormonekin estimulatu gabeko obarioetatik edo estimulazio txikia jaso duten obarioetatik, heldu gabeko oozitoak erauzten zaizkio eta hazkuntza-medioetan heltzen dira.

Ugaztun emeean, oozitoak obulutegetiko folikuluetan sortzen dira. Enbrioi emeen obulutegetian, oozitoak lehenengo meiosiaren profasean daude geldituta eta seinale zehatzak jasotzen dituzten arte ez dira berpizten bigarren fase meiotikora heltzeko, meiosiko I. profasean etenda daude obulazioa gertatu arte. Oozito horiek besikula germinal bezala izendatzen dira (GV). Hainbat hormona jariatzen direnean eta oraindik ondo ezagutzen ez diren seinale zehatzak jasotzen dituztenean hasiko da meiosiaren berraktibazioa. Hor abiatuko da obulazioa, non oozito bakarra obulutegetitik irtengo den eta meiosiarekin jarraituko duen, lehenengo meiositik (MI) II. meiosiaren metafasera pasatuz (MII). Espermatozoide batek ernaldutako ahal izateko, oozitoa metafase IIan egon behar da eta, ernalketa gertatzen baldin bada, bukatuko da meiosia eta zigotoaren zatiketa mitotikoarekin enbrioiaren garapena abiatuko da (Rodríguez eta Farin 2003, Sun eta Nagai 2003).

Nahiz eta oraindik ezezagunak diren oozitoen heltze-prozesua pizten dituzten seinaleak, gero eta ziurtasun gehiago dago seinale horietako asko G proteinei loturiko hartzaileen (GPCR) menpe daudela (El Jouni eta lank., 2007) eta GPCR hartzaile horien aktibazioak edo inaktibazioak oozitoen heltze-prozesua modulatu dituzten seinalizazio ur jauziak pizten dituztela (Schindler, 2011). Beraz, gakoa da aurkitzea zeintzuk diren berpizkunde meiotikoa eragiten eta erregulatzen duten kanpo seinaleak, seinale horiek farmakoen bidez kontrolatuz gero, heltze-prozesua ere kontrolatu genezakeelako. Saguan deskribatu da meiosia geldirik mantenduko lukeen konstitutiboki aktiboa den GPCR-Gs den GPR3 hartzailea, hain zuzen. Beraz, hipotetiza daiteke meiosiaren heltze-prozesua indusituko lukeen hartzailearen bat egotea (GPCR-Gi dena) (Mehlmann, 2005) baina ez dira ondo ezagutzen zeintzuk izango liratekeen haien ligandoak. Oozitoaren heltze-prozesuan lagungarriak izan litezkeen ligando

interesgarri batzuk kannabinoideak izan daitezke: haiek eragiten duten seinaleztapena eta oozitoen heltze-prozesua hasteko gertatu behar den seinaleztapena berdina delako.

Fitokannabinoideak *Cannabis Sativa L.* landaretik eratorriak diren konposatu lipofilikoak dira. 60. hamarkadan hasi ziren indarra hartzen kannabinoideekin egindako ikerketak, kannabis landarearen Δ^9 -tetrahidrocannabinola (THC) purifikatu eta deskribatu zenean. THC da efektu bioaktiboen arduradun nagusia eta kannabinoide ugariena (Elsohly eta Slade, 2005). Barne-sistema kannabinoidea osatzen dute kannabinoide-hartzaileek, euren barne-estekatzaileek (barne-kannabinoideak) eta sintesi eta degradazio entzimek. Gorputzeko barne-kannabinoideen artean, N-arakidonoiletanolamina (anandamida; AEA) (Devane eta lank., 1992) eta 2-arakidonoilglizerola (2-AG) (Mechoulam eta lank., 1995) dira ezagunenak eta konposatu horiek CB1 eta CB2 hartzaileetara lotzen dira. CB1 eta CB2 hartzaileak G proteina inhibitzaileei loturiko hartzaileak dira eta mintz plasmatikoa zeharkatzen duten 7α -helizez osatuta daude. Egin diren ikerketa urriek frogatzen dute kannabinoideak heltze-prozesua modulatu lezaketela: alde batetik, anandamida (AEA) barne-kannabinoidearen kontzentrazioa emendatuz doa likido folikularrean giza oozitoen heltze-prozesuan (El-Talantini eta lank., 2009). Beste alde batetik, gure ikerketa-taldeak sistema kannabinoidea deskribatu du giza oozitoetan eta granulosestan meiosiaren berraktibazioan, era berean, oozitoen heltzean kannabinoide-hartzaileen lokalizazioan aldaketak daudela baieztatu dugu. (Peralta eta lank., 2011, Agirregoitia eta lank., 2015, Agirregoitia eta lank., 2016).

2. Arloko egoera eta helburuak

Sistema kannabinoidea ugalkortasunean inplikaturik dagoela ikusi da: gametogenesian, ernalketan, enbrioaren ezarpenean, plazentazioan, haurdunaldian eta erditzean (Battista, eta lank. 2008, Maccarrone 2009) eta sistema kannabinoidean parte hartzen duen makinaria guztia ugal-aparatuko organo, ehun eta zeluletan dagoela frogatu da. Gure taldeak, hala nola, sistema kannabinoidea bai giza oozitoetan eta granulosestan (Peralta eta lank., 2011, Agirregoitia, et al. 2015, Agirregoitia, eta lank. 2016) zein behien oozitoetan espresatzen dela deskribatu du (Lopez-Cardona eta lank., 2016) baina oraindik oso gutxi dakigu barne-sistema kannabinoidearen funtzioari, jardunari eta eraginari buruz oozitoen heltzean edota ernalketan. Horregatik, gizakiarekin lan egiteak dakartzan mugengatik gizakiekin ez ezik saguekin lan egiten jarraitu du taldeak, zehazki kannabinoide sintetikoek (HU-210) nola jarduten duten oozitoen heltzean eta zer nolako eragina duten ernalketan. Gainera, CB1 eta CB2 hartzaileentzako knockout (KO) saguen sorrerak kannabinoideen seinalizazioaren eraginari buruzko informazio gehiago lortzeko aukera eskaini digu.

Aurrekariak kontutan hartuta, gure ikerketa lanean aurrera egiteko, alde batetik, sistema kannabinoidearen fisiologia aztertzeko, CB1 eta CB2 hartzaileen faltak obulutegietan eta oozitoetan zer eragina duen ikustea izango da. Bestalde, analizatuko dugu zer nolako eragina duen THC fitokannabinoidearen inkubazioak oozitoen *in vitro* heltzean geroko ernalkuntza eta enbrioaren

garapena aztertuz, interesgarriagoa baita kannabinoide sintetikoekin baino kannabinoide naturalekin lan egitea etorkizunean gizakiekin entsegu klinikoak egiterako orduan.

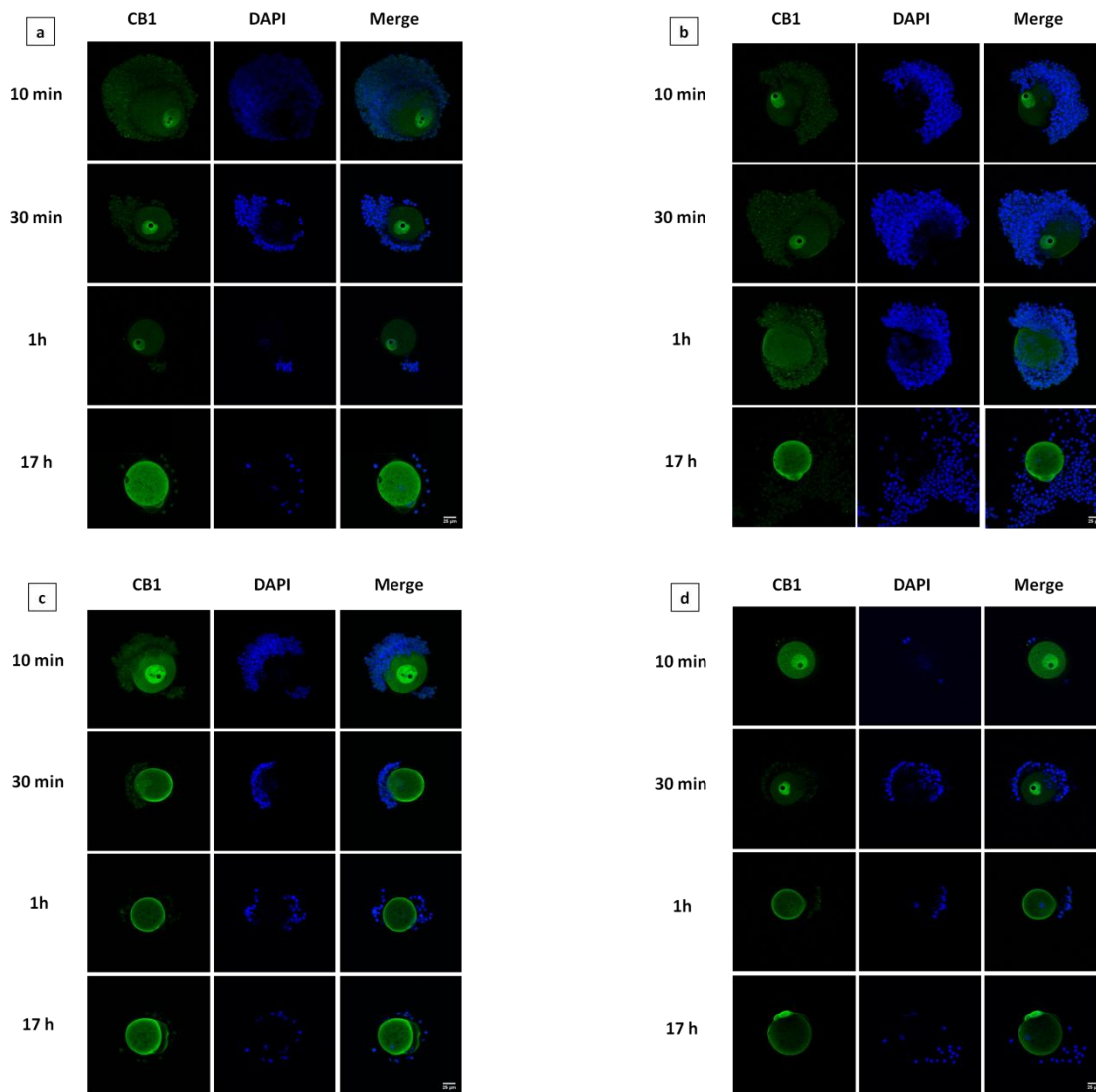
Helburu espezifikoak, beraz, hauek izango dira:

1. Heltze-medioan THC gehitzailearen CB1 hartzailearen adierazpenaren eta lokalizazioaren dinamika aztertzea saguen oozitoen *in vitro* heltze-prozesuaren etapa bakoitzean.
2. Oozitoen heltze-medioan THC fitokannabinoidea gehitzailearen, IVF geroko enbrio kopuruan eragina aztertu sagu-oozitoen *in vitro* madurazioan.
3. CB1 eta CB2 hartzaileen faltak duen eragina folikulogenesian.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

3.1 CB1 hartzailearen adierazpenaren eta lokalizazioaren dinamika saguen oozitoen *in vitro* heltze-prozesuan THCren presentzian

CB1 hartzailea saguen oozitoetan meiosiaren berraktibazioa gertatzen den bitartean presente dagoela frogatu da. Barne kannabinoideen rola ulertzeko oozitoen heltzean, CB1 hartzailearen presentzia aztertu da oozitoen heltze-prozesuan THC kannabinoidearekin *in vitro* heldu ondoren. López-Cardonak eta gure taldekideek (2016) behi emearen oozitoetan frogatu zuten HU-210 eta THC heltze-medioan gehitzailearen oozitoen madurazio nuklearraren abiadura aldatzen zela, GVtik MI fasera azkarrago pasatuz. Saguekin egindako esperimentuetan ere efektu berdina ondorioztatu dugu, hau da, kannabinoideek *in vitro* heldutako oozitoen meiosiaren berraktibazioa indultzatzen dutela (1. irudia).



1. Irudia. CB1 hartzailearen immunolokalizazioa sagu-oozitoen madurazio nuklearrean a) DMSOekin b) THC 1 μ M-eko kontzentrazioarekin c) THC 100 nM-eko kontzentrazioarekin eta d) THC 10 nM-eko kontzentrazioarekin hainbat denbora tartetan *in vitro* heltzean: 10 min, 30 min, 1h eta 17h. CB1 hartzailearen distribuzioa, berdez. Hoechst DNA-markatzailea, urdinez. Erreferentzia barra: 20 μ m.

Aztartzeko kanpo kannabinoideek oozitoen madurazio nuklearrean eraginik daukaten, oozitoak hainbat denbora tartetan fixatu genituen (10 minutu, 30 minutu, ordu 1 eta 17 ordu) THC goranzko kontzentrazioekin *in vitro* heldu ondoren. Oozitoen fase nuklearrak sailkatu ziren, hurrenez hurren, GV, MI eta MII faseak. 10 minututan oozito guztiak GV fasean zeuden eta *in vitro* madurazioa egin eta ordu batera, THC gehitu zen baldintza guztietan oozito gehienetan besikula germinala apurtuta zegoen kontrolarekin alderatuta (1. irudia). Hala ere, desberdintasunak agertzen ziren tratamendu bakoitzean eta ikusi zen THC 100 nM kontzentrazioarekin arinago irteten zela oozitoa GV-tik, 30 minututan jada ez zelako ikusten besikula germinala (1. irudia c), nahiz eta, esan bezala, gainontzeko kontzentrazioetan -THC 1 μ M-eko kontzentrazioarekin (1. irudia b) eta THC 10 nM-eko kontzentrazioarekin (1. irudia d)- kontrola (1.irudia a) baino lehen ateratzen ziren GV-tik. Beraz, esan

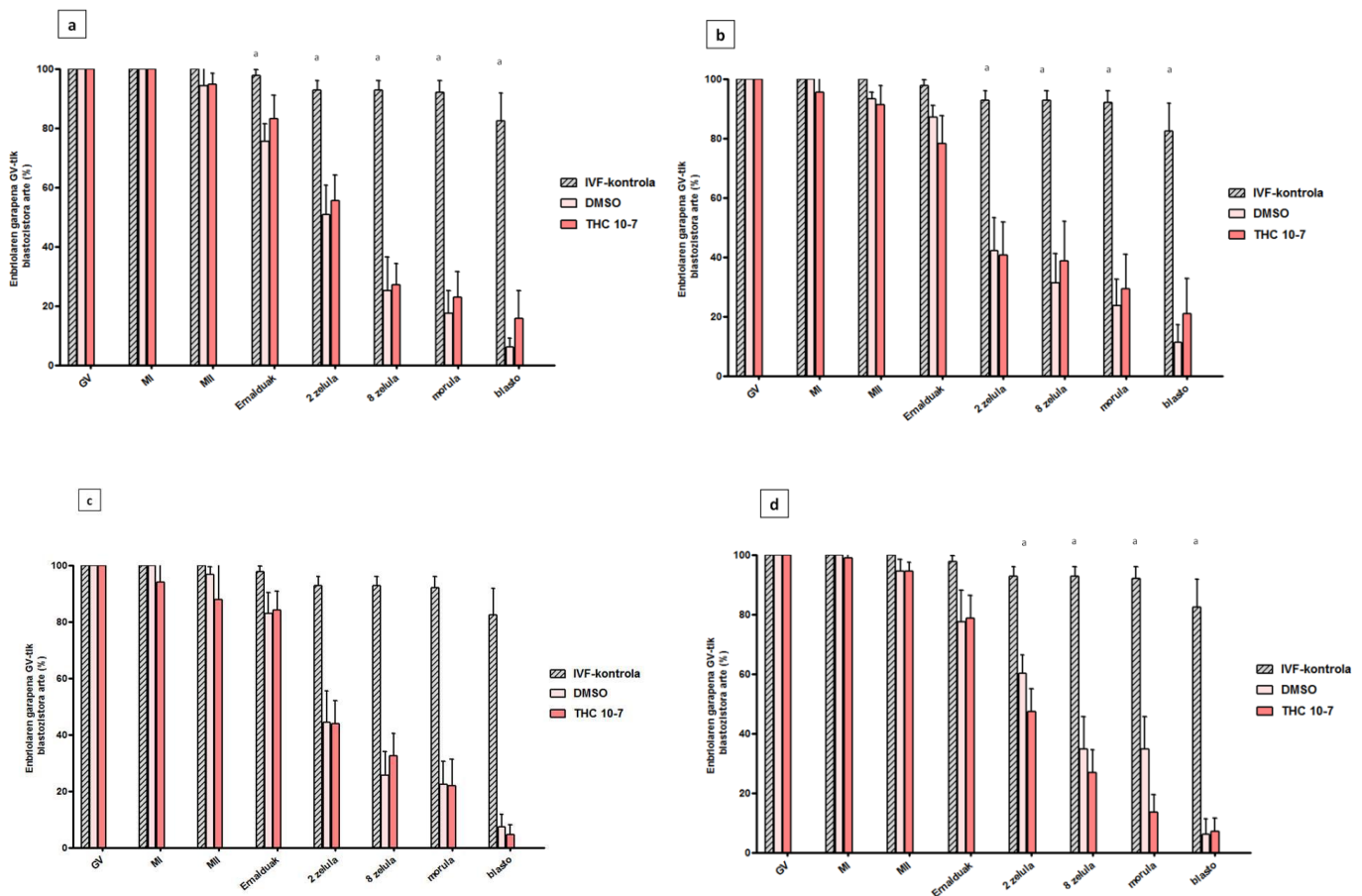
daiteke THCK laguntzen diola oozitoari meiosiaren geldituetik irteten eta 100 nM-ko kontzentrazioa izango da optimoa *in vitro* heltzen diren oozitoen meiosiaren berraktibaziorako.

3.2 THC fitokannabinoidearen eragina oozitoen *in vitro* heltzean geroko *in vitro* ernalkuntza eta enbrioien garapena aztertuz

Ikusita THC fitokannabinoidearen 100 nM (edo 10⁻⁷) kontzentrazioa erabilita oozitoen heltze-prozesuan meiosis azkarrago berraktibatzen zela, THC 100nM-ekin kontaktuan egon diren oozitoen heltze-tasa ikusi zen. Oozito horiekin *in vitro* ernalkuntza egitean, heltze-fase bakoitzera heldu ziren oozitoak eta enbrioien garapen goiztiarreko fase desberdinetara heldu zirenak kuantifikatu ziren (2. irudia).

Saguetan, *in vivo* heldu diren oozitoen heltze-fase zein IVF geroko enbrio-fase guztietan % 80tik gora mantendu dira eta horrek erakusten du *in vitro* ernalkuntza ondo eginda dagoela (2. irudia). Oozitoak *in vivo* heltzean emaitzak askoz hobeak direla ikus daiteke, blastozistora enbrio gehienak heltzen direlako baina, *in vitro* heldu diren oozitoetan, ernaltu diren zelulen beharakada eta blastozistoen kopuru urria nabarmenak dira, espero bezala (Epigg J.J. eta lank. 1992). Hala ere, adierazgarria ez izan arren, THCKekin (100 nM) heldutako *wild type* saguetan gorakada bat ikusi zen ernaldutako zeluletan fitokannabinoiderik gabe inkubatutako oozitoekin alderatuta (2. irudia a) eta, blastozistora heltzen direnen portzentajea baxua izan arren, THCKekin *in vitro* heldutakoetan handiagoa da THC gabe inkubatutakoekin konparatuz gero (2. irudia a). CB1 hartzailearentzako *knockout* (*Cnr1*^{-/-}) saguen oozitoekin egindako inkubazioetan aldiz, THCKekin tratatu direnen artean, askoz gutxiago heldu dira blastora izatera *wild type* motako sagu oozitoekin alderatuta (2. irudia b). Baliteke horrek adieraztea CB1 hartzailea falta denean arazoren bat egon litekeela oozitoen heltzean, eta beraz, madurazio nuklearra ez dela efizientea izan, ez direlako ondo pasatu MII fasera ernaltuak izan daitezen. Hala ere, hipotesi hau aztertu beharko litzateke.

Beste alde batetik, CB2 hartzailearentzako *knockout* (*Cnr2*^{-/-}) saguen oozitoekin egindako inkubazioetan (2.irudia c), THCKekin inkubatutakoetatik oso gutxi heldu dira blastozistora. Pentsa genezake, CB2 hartzailea garrantzitsua dela THC fitokannabinoideak lagundu dezan enbrioien garapenean, CB1 hartzailearekiko eta CB2 hartzailearekiko *knockout* (*Cnr1*^{-/-}*Cnr2*^{-/-}) saguen oozitoak erabili direnean ere, THC gehitu denean heltze-mediara ez delako eraginik egon *in vitro* ernalkuntzan (2.irudia d).



2. irudia. a) *wild type*, b) *Cnr1^{-/-}*, c) *Cnr2^{-/-}* eta d) *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* genotipoa duten saguen oozitoak THC-ren presentzian (10^{-7} M) *in vitro* heldu ondoren lortzen diren oozito kopurua: besikula germinala (GV), metafase I (MI), metafase II (MII); eta, IVF egin ondorengo enbrioi-garapenaren etapa bakoitzeko kopurua: ernaldutako oozitoa (ernaldutako), 2 zelulako enbrioia (2 zelula), 8 zelulako enbrioia (8 zelula), morula eta blastozistoa (blasto). *In vivo* heldutako obozitoak erabili dira IVF kontrolaren enbrioiaren garapena ikusteko (marradun barrak). *In vitro* heldutako obozitoen kontrola THC gehitu gabe baina garraiatzailea (DMSO) gehituta egin da (barra arrosak). Azkenik, THC 10^{-7} M-eko kontzentrazioarekin *in vitro* inkubatu diren oozitoak agertzen dira (barra gorriak). n=5. Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a): p<0.001 izanik.

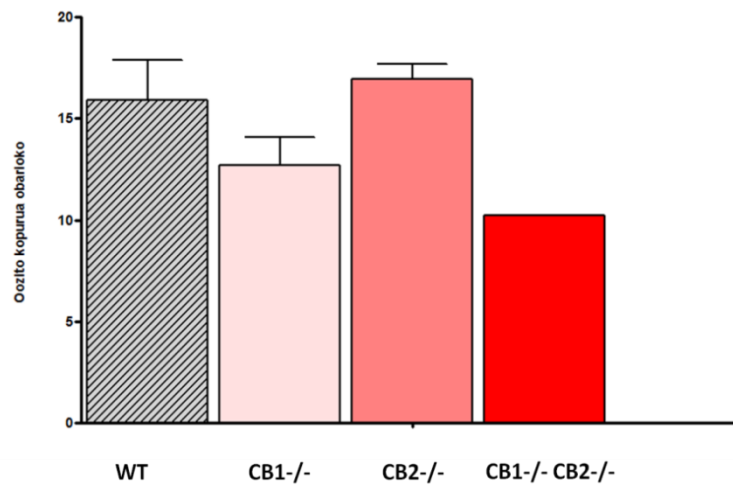
Esanguratsua ez den arren, *wild type* saguetan, THCekin inkubatutako oozitoetan tendentzia bat dago blastozistora heltzen direnen portzentajea emendatzeko orduan eta horrek esperimendu gehiago egitea eskatzen digu, baieztatzeko tendentzia hori zoriaren eraginez izan daitekeen edo benetan THC fitokannabinoideak kontzentrazio horretan paper garrantzitsua duen.

3.3 CB1 eta CB2 kannabinoide hartzaileen faltaren eragina folikulogenesian

Jakinda CB1 hartzaileak eta CB2 hartzaileak oozitoen heltze-prozesuan parte hartzen dutela, oozitoen sorreran edota folikulogenesian ere eragina badaukaten frogatu nahi izan dugu.

IVM zein IVF teknikan oozitoak eskuratzeko obuluak orratz batekin urratzen dira heltze-medioetan inkubatzeko jarri aurretik. Baina sagu anduiaren arabera eskuratzeko ziren oozitoen kopurua

oso desberdina zen eta CB1 hartzailea falta zitzaien sagu anduietan oozitoen batez bestekoa jaisteko tendentzia ikusi zen (3. irudia)



3. irudia. Genotipo desberdineko saguen oozito kopurua obarioko. *Wild type* sagu anduia (marradun barra), *Cnr1*^{-/-}, (barra arrosa) *Cnr2*^{-/-} (barra gorri argia) eta *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-} (barra gorria). n=16.

Nahiz eta oozitoen kopurua CB2 hartzailearentzako *knockout* saguena altuagoa izan *wild type* motako saguekin alderatuz, benetan erreparatzen badiogu oozitoen *in vitro* ernalkuntza egiteko behar diren oozitoen kalitateari, oozito “on” edo maduragarrien kopurua estatistikoki adierazgarriagoa da *wild type* motako saguetan CB1 hartzailea falta zaien sagu anduiekin alderatuta (taula 1). Esan daiteke, hortaz, CB1 hartzaileak oozitoen folikulogenesia parte hartzen duela eta CB2 hartzaileak ere lagundu zezakeela, bi hartzaileak falta diren saguetan bai oozito kopuru totala bai kalitate oneko oozitoen kopurua urriagoa baita (taula 1).

Taula 1. Genotipo desberdineko saguen mota desberdineko oozito kopurua obarioko. *Wild type* sagu anduia (marradun barra), *CB1* edo *Cnr1*^{-/-}, (barra zuria) *CB2* edo *Cnr2*^{-/-} (barra arrosa) eta *KOKO* edo *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-} (barra gorria). n=16. Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a,b,c): p<0.05 izanik.

	Konpaktatuak	Biluziak	Maduragarriak	Hilak
WT	3,58 ± 0,63 ^{ab}	3,06 ± 0,39	10,80 ± 1,19 ^a	2,50 ± 0,00 ^a
CB1	4,67 ± 0,94 ^b	3,31 ± 0,53	7,42 ± 1,05 ^b	0,63 ± 0,13 ^b
CB2	4,17 ± 0,22 ^b	2,61 ± 0,28	9,67 ± 0,87 ^{ab}	0,75 ± 0,09 ^b
KOKO	1,5 ± 0,09 ^a	2,0 ± 0,0	5,50 ± 0,27 ^b	1,25 ± 0,18 ^c

4. Ondorioak

Egindako ikerketetan ikusi da sistema kannabinoideak funtzio garrantzitsua betetzen duela sagu oozitoen heltze-prozesuan, ernalketan eta enbrioaren garapenean eta, zehazki, THC fitokannabinoideak baduela eragina oozitoen heltze-prozesuan.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunerako kannabinoideen erabilera terapeutikoa aztertzen jarraitzea interesgarria litzateke, besteak beste, IVM medioetan osagai gisa erabilita. Azpimarratu behar da oozitoen *in vitro* heltzea askoz alternatiba onuragarriagoa, erosoagoa eta arrisku gutxiagokoa izango litzatekeela ugalkortasun klinika batera joan behar den edozein pazienterentzako, obarioen estimulaziorako beharrezkoak diren farmakoak hartzea ekidingo litzatekeelako edo behintzat dosia murriztuko litzatekeelako (Söderström-Anttila, et al. 2005). Modu honetan, ugalketan pausorik arriskutsuena dena saihestuko litzateke, hormona-hartzeak desgaste handia eragiten duelako pazientearengan eta albo-ontorio larriak dakartzalako (Cousineau and Domar 2007). Gainera, ziklo bakoitzeko kostu ekonomikoa ere murriztuko litzateke (Söderström-Anttila, et al. 2005).

6. Erreferentziak

- Agirregoitia, E, Ibarra-Lecue I, Totorikaguena L, Mendoza R, Expósito A, Matorras R, Urigüen L, eta Agirregoitia N. (2015). Dynamics of expression and localization of the cannabinoid system in granulosa cells during oocyte nuclear maturation. *Fertility Sterility* 104 753-760.
- Agirregoitia, E, Totorikaguena L, Exposito A, Mendoza R, Matorras R, eta Agirregoitia N (2016). Dynamic of expression and localization of cannabinoid-degrading enzymes FAAH and MGLL in relation to CB1 during meiotic maturation of human oocytes. *Cell Tissue Res.*
- Battista, N, Rapino C, Di Tommaso M, Bari M, Pasquariello N, eta Maccarrone M (2008). Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Mol Cell Endocrinol* 286 S17-S23.
- Cousineau, TM, eta AD Domar (2007). Psychological impact of infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 21 293-308.
- Devane, WA, L Hanus, A Breuer, RG Pertwee, LA Stevenson, G Griffin, D Gibson, A Mandelbaum, A Etinger, eta R Mechoulam (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258 1946-1949.
- Díez, Marta; Jiménez, Irene; Morgado, Beatriz; (2007). Maternidad en solitario por elección en España. IX Congreso Español de Sociología. Grupo de Trabajo 03. Barcelona
- Eilerstsen TB, Vanky E, Carlsen SM. (2012). Increased prevalence of diabetes and polycystic ovary syndrome in women with history of preterm birth: a case-control study. *BJOG*;119(3):266-75.
- Elsohly MA, Slade D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Science*.;78(5):539-48. Review.
- Eppig J.J., Schroeder A.C. & O'Brien M.J. (1992) Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *Journal of reproduction and fertility*, 95 (1), 119-27
- El-Jouni W., Haun S., Hodeify R., Hosein Walker A., Machaca K. (2007) Vesicular traffic at the cell membrane regulates oocyte meiotic arrest. *Development*; 134 (18):3307-15.
- El-Talatini MR, Taylor AH, Elson JC, Brown L, Davidson AC & Konje JC (2009a) Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS ONE* 4 e4579.
- López-Cardona, M J Sánchez-Calabuig, P Beltran-Breña N Agirregoitia, D Rizos, E Agirregoitia and A Gutierrez-Adán (2016). Exocannabinoids effect on in vitro bovine oocyte maturation via activation of AKT and ERK1/2. *Society for Reproduction and Fertility*
- Maccarrone, M. (2009). Endocannabinoids: friends and foes of reproduction. *Progress in lipid research* 48 344-354

- Mechoulam, R, S Ben-Shabat, L Hanus, M Ligumsky, NE Kaminski, AR Schatz, A Gopher, S Almog, BR Martin, and DR Compton (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical pharmacology* 50 83-90.
- Mehlmann LM. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* , 130 (6):791-9.
- Peralta L, Agirregoitia E, Mendoza R, Exposito A, Casis L, Matorras R eta Agirregoitia N (2011). Expression and localization of cannabinoid receptors in human immature oocytes and unfertilized metaphase-II oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 23 372–379 .
- Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida IA y FIV/ICSI 2014. www.registrosef.com
- Rodriguez, KF, and CE Farin (2003). Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reproduction, Fertility and Development* 16 55-67.
- Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. (2014). Fertility preservation during cancer treatment: clinical guidelines. *Cancer Manag Res.* 2014; 6: 105–117.
- Sánchez Morales, M^a.R. (2007) Los impactos de la biotecnología humana sobre las familias. Tendencias de evolución en el nuevo siglo. En:Escenarios del 481nuevo siglo. Noveno Foro sobre tendencias sociales, pp. 127-150. Madrid, Editorial Sistema.
- Schindler K. (2011). Results Probl Cell Differ 2011; 53:309-41. Protein kinases and protein phosphatases that regulate meiotic maturation in mouse oocytes. *Results Probl Cell Differ*; 53:309-41.
- Söderström-Anttila, V, S Mäkinen, T Tuuri, and A-M Suikkari (2005). Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients. *Hum Reprod* 20 1534-1540.
- Sun, Q-Y, and T Nagai (2003). Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development* 49 347-359.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau UPV/EHUko Medikuntza eta Erizaintzako Fakultateko Fisiologia Sailean burutu da. Euskal Herriko Unibertsitateak emandako beka bati esker egiten ari den tesi batetik eratorritako aurretiazko emaitzak dira.

Ikertaldea hainbat alorreko ikertzaileek osatzen dute. Ikertaldea osatzen duen kideetarik bat Lide Totorikaguena doktoretza aurreko ikaslea da eta UPV/EHUko Medikuntza eta Erizaintza Fakultateko Fisiologia Saileko ikerketa-laborategi batean dabil 2012. urtetik aurrera. 2013. urtean biologian graduatu zen Euskal Herriko Unibertsitatean eta ikasketen tarte horretan, 2011n zehazki, Liejako (Belgika) Unibertsitateko laborategi baten aritu zen ikertzen, Centre of Protein Engineering / Centre d'Ingénierie des Proteines (CIP) departamentuan hain zuzen. 2014. urtean Ikerketa Biomedikoa masterra amaitu eta Ekaitz Agirregoitia eta Naiara Agirregoitia doktoreen zuzendaritzapean dihardu tesia egiten. Lan honetan lagundu duten beste ikerlariak, besteak beste, Esti Olabarrieta doktoregaia, Ángela Patricia López-Cardona Doktorea, Ekaitz Agirregoitia Doktorea eta Naiara Agirregoitia Doktorea dira.