IV. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

Kongresuko artikulu-bilduma

OSASUN ZIENTZIAK

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11
GASTEIZ, EUSKAL HERRIA

ueu

(c) 2021 Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)
Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Nafarroako Unibertsitate Publikoa (NUP), Mondragon Unibertsitatea (MU), Deustuko Unibertsitatea (UD), Nafarroako Unibertsitatea (UNAV), Eusko Jaurlaritza, Udalbiltza, Arabako Foru Aldundia eta Vitoria-Gasteizko Udala laguntzaileak izan dira edizio honetan.
(c) Egileak

Editoreak:
Olatz Arbelaitz, Ainhoa Latatu, Miren Josu Omaetxebarria, Blanca Urgell

Artikuluak *Creative Commons* Aitortu-PartekatuBerdin 3.0 lizentziapean daude

ISBNa: 978-84-8438-785-5 Lan osorako
ISBNa: 978-84-8438-789-3 4. liburukia
DOI: https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.2021.04

Harremanetarako: argitalpenak@ueu.eus
UEU. Erribera 14 1 D. 48005 Bilbo. Tel.: 94 679 05 46

OSASUN ZIENTZIAK

Aurkibidea

Hitzaurrea.....7

Batzordeak, laguntzaileak eta hizlariak.....9

MLb-LDLr: LDL hartzaile aldaeren eragina aurresateko ikasketa automatikoko eredua, *Asier Larrea Sebal, Unai Galicia, Shifa Jebari, Rocio Alonso, Asier Benito, Kepa Uribe, Sonia Arrasate, Humberto Gonzalez* eta *Cesar Martin*.....13

Heltze egoeraren araberako hazkunde-lesio motak goi-mailako futbolari gazteetan, *Xabier Monasterio, Susana Maria Gil, Iraia Bidaurrazaga-Letona, Jose Antonio Lekue, Juan Santisteban, Gontzal Diaz-Beitia, Dae-Jin Lee, Lore Zumeta, Imanol Martin-Garetxana, Eder Bikandi* eta *Jon Larruskain*.....21

Morfinak eragindako aldaketa epigenetikoen azterketan *in vitro* eta *in vivo*, *Manu Araolaza, Iraia Muñoa-Hoyos, Jon Irazusta* eta *Nerea Subirán*.....29

Emakumeekiko sexismo maila osasun arloko profesional eta ikasleengan: lehen hurbilketa, *Olatz Goñi-Balentziaga, Jone Aliri, Sara Prego-Jimenez, Eva Pereda-Pereda, Joana Pérez-Tejada* eta *Ainitze Labaka*.....37

Aurresan ezin den Estres Kroniko Moderatua (Chronic Unpredictable Mild Stress, CUMS): depresioaren animalia-eredua, *Ines Erkizia, Jorge E. Ortega* eta *Igor Horrillo*.....45

Paziente eskizofreniko eta kontrolen garun kortexean D2, CB1 eta mGlu2 hartzaileen espresio aldakortasunaren ikerketa , *Jon De la Cuesta Barrutia Jon, Olga Peñagarikano, Luis Felipe Callado, José Javier Meana, Alfredo Ramos Miguel eta Amaia Maite Erdozain*.....53

Gernutik lortutako zelula ama mesenkimalak (hUSC) pseudohipoparatiroidismoaren (PHP) terapia geniko ez-biralerako, *Yerai Vado, Jose Luis Pedraz, Guiomar Perez de Nanclares* eta *Jon Zarate*.....61

Giza garun postmortemeko nukleo neuronalen eta ez-neuronalen banaketa, *Oihane Martinez-Peula, Alfredo Ramos Miguel, Benito Morentin, Luis Felipe Callado, José Javier Meana* eta *Guadalupe Rivero* 69

Haur eta nerabeen elikadura emozionala bultzatzen duten guraso eta haurren ezaugarriak: berrikuspen sistematikoa, *Jone Galdos* eta *Eva Pereda*.....77

SLUG genearen erregulazioa eta epitelio-mesenkima trantsizioa E2F faktoreen eraginpean daude minbiziaren testuinguruan, *Ainhoa Eriz, Gartze Mentxaka, Ainhoa Iglesias-Ara, Jone Mitxelena* eta *Ana Mª Zubiaga* 85

Ingurumen zaratak eraginik al du 11 urteko umeen loaren kalitatean?, *Ane Arregi Otxotorena, Nerea Lertxundi, Gonzalo Garcia-Bauqero, Oscar Vegas* eta *Aitana Lertxundi*.....93

Hiriko gune berdeak eta osasunean duten eragina, *Asier Anabitarte*.....101

RNA zirkular berrien bilaketak atzeranzko moztu-itsastearen kontserbazio altua frogatu du ardian, *Endika Varela-Martínez, Martin Bilbao-Arribas, Giulia Corsi, Christian Anthon, Naiara Abendaño, Jan Gorodkin* eta *Begoña M. Jugo*.....107

Endometriosia eta ezaugarri antropometriko eta menstrualak: oinarri genetiko amankomunaren bila, *Aiara Garitazelaia, Jose Ramon Bilbao, Nora Fernandez-Jimenez* eta *Iraia García-Santisteban*.....115

Gibeleko endotelioaren konbertasen eginkizuna gibeleko metastasian, *Ander Martin San Sebastian* eta *Patricia Garcia-Gallastegui*.....123

EAEko emakumeek modu larrian ospitaleratzeko aukera handiagoa zuten zenbait bihotz-hodietako gaixotasunen kasuan 2016-2018 urteen artean.n, *Ainitze Labaka, Josune Zubeldia-Etxeberria, Maider Ugartemendia-Yerobi, Udane Elordi-Guenaga, Nagore Zinkunegi-Zubizarreta* eta *Beatriz Pereda-Goikoetxea*.....129

CB1 Hartzaile kanabinoidearen azalpena saguaren garuneko zelula oligodendroglialetan, *Andrea Manterola, Ana Bernal-Chico* eta *Susana Mato*.....135

Hezkuntza Nutrizionala: Gluten Gabeko Dieta Segurua, Orekatua eta Inklusiboa, *Maialen Vázquez-Polo, Maialen Diez, Gesala Perez-Junkera, Idoia Larretxi, Itziar Txurruka, Arrate Lasa, Olaia Martinez, María Ángeles Bustamante, Jesús Salmerón, Virginia Navarro*.....143

RNAren N^6-metiladenosina (m^6A) modifikazioren rol berriak hesteko inflamazioaren garapenean eta tratamenduan, *Ane Olazagoitia-Garmendia, Maialen Sebastian-DelaCruz, Iraia Garcia-Santisteban, Luis Manuel Mendoza, Alain Huerta, Iñaki Irastorza, Jose Antonio Rodriguez, Jose Ramon Bilbao* eta *Ainara Castellanos-Rubio*.....151

Omega-3 gantz-azidoen propietate onuragarriak, *Maitane Serrano, Leire Lekunberri, Edgar Soria-Gomez, Itziar Bonilla-Del Rio, Amaia Mimenza, Jon Egaña-Huguet, Ilazki Anaut-Lusar, Itziar Terradillos, Svein Achicallende, Nagore Puente, Inmaculada Gerrikagoitia, Izaskun Elezgarai, Irantzu Rico-Barrio* eta *Pedro Grandes*.....159

Erizaintzako ikasleen heziketaren eragina elikadura-sinesmen eta elikadura-aukeraketan, *Ainara San Juan, María del Mar Lamas, Julia Fernández, Silvia Caballero, Irati Ayesta* eta *Leyre Gravina*.....167

Garun traumatismoen epe luzeko eragina hipokanpoko CB_1 hartzailean, *Itziar Bonilla-Del Rio, Jon Egaña-Huguet, Svein Achicallende, Edgar Soria-Gomez, Almudena Ramos, Itziar Terradillos, Amaia Mimenza, Maitane Serrano, Leire Lekunberri, Ilazki Anaut-Lusar, Ianire Buceta, Irantzu Rico-Barrio, Inmaculada Gerrikagoitia, Katie Jay Neale, Cristina Pinar, Juan Triviño-Paredes, Patrick C Nahirney, Brian R Christie, Nagore Puente, Izaskun Elezgarai* eta *Pedro Grandes*.....177

Proteinetan oinarritutako biomaterialen biobateragarritasunaren eta egokitasunaren azterketa kornearako ordezkoen edo matrizeen hautagai potentzial gisa, *Cristina Romo-Valera, Jon Arluzea* eta *Noelia Andollo*.....185

Nutrizio irakasgaiaren eragina Erizaintzako ikasleen elikadura-lehentasun eta -ezinikusietan, *Irati Ayesta, Silvia Caballero, Julia Fernández, María del Mar Lamas, Ainara San Juan* eta *Leyre Gravina*.....193

Hipokanpoaren mendeko portaeren eta endokannabinoide sistemaren aldaketak loki-lobuluko epilepsiaren animalia-eredu batean, *Ilazki Anaut, Jon Egaña, Itziar Terradillos, Edgar Soria, Leire Lekunberri, Sonia Maria Gómez, Maitane Serrano, Itziar Bonilla, Amaia Mimenza, Svein Achicallende, Nagore Puente, Almudena Ramos, Ianire Buceta, Irantzu Rico, Inmaculada Gerrikagoitia, Izaskun Elezgarai* eta *Pedro Grandes*.....203

Nerabezaroko gehiegizko alkohol kontsumoaren kalte iraunkorrak C57BL/6J sagu eme helduetan, *Leire Lekunberri, Maitane Serrano, Edgar Soria-Gomez, Itziar Bonilla-Del Río, Ilazki Anaut-Lusar, Amaia Mimenza, Svein Achicallende, Jon Egaña-Huguet, Almudena Ramos, Itziar Terradillos, Inmaculada Gerrikagoitia, Izaskun Elezgarai, Nagore Puente, Irantzu Rico-Barrio* eta *Pedro Grandes*.....211

Erizaintza euskaraz: jarduteko edota ikasteko aukera eta oztopoen azterketa, *Garbiñe Elizegi, Izaskun Elezgarai* eta *Naroa Anabitarte*.....219

1 motako kannabinoide hartzaile (CB_1) astroglialaren adierazpena loki-lobuloko epilepsia ereduan, *Amaia Mimenza, Itziar Bonilla-Del Rio, Jon Egaña-Huguet, Ilazki Anaut-Lusar, Maitane Serrano, Leire Lekunberri, Inmaculada Gerrikagoitia, Izaskun Elezgarai, Nagore Puente* eta *Pedro Grandes*.....227

IKERGAZTE 2021
Nazioarteko Ikerketa Euskaraz
HITZAURREA

Denbora laburrean UEUk 50 urte beteko ditu eta, sortu zenetik, euskal komunitate zientifiko-intelektuala trinkotzea izan da UEUk izan duen helburu garrantzitsuenetako bat. Elkarren berri izatea eta elkarrekin ekitea ezinbestekoa da ezagutzak aurrera egin dezan, are gehiago gure kasuan, ikerketan dihardugun pertsona euskaldunok, gure lanaren parterik handiena atzerriko hizkuntzetan egitera behartuta egonik, elkarren berri izatea zaila denean. Ildo horretatik, UEUk hainbat arlotako aditu, aritu eta ikertzaileak biltzen ditu zenbait ekimenetan hainbat ezagutza-arloren inguruan: Informatikari Euskaldunen Bilkurak (11 edizio), Historialari Euskaldunen Topaketak (5 edizio), Hizkuntzalari Euskaldunen Topaketak (4 edizio), Matematikari Euskaldunen Bilkura (4 edizio), Osasun Zientzietako topaketak (3 edizio) eta Natur Zientzietako ikertzaileen bilkurak (4 edizio), besteak beste, horren adibide argiak dira.

Bilkura horiei guztiei IkerGazte kongresua gehitu zitzaien 2015eko maiatzean. Ikerketa, euskara, gazteak eta diziplinartekotasuna izan ziren bilgune haren osagai nagusiak. Durangon hasitako bideak jarraipena izan zuen 2017an Iruñean eta 2019an Baionan. Aurtengoan Gasteiz dugu topagune, ekainaren 9, 10 eta 11n, Vitoria/Gasteizko Europa Biltzar Jauregian 180 ikertzailetik gora bilduko gara. Laugarren edizio honek erakusten digu 2015ean ziurgabetasun handiz hasitako bideak ikertzaile euskaldunok biltzeko dugun premiak eta beharrak irauten duela. Beste behin ere, ikergazteen eskutik jasotako ekarpen kopuruak IkerGazte behar-beharrezkoa dela ematen digu aditzera.

“IkerGazte2021: Nazioarteko Ikerketa Euskaraz” goiburu duen kongresuaren artikulu-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 aukera izan gabe. Kongresu honen helburua komunitate-zientifiko euskalduneko ikertzaileak bildu eta elkarren berri izatea da, arlo guztiak jorratuz; hasi humanitateetatik eta gizarte-zientzietatik, eta zientzia zehatz, natur zientzia, ingeniaritza, arkitektura eta osasun-arloetako gaietaraino. Nazioartean ingelesez argitaratu ohi diren lanak euskaraz ere argitaratzeko eta zabaltzeko aukeraren aldeko apustua da.

Honelako kongresu bat aurrera ateratzeko ezinbestekoa da bai banakoen lan eskerga, baita erakunde publiko eta pribatu ugariren laguntza ere: UEUko lantaldetik hasita, UEUkideak, eta bereziki Arabako kideak, IkerGazteren Batzorde Zientifikoko ikertzaileak, babesleak, laguntzaileak (unibertsitateak, ikerketa-taldeak zein aldizkari zientifikoak) bai eta komunikabideak ere. Bestalde, Gasteizko Udalak eta Udalbiltzak sariak babestu dituzte. Horrez gain, hainbat pertsonak eta komunikabidek erakutsitako atxikimendua ere aipatu nahi dugu. Esker mila guztiei.

Laugarren edizioa du aurtengoan IkerGaztek, eta COVID-19a dela-eta sortutako osasun-krisiari loturik antolatu behar izan dugu. Osasun-neurri zorrotzek baldintzatuta, egitaraua zertxobait moldatu behar izan dugu, aldibereko ekintza paraleloak murriztuz. Hala ere, egitaraua interesgarria eta erakargarria da, arlo guztietako ekarpenak biltzen dituena. Inoiz baino komunikazio gehiago jaso ditugu, 58 ahozko aurkezpen eta 92 poster moduko aurkezpenetan aurkeztuko direnak. Guztira 150 komunikazio.

Hasieran, 163 komunikazio jaso baziren ere, gainbegiratze-prozesua gainditu eta kongresuan parte hartzeko ikertzaileen baieztapena jaso duten 150 lanak daude bilduma honetan.

Jakintza-arloei dagokienez hauek dira zenbakiak:

Giza Zientziak eta Artea	18
Gizarte Zientziak eta Zuzenbidea	39
Zientzia Zehatzak eta Natur Zientziak	42
Ingeniaritza eta Arkitektura	24
Osasun Zientziak	27

Ikertzaileen filiazioari dagokionez, aurreko edizioetako joera mantentzen da. Horrela, bost liburu hauetan jasotako komunikazioetan Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) da maizen aipatu dena, 74 ekarpenekin. Ondoren Mondragon Unibertsitatea da ugariena, 11 ekarpenekin, aurreko edizioetako ekarpen kopurua bikoiztuz. Nafarroako Unibertsitate Publikoa eta Nafarroako Unibertsitatetik 4na ekarpen jaso ditugu edizio honetan. Deustuko Unibertsitatetik komunikazio bat jaso da. Beste ekarpen batzuk honako unibertsitate hauetatik jaso dira: Bartzelonako Unibertsitate Autonomoa, Bordeleko Unibertsitatea, University of Illinois at Urbana-Chamapaign, Vic-eko Unibertsitatea eta Granadako Unibertsitatea.

Unibertsitateei atxikitako ikerketa-zentroak eta taldeak aipatzen dira ekarpenetako askotan, beherago aipatzen diren ikertalde laguntzaileez gain, honakoak aurki ditzakegu: PIE, UNAV-Cima, UNAV-Tecnun, BioDonostia, BioAraba eta BioCruces Osasun Ikerketa Institutuak, BCMaterials, Polymat, CSIC, Ikerlan, Achucarro Basque Center for Neuroscience edo CIC-energyGUNE agertzen dira besteak beste.

Beste unibertsitate, eragile eta erakundeei dagokienez, hauek dira lankidetzan aipatzen diren beste batzuk: Athletic Club, Suediako Naturhistoriska Riksmuseet, Burgosko Unibertsitatea, AOTECH, Coruñako Unibertsitatea, Vigoko Unibertsitatea, Monterreyko Teknologia eta Goi-mailako Ikasketen Institutua (Mexiko) edo Kopenhageko Unibertsitatea beste batzuen artean.

Urte zaila izan da elkarrekin egitasmoak abiatzeko eta hala ere lortu dugu. Bi urtean behin errepikatzeari eutsiko diogu. Beraz, adi, Ikergazte2023 etorriko da-eta!

Olatz Arbelaitz, Blanca Urgell, Ainhoa Latatu eta Miren Josu Omaetxebarria

BATZORDEAK, LAGUNTZAILEAK ETA HIZLARIAK

Batzorde Zientifikoa

Batzordeburua:	Olatz Arbelaitz (UPV/EHU, UEU) eta Blanca Urgell (UPV/EHU)
Koordinatzailea:	Miren Josu Omaetxebarria (UPV/EHU, UEU)
Idazkaria:	Ainhoa Latatu (UEU)

Giza Zientziak eta Artea

Itziar Aduriz (Bartzelonako Unibertsitatea, UEU)
Agustin Arrieta (UPV/EHU)
Haizea Barcenilla (UPV/EHU)
K. Josu Bijuesca (UD)
Urtzi Etxeberria (CNRS-IKER Euskara eta Euskal Testuen Ikerketa Zentroa)
Aritz Irurtzun (CNRS-IKER, UEU)
Kepa Korta (UPV/EHU)
Elizabete Manterola (UPV/EHU, UEU)
Ismael Manterola (UPV/EHU, UEU)
Blanca Urgell (UPV/EHU)
Eguzki Urteaga (UPV/EHU)

Gizarte Zientziak eta Zuzenbidea

Josu Amezaga (UPV/EHU, UEU)
Amaia Arroyo (MU, UEU)
Aitor Bengoetxea (UPV/EHU, UEU)
Eneko Bidegain (MU, UEU)
Lore Erriondo (UPV/EHU, UEU)
Elixabete Imaz (UPV/EHU)
Mikel Iruskieta (UPV/EHU, UEU)
Xabier Landabidea (UD, UEU)
Libe Mimenza (UPV/EHU, UEU)
Bea Narbaiza (UPV/EHU)
Ixusko Ordeñana (UPV/EHU)
Eneritz Zabaleta (UPPA)

Zientziak eta Natura Zientziak

Noelia Aldai (UPV/EHU)
Arantza Aldezabal (UPV/EHU, UEU)
Estibaliz Apiñaniz (UPV/EHU, UEU)
Arturo Apraiz (UPV/EHU, UEU)
Itziar Aretxaga (INAOE)
Gorka Elordi (UPV/EHU)
Arturo Elosegi (UPV/EHU, UEU)
Nestor Etxebarria (UPV/EHU, UEU)
Kizkitza Insausti (NUP)
Natxo Irigoien (NUP)
Josu Jugo (UPV/EHU, UEU)
Josu Lopez Gazpio (GOI, UEU)
Ane Sarasola (UPV/EHU)
Jone Uria (BCAM)

Ingeniaritza eta Arkitektura

Olatz Arbelaitz (UPV/EHU, UEU)
Gorka Azkune (UPV/EHU)
Ander Goikoetxea (MU)
Enkarni Gomez (UPV/EHU)
Iñigo Lopez Gazpio (UD, UEU)
Jose Miguel Campillo (UPV/EHU, UEU)
Igor Peñalba (UPV/EHU)
Olatz Perez de Viñaspre (UPV/EHU, UEU)
Maialen Sagarna (UPV/EHU)
Arkaitz Zubiaga (University of Warwick)

Osasun Zientziak

Rafael Aldabe (CIMA, UNAV)
Mikel Azkargorta (CIC Biogune)
Nekane Balluerka (UPV/EHU, UEU)
Jose Ramon Bilbao (UPV/EHU, Gurutzetako Ospitalea)
Koldo Callado (UPV/EHU, UEU)
Izaskun Elezgarai (UPV/EHU, UEU)
Iraia Garcia (UPV/EHU)
Xabier Isasi (UPV/EHU, UEU)
Jone Mitxelena (UPV/EHU)
Miren Josu Omaetxebarria (UPV/EHU, UEU)
Nerea Osinalde (UPV/EHU)
Jose Antonio Rodriguez (UPV/EHU)
Izortze Santin (UPV/EHU)

Beste gainbegirale batzuk

Luismi Agirrezabala (UPV/EHU, UEU)
Iñaki Alegria (UPV/EHU, UEU)
Eneritz Anakabe (UPV/EHU, UEU)
Maialen Araolaza (UD, UEU)
Sonia Arrasate (UPV/EHU, UEU)
Unai Atutxa (UPV/EHU)
Eneko Axpe (UPV/EHU)
Jose Luis Ayastuy (UPV/EHU)
Ane Berro (UD)
Ibon Cancio (UPV/EHU, UEU)
Ane Eizagirre (UPV/EHU)
Mari Luz Esteban (UPV/EHU, UEU)
Unai Fernández de Betoño (UPV/EHU, UEU)
Ane Gabilondo (UPV/EHU)
Rakel Gamito Gomez (UPV/EHU, UEU)
Ugutz Garitaonaindia (UPV/EHU)
Jone Miren Hernandez (UPV/EHU)
Karlos Ibarguren Olalde (Osakidetza, UEU)
Amaia Irazusta (UPV/EHU)
Ander Iturriotz (UPV/EHU, UEU)
Maider Iturrondobeitia (UPV/EHU)
Elena Lazkano (UPV/EHU, UEU)

Jose Francisco Lukas (UPV/EHU)
Iñigo Martinez de Alegria (UPV/EHU)
Amaia Nuñez (UPV/EHU)
Fernando Olabarrieta (UPV/EHU, UEU)
Jose A. Pascual (UPV/EHU)
Guiomar Pérez de Nanclares (UPV/EHU)
Luixa Reizabal (UPV/EHU, UEU)
Iratxe Retolaza (UPV/EHU, UEU)
Irantzu Rico (UPV/EHU)
Guadalupe Rivero (UPV/EHU)
Leire Ruiz (UPV/EHU)
Karmele Salaberria (UPV/EHU)
Kepa Sarasola (UPV/EHU, UEU)
Ander Soraluze (UPV/EHU, UEU)
Koldo Telleria (UPV/EHU)
Ekai Txapartegi (UPV/EHU, UEU)
Itziar Txurruka (UPV/EHU)
Imanol Ulacia (UPV/EHU)
Iraultza Unzueta (UPV/EHU)
Iker Villanueva (UD, UEU)
Idoia Zarrazquin (UPV/EHU)
Izaskun Zorita (AZTI, UEU)
Mario Zubiaga (UPV/EHU, UEU)

Batzorde Teknikoa

Ane Sarasua (UEUko idazkari nagusia)
Idoia Torregarai (komunikazio-arduraduna)
Ainhoa Latatu (koordinatzaile akademikoa)
Emilio Delgado (IKT arduraduna)
Ander Altuna (hizkuntza-zuzentzailea)

Ikerketa-talde laguntzaileak

- Catalysis and sustainable polymers ikerketa-taldea (Polymat-UPV/EHU).
- ELEBILAB (UPV/EHUren Elebitasunaren Laborategia)
- Energia biltegiratzeko sistemei buruzko ikerketa-taldea (Mondragon Unibertsitateko Teknologia eta Ingeniaritza alorreko ikerketa-taldea).
- Gaixotasun immuneen genetika funtzionalaren ikerketa-taldea @FunImmune (UPV/EHUko ikerketa-taldea).
- GEZKI Taldea (UPV/EHUko Gizarte Ekonomia eta Zuzenbide Kooperatiboko Institutua)
- IKER Ikerketa Zentroa (Euskara eta Euskal Testuen Ikerketa Zentroa). Ikerketa Zientifikoaren Erakunde Nazionalaren (CNRS), Bordele Montaigne Unibertsitatearen eta Paueko eta Aturri Herrialdeetako Unibertsitatearen (UPPA) gerizpeko ikerketa-gune mistoa (UMR).
- IXA Ikerketa Taldea (UPV/EHUko hizkuntzaren tratamendu automatikoaren inguruko ikerketa-taldea).
- KoLaborategia Ikerketa Taldea (HUHEZI-MUko Gizarte Digitalerako Hezkuntza eta Komunikazioaren Laborategia).
- Materialen ezaugarri termofisikoen ikerketa-taldea (UPV/EHUko ikerketa taldea)
- Minbiziaren biologia molekularraren ikerketa-taldea (UPV/EHUko Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saileko ikerketa-taldea).

- Neuropsikofarmakologia ikerketa-taldea (UPV/EHUko ikerketa-taldea).
- NOR Ikerketa Taldea (UPV/EHUko Ikus-entzunezko Komunikazio eta Publizitate Saileko ikerketa-taldea).
- Parte Hartuz Ikerketa Taldea (UPV/EHUko Gizarte Zientzien esparruko ikerketa-taldea).
- Sinapsi-neuroanatomiaren ultraegitura eta funtziorako laborategia (UPV/EHUko ikerketa-taldea).

Aldizkari zientifiko laguntzaileak

- BAT. Soziolinguistikan eta glotopolitikan espezializatutako aldizkaria.
- EKAIA. Euskal Herriko Unibertsitateko zientzia- eta teknologia-aldizkaria da.
- ELHUYAR ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA aldizkaria.
- GOGOA Euskal Herriko Unibertsitateko Logika, Kognizio, Hizkuntza eta Informaziorako Institutuak (ILCLIk) egindako aldizkaria.
- JAKIN. Giza eta gizarte zientzien alorreko kultur aldizkaria.
- OSAGAIZ. Osasun-zientzien aldizkaria
- SENEZ. EIZIE elkarteak kudeatzen duen itzulpengintzaren arloko aldizkaria.
- TANTAK. Euskal Herriko Unibertsitateko Hezkuntza eta Pedagogiaren arloko aldizkaria.
- UZTARO. UEUk kudeatzen duen giza eta gizarte-zientziei buruzko aldizkaria.

Hizlari gonbidatuak

- Katy Deepwell, Middlesex Unibertsitateko (London) irakasle eta ikertzailea Arte Garaikidearen Teorian eta Kritikan .
- Arantza Diaz de Ilarraza, Euskal Herriko Unibertsitateko Informatika Fakultateko irakasle osoa eta UEUkidea.
- Nuria Oliver, Inteligentzia Artifizialean doktorea (Massachusetts-eko Institutu Teknologikoa, MIT), ELLIS (European Laboratory for Learning and Intelligent Systems) sortzaileetako bat eta bertako lehendakariordea.
- Eneko Axpe, Marie Curie doktoratu osteko ikertzaile bekaduna Stanford University-n, NASA, UPV/EHU.

Mahai-inguruak

- Solasaldia: “Ezagutzaren dibulgazioa, ahalduntzeko tresna”
    - Lorea Agirre. JAKINeko zuzendaria.
    - Uxune Martinez. Euskampus Fundazioaren Kultura Zientifikoko eta Berrikuntza Unitatean, zabalkunde zientifikorako arduraduna. UEUkidea.
    - Ugo Mayor. Ikerbasque Ikerketa Irakaslea UPV/EHUn.
    - Moderatzailea: Idoia Torregarai. Kazetaria eta UEUko komunikazio-arduraduna
- Mahai-ingurua: “K++: Koronabirus osteari buruz esandakoei atzera begirada”
    - Rakel Gamito. UPV/EHUko ikertzaile eta irakaslea. UEUko Pedagogia sailburua.
    - Maite Luengo. Artearen historian graduatua, UPV/EHUren eta Université Bordeaux Montaigneren arteko tutoretza-doktoretza egiten.
    - Anartz Ormaza. Arkitektoa eta hezitzailea da TEO Arkitekturan. UEUko Arkitektura sailburua.
    - Moderatzailea: Xabier Landabidea. Deustuko Unibertsitateko ikertzaile eta irakaslea. Humanitate Digitalen ikerketa-guneko koordinatzailea eta UEUko zuzendaritzako kidea.

MLb-LDLr: LDLaren hartzailearen aldaeren eragina aurresateko ikasketa automatikoko eredua

Larrea, A.[1], Galicia, U.[1]; Jebari, S.[1]; Alonso, R.[1]; Benito-Vicente, A.[1] Uribe, K.[2], Arraste, S.[3]; Gonzalez, H.[3], Martin, C.[1]

[1]Biofisika Unitatea (CSIC, UPV/EHU) eta Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, UPV/EHU. 48080 Bilbo.
[2]Center for Cooperative Research in Biomaterials (CIC biomaGUNE), Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Paseo de Miramon 182, 20014, Donostia
[3]Kimika Organikoa II Saila, (UPV/EHU), 48940 Bilbo
asierlarrea@yahoo.es

Laburpena

Hiperkolesterolemia Familiarrak plasmako dentsitate baxuko lipoproteina-kolesterol maila altua du ezaugarri nagusi. Hiperkolesterolemia Familiarra agertzearen arrazoirik ohikoena LDL hartzailearen aldaerak dira, zeintzuek dentsitate baxuko lipoproteina-kolesterola hartzea murrizten eta plasman pilatzea eragiten duten. Gaixotasunaren diagnosi goiztiarra gakoa da gaixotasun kardiobaskularraren agerpena saihesteko. Alderen karakterizazioan gehien erabilitako tekniken prozesuak luzeak eta garestiak dira. *In silico* softwareak, aldiz, non algoritmo konputazionalak erabiltzen diren aldaera baten eragina aurresateko, konponbide berritzaile bat dira. Lan honetan LDL hartzailearen *missense* aldaerenpatogenizitatea aurresan dezakeen ikasketa automatikoko eredu bat garatu dugu.

Hitz gakoak: Hiperkolesterolemia Familiarra, LDLr, Ikasketa Automatikoa

Abstract

Familial hypercholesterolemia is characterized by high concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma. The most common cause of Familial hypercholesterolemia are mutations in LDL receptor (LDLr) gene, which reduce LDL-C uptake and promote the accumulation of LDL-C in plasma. An early diagnosis of the disease is key to avoiding cardiovascular disease development. The most used characterization techniques are long and expensive processes. On the other hand, in silico *software, where computational algorithms are used to predict the effect of a variant, is an innovative solution. In this work, we have developed a Machine Learning model that can predict the pathogenicity of LDLr missense variants.*

Keywords: Familial Hypercholesterolemia, LDLr, Machine Learning

1. Sarrera eta motibazioa

Hiperkolesterolemia Familiarra (HF) gaixotasun autosomiko gainartzailerik ohikoena da mundu-mailan eta plasmako LDL-kolesterol (ingelesez *Low-density Lipoprotein-Cholesterol* edo LDL-C) maila altua du ezaugarri nagusi (Sjouke *et al.,* 2015). Plasmako LDL-C pilaketak ez du sintomarik eragiten maila larrietara iritsi arte, gaixotasun kardiobaskularrak (ingelesez *Cardiovascular diasease* edo CVD) hedatzeko aukerak oso altuak diren arte. Arazo horrek diagnosi goiztiarraren garrantzia azpimarratzen du. Hala ere, HF kasuen % 1 bakarrik diagnostikatzen da (Benito-Vicente *et al.,* 2018), (Nordestgaard *et al.,* 2013).

LDL-Caren metabolismoan garrantzia duten geneetan gertaturiko mutazioek eragiten dute HFa, eta haien artean LDLaren hartzailea (LDLR) da ohikoena (Palacios *et al.,* 2012). Proteina horretan mutazio kaltegarririk gertatuz gero, zelula ezberdinen LDL-Caren barneraketa murrizten eta plasmako LDL-Caren kontzentrazioa handiagotzen da. Gaur egun 2.900 aldaera baino gehiago aurkitu dira LDLRn eta *missense* motakoak dira gehienak aminoazido baten edo gutxi batzuen aldaketa eragiten dutenak(Chora *et al.,* 2018). Aldaera horiek eragin kaltegarria izan dezakete proteinaren funtzionamenduan, patogenoak izanik, edo ez dezakete eraginik izan, onberak izanik. Hala ere, gutxi dira era egokian karakterizatu diren aldaerak. Kosegregazio-analisiak eta *in vitro* analisi funtzionalak dira karakterizazioa egiteko modurik fidagarrienak, nahiz eta biek desabantailak izan: *In vitro* analisiek eskulan eta denbora asko behar dute, eta kosegregazio-analisiak egiteko aldaera berdina dutenhainbat gaixoren datu klinikoak behar dira (Knowles *et al.,* 2017), (Huijgen *et al.,* 2012).

Aldaera bakoitzaren eragina aurreikusteko gai diren tresna informatikoen erabilpena asko zabalduda osasun-zientzietan azken urteotan. Software edo eredu horiek gene zein proteinaren hainbat ezaugarri erabiltzen dituzte haien patogenizitatea aurresateko, eta era oso azkar eta fidagarrian ematen dituzte emaitzak. Horretarako datu-base handiak behar dira, informazio nahikoa lortzeko eta emaitzak estatistikoki esanguratsuak izateko. LDLRan aldaera asko aurkitu direnez, haien eragina aurresateko gai den software baten sorrera posible eta oso lagungarria izango litzateke. Badaude edozein genetan gertatutako mutazioen eragina aurresaten duten software batzuk (PolyPhen-2 eta SIFT) baita LDLRarekiko espezifikoak direnak ere (SFIP-MutID) (Adzhubei *et al.,* 2010), (Sim *et al.,* 2012), (Guo *et al.,* 2019). Hala ere, kontraesanak daude haien aurreikuspenen artean, eta aldaera onberen kasuan zehazki ez daukate oso asmakuntza-tasa altua.

Guk proposatutako ereduak karakterizatutako LDLRaren aldaera guztiak erabiltzen ditu ikasketa automatikoko teknikak erabiliz, patogenoen eta onberen arteko ezberdintasunak zeintzuk diren ikasteko eta horren arabera aldaerak sailkatzeko

2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa honen helburua izan da LDLRaren aldaeren eragina asmatzeko gai den eredu bat sortzea.

Hiru helburu nagusi izan ditugu:

1. Eredu fidagarri bat sortzea.
2. Era errazean eguneratzea.
3. Beste gene batzuetarako erabilgarria izatea aldaketa gutxirekin.

Badaude hainbat software LDLRaren aldaeren eragina asma dezaketenak, baina askotan haien emaitzak ez datoz bat eta ez dira behar bezain zehatzak. Gainera, software horiek ez dira maiztasun askorekin berrizten, baina gure helburuetako bat modu erraz eta azkarrean eguneratu daitekeen software baten garapena izan da. Azkenik, nahiz eta LDLR generako burutua izan, ereduaren muinak beste edozein genetarako balio izatea nahi dugu.

3. Ikerketaren muina

3.1. Metodologia

3.1.1. Datuen lorpena eta sailkapena

LDLRaren aldaerak ClinVar datu-basetik lortu ziren. Bertan *missense* eta era eztabaidaezinean karakterizatutakoak aukeratu ziren, 2.900 aldaeretatik 744. Horietatik 664 patogeno bezala sailkatu ziren eta 80 onbera bezala. Ondoren aztertuak izango ziren aminoazidoen 7 ezaugarri zehaztu ziren: oinarrizko eta aminoazido berria, zer kontserbatua dagoen aldatutako aminoazidoaren kokalekua, tamaina, karga eta hidrofobizitate-aldaketak eta proteinaren zer domeinutan gertatzen den. Aminoazidoen kokalekuen kontserbazioa lortzeko hainbat espezieren LDLR geneak konparatu ziren eta software bat erabiliz kontserbazio-balio bat atxiki zitzaion LDLR proteinaren 860 aminoazidoetako bakoitzari. Karga-aldaketa posible bakoitzari izen bat eman zitzaion: aminoazido positibo bat beste positibo bategatik aldatzen bazen, A; positibo bat negatibo bategatik, B etab. Tamaina eta hidrofobizitate-aldaketen balioak lortzeko jatorrizko aminoazidoaren balioari aminoazido berriaren balioa erantsi zitzaion. Azkenik, LDLR proteina 7 domeinu nagusitan banatu zen: seinale-sekuentzia, LBD (ingelesez *Ligand Binding Domain*), EGF-A (ingelesez *Epidermal Growth Factor A subunit*), EGF-B, β-upela, EGF-C, O-lotura domeinua, mintzean zeharreko domeinua eta domeinu zitosolikoa. 1 Taulan ezaugarrien laburpen bat azaltzen da.

1 Taula: Kontuan hartutako LDLR aldaeren ezaugarriak

Kontuan hartutako ezaugarriak	Sailkapena
Kontserbazioa	Oso kontserbatua-Gutxi kontserbatua
Karga aldaketa	Karga+/Karga+, Karga+/Karga-, Karga+/Karga gabe…
Tamaina aldaketa	Aldaketa handia-Aldaketa txikia
Hidrofobizitate aldaketa	Aldaketa handia-Aldaketa txikia
Jatorrizko amino azidoa	Alanina, Arginina, Asparagina…
Amino azido berria	Alanina, Arginina, Asparagina…
Domeinua	Seinale sekuentzia, Ligandoarekin batzen den domeinua…

3.1.2. Ereduaren azalpena

Behin ezaugarriak zehaztuta, aldaera patogenoen eta onberen artean bereizteko gai izango zen eredua definitu zen. Horren oinarria zera zen: ezaugarri bat zenbat eta ohikoagoa izan aldaera patogenoetan, orduan eta aukera gehiago ezaugarri hori duen aldaera bat patogeno izateko. Hori kontuan izanik, aurretiaz aukeratutako 760 aldaeren artean zer ezaugarri ziren ohikoenak bilatu zen patogenoen artean, eta patogeno izateko probabilitate-balio bat erantsi zitzaion bakoitzari (P_{ik}). Jatorrizko eta aminoazido berria, domeinua eta karga-aldaketa ezaugarriak motaren arabera taldekatu ziren: oinarrizko aminoazido zehatz bat duten zenbat patogeno, karga-aldaketa zehatz bat dutenak, etab. Beste ezaugarriak —kontserbazioa, tamaina eta hidrofobizitatea—, ezaugarri jarraituak zirenez, balio posibleak 5 taldetan banatu ziren: oso kontserbatuak (kontserbazio-balioa 0.9-0.7 artean), kontserbatuak (0.7-0.5), etab. Ondoren ezaugarri bakoitzari pisu edo garrantzi ezberdin bat eman zitzaion ausaz, denek ez zutelako era berean eragiten aldaera bat patogeno izateko aukeretan (e_k). Azkenik, muga-balio bat ezarri zen, puntu horretatik gora patogeno eta hortik bera onbera izendatuz aldaera (e_0).

Kontzeptu horiekin guztiekin honakofuntzioa ezarri zen (1).

$$f(P_i)_{calc} = -e_o + \sum_{k=1}^{k=7} e_k * P_{ik} \ (1)$$

$f(P_i)_{calc}$ LDLRaren aldaera bati atxikitako patogenizitate-balioa da eta zenbaki hori lortzeko aldaera baten 7 ezaugarrien (k=1etik k=7ra) patogeno izateko aukerak (P_{ik}) ezaugarri bakoitzaren pisuarekin (e_k) biderkatu eta muga-balioa (e_0) eransten zaio. Zenbaki hori positiboa bada, aldaera patogenoa dela esango du ereduak, eta negatiboa bada, onbera.

3.1.3. Entrenamendu eta balioztatzea

Koefiziente guztiak, bai ezaugarri bakoitzaren aukerak patogeno izateko zein haien pisua patogenizitate orokorrean, ClinVar-etik lortutako aldaerekin kalkulatu ziren. Datu-basea bitan banatu zen, bi heren entrenamendurako eta beste herena balioztapenerako. Entrenamendu-taldearekin aipatutako probabilitate eta pisuak zehaztu ziren, eta ondoren ereduaren asmakuntza-tasa frogatu zen balioztapen-taldearekin. Era horretan prozesu zientifikoa bete genuela ziurtatu genuen, datu-base osoarekin lan eginez gero ez genuelako jakingo aldaera berri baten aurrean zer erantzun emango zuen ereduak.

3.1.4. Optimizazioa

e_0 zein e_k balioak ausaz aukeratu zirenez, ereduaren eraginkortasuna hobetu zitekeela uste genuen. Horretarako, ESEA (ingelesez *Excel Solver Evolutinary Algorithm*) metodoa erabili genuen, zeinak funtzio bat optimizatu dezakeen aldagai batzuk aldatuz (Barati, 2013). Kasu honetan, era egokian asmatutako aldaeren kopurua optimizatzeko eskatu genion, aldagaiak pisuak eta muga-balioa izanik.

Horrekin batera, P_{ik} balio batzuk aldatu genituen eskuz, ezaugarri horiek zituzten aldaera oso gutxi aurkitzen zirelako ClinVar datu-basean eta horrek egiazkoak ez ziren emaitzak agertzea eragin zezakeelako. ESEA bidezko optimizazioa eta eskuz egindako aldaketak behin eta berriz eraman ziren aurrera, hobekuntzarik lortu ez zen arte.

3.1.5. Ereduaren balioztapen esperimentala

Nahiz eta ClinVar-eko datuak erabili datu-basea sortzeko, bertan agertzen ez ziren LDLRaren 13 aldaera karakterizatu genituen balioztapen esperimental bat izateko. Aldaera horiek aukeratzeko orduan, ClinVar-en gatazkatsu bezala sailkatutako eta softwarearekin bat etortzen ez zirenak bilatu ziren. Era horretan aurresateko aldaera zailak eta softwareak konparatzeko balio zutenak aurkitu genituen.

Karakterizazioa egiteko, LDLRaren 13 aldaera horiek sintetizatzen zituzten plasmidoak lortu eta haiekin HEK293 giltzurrun-zelulak transfektatu ziren. Ondoren, fluxu-zitometria erabiliz, plasmido horiek zituzten zelulen LDLaren barneraketa neurtu zen. LDL molekula horiek fluoreszentziaz markatuak zeudenez, zenbat eta LDL gehiago barneratu, orduan eta fluoreszenteagoak bihurtzen ziren zelulak. Era horretan LDLRaren aldaerek hartzaile eta LDL arteko afinitatean nola eragiten zuten ikusi zen, zenbat eta seinale gutxiago, orduan eta aldaera patogenoagoa izanik.

3.2. Emaitzak

ESEA eta eskuz eginiko optimizazio-prozesua amaitzean, hurrengo ekuazioa lortu genuen (2).

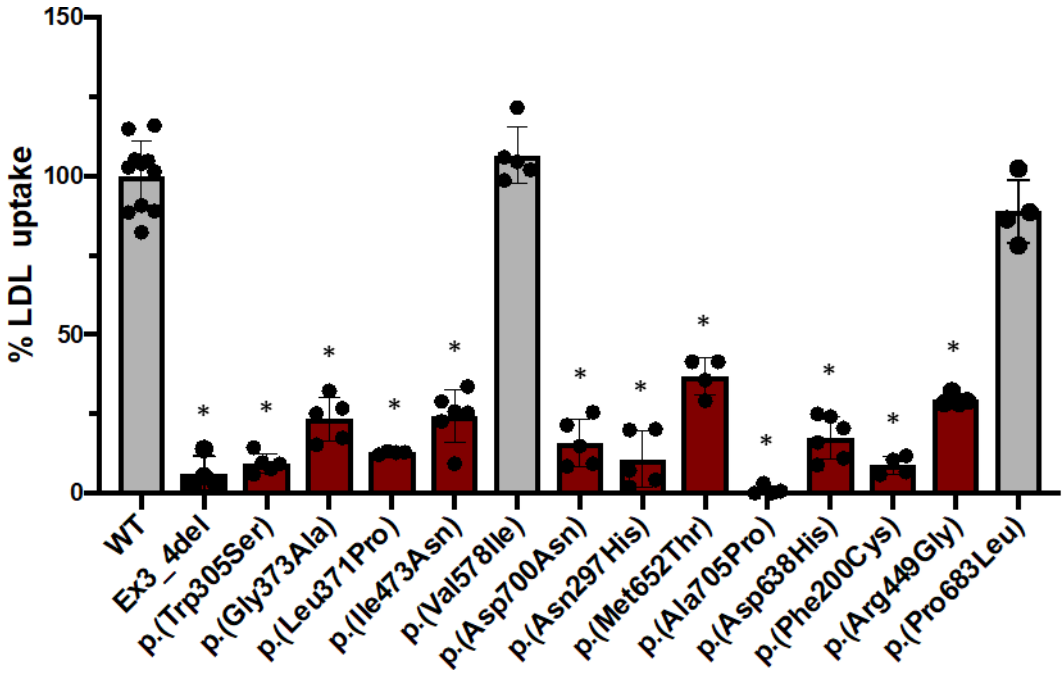
$$f(P_i)_{calc} = -(+0.667) + 0.082 * P_{i1} + 0.132 * P_{i2} + 0.093 * P_{i3} \\ +0.088 * P_{i4} + 0.165 * P_{i5} + 0.115 * P_{i6} + 0.077 * P_{i7} \quad (2)$$

Ekuazio honen zehaztasun-maila % 90 baino handiagoa dauka aldaera patogeno eta onberak ezberdintzerakoan. Zehazki, aldaera onberen % 92,5 ongi asmatzen ditu eta aldaera patogenoen % 91,5. Beste software ezagunekin konparatuz, MLb-LDLRk bigarren asmakuntza-tasarik altuena daukaaldaera patogenoetan eta onena da aldaera onberak asmatzen (2 Taula).

2 Taula: MLb-LDLr-en zehaztasuna beste software batzuekin konparatuz.

Software	Zehaztasuna patogenoetan (%)	Zehaztasuna onberetan (%)	Zenbat aldaera patogeno (664tik)	Zenbat aldaera onbera (80tik)
MLb-LDLr	91.5	92.5	608	74
PolyPhen-2	93.3	85	620	68
SIFT	85.5	90	568	72
SFIP-MutID	91.1	21.2	605	17

Ondoren zitometria bidez balioztatutako LDLR aldaeren LDLaren barneraketa aztertu zen (1 Irudia). Kontrol bezala LDLR andui basatia (ingelesez *Wild Type* edo WT) erabili zen. Emaitzetatik ondorioztatu daiteke bi laginek (p.(Asp700Asn) eta p.(Pro683Leu)) WT bezalako eragina daukatela, beraz, onberak dira, eta beste 11 aldaerek LDLaren barneraketa murriztua erakusten dute.



1. Irudia: Zitometria bidezko 13 LDLR aldaeren karakterizazioa.

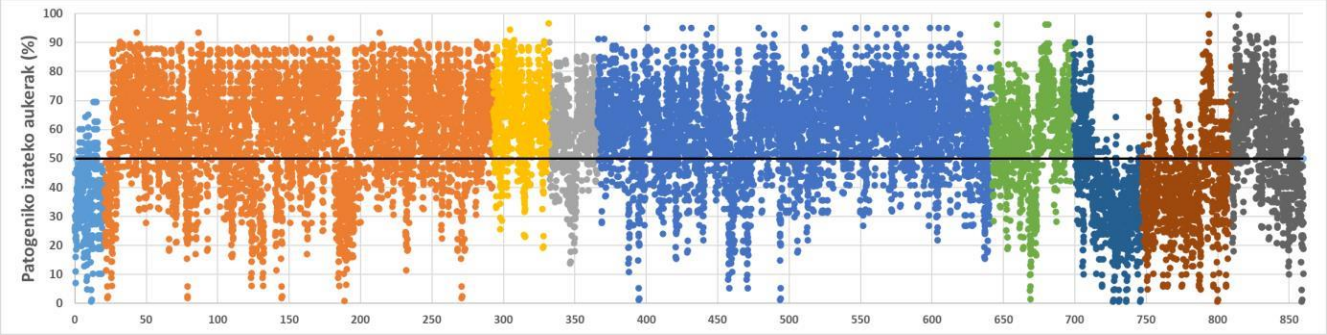
Ondoren beste softwareen aurreikuspenekin konparatu ziren zitometria-emaitzak (3. Taula). 11 aldaera patogenoetatik gure ereduak 8 asmatzen ditu, bigarren emaitzarik onena SFIP-MutIDren atzetik. Aldaera onberetan, bestalde, MLb-LDLRk aldaera bakarra asmatu du, aztertutako bi laginetik, eta SIFTek bakarrik asmatu ditu 2 aldaerak. Emaitza hauek softwareen asmakuntza-tasarekin bat ez datozen arren, kontuan izan behar da aldaera gatazkatsua eta softwareen artean emaitza ezberdinak erakusten dituzten aldaerak aukeratu direla. Beraz, batek asmatuz gero, beste batek huts egin behar du. Hala ere, badago erlazio bat 2. Taularekin, SFIP-MutID aldaera patogenoak asmatzen ona baina onberak asmatzen txarra izanik eta SIFT kontrako emaitzak erakutsiz. Orokorrean MLb-LDLrk oso emaitza onak erakutsi ditu eta orekatuena da.

3. Taula: Software ezberdinen zitometria bidez karakterizatutako aldaeren aurreikuspena.

Software	Asmatutako patogenoak (11tik)	Asmatutako patogenoak (%)	Asmatutako onberak (2tik)	Asmatutako onberak (%)	Zehaztasuna (%)
MLb-LDLr	8	0.72	1	50	0.69
PolyPhen-2	6	0.54	0	0	0.46
SIFT	2	0.18	2	100	0.30
SFIP-MutID	10	0.91	0	0	0.77

Gure ereduaren asmakuntza-tasa ikusita, LDLRaren aldaera posible guztiak aztertzea erabaki genuen. LDLR proteinak 860 aminoazido dituenez eta 19 aminoazido-aldaketa posible daudenez, 16.340 aldaketa posible gerta daitezke proteinan eta bakoitzaren patogeno izateko aukerak irudikatu ditugu (2. Irudia).

2. Irudia: LDLRk izan ditzakeen aldaera posible guztien patogeno izateko aukera MLb-LDLr-ren arabera.



Kolore bakoitza LDLRaren domeinu ezberdin bati dagokio. Erdiko marra beltzak aldaera patogeno eta onberak bereizten ditu.Gainera, software bat argitaratu dugu, edozein aldaeraren patogeno izateko aukerak era azkarrean ematen dituena (https://rocky-beyond-90850.herokuapp.com/). Horretaz gain arlo ezberdinetako informazioa erakusten du: zer domeinutan kokatzen den, tamaina aldaketa, etab.

4. Ondorioak

Proiektu honek genituen helburu guztiak bete ditu: MLb-LDLr-k fidagarritasun oso handia erakutsi du, merkatuan dauden beste software batzuekin lehiatzeko gai izanik. Eguneratzeari dagokionez, modu oso azkar eta errazean egin daiteke, ESEA eta eskuz eginiko aldaketak minutu gutxi batzuetan egin ahal baitira. Horrek ahalbidetzen du aldaera berriak agertzean haien datuak ereduan sartzea, MLb-LDLr-ren fidagarritasuna handituz. Azkenik, eredua beste proteina batzuen patogenizitatea asmatzeko gai izango litzatekeela uste dugu, aldaketa gutxi batzuekin. Kontserbazio- eta domeinu-balioak bakarrik aldatu beharko genituzke, ondoren ESEA eta eskuzko aldaketak berriz egiteko.

In silico iragarpen-softwareak hain modu azkar eta errazean sortu ahal izateak haien garrantzia azpimarratzen du. Fidagarritasun handiko iragarpenek diru eta denbora asko aurreztu dezakete eta horien etengabeko eboluzioak etorkizuneko teknika nagusia bilakatuko direla erakusten du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honekin batera software bat argitaratu dugu[1] eta haren arrera zein den ikusiko dugu. Kritikak jasotakoan eredua zein softwarea moldatuko ditugu, jendearen beharrak asetzeko eta fidagarritasuna handitzeko. Era berean, 6 hilabeterik behin ClinVar-eko datu-basea berritu nahi dugu, emaitzak eguneratzeko.

Horretaz gain, beste proteina batzuen iragarpenak egin ditzan nahi dugu. Horretarako, oso aztertuak eta aldaera datu-base handia duten beste proteina batzuk bilatuko ditugu eta horiekin prozesu guztia aurrera eramango dugu.

6. Erreferentziak

Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, *7*(4), 248–249. https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248

Barati, R. (2013). Application of excel solver for parameter estimation of the nonlinear Muskingum models. *KSCE Journal of Civil Engineering*, *17*(5), 1139–1148. https://doi.org/10.1007/s12205-013-0037-2

Benito-Vicente, A., Uribe, K. B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Ostolaza, H., & Martin, C. (2018). Familial hypercholesterolemia: The most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11). https://doi.org/10.3390/ijms19113426

Guo, J., Gao, Y., Li, X., He, Y., Zheng, X., Bi, J., Hou, L., Sa, Y., Zhang, M., Yin, H., & Jiang, L. (2019). Systematic prediction of familial hypercholesterolemia caused by low-density lipoprotein receptor missense mutations. *Atherosclerosis*, *281*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.003

Huijgen, R., Kindt, I., Defesche, J. C., & Kastelein, J. J. P. (2012). Cardiovascular risk in relation to functionality of sequence variants in the gene coding for the low-density lipoprotein receptor: A study among 29 365 individuals tested for 64 specific low-density lipoprotein-receptor sequence variants. *European Heart Journal*, *33*(18), 2325–2330. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs038

Knowles, J. W., Rader, D. J., & Khoury, M. J. (2017). Cascade screening for familial hypercholesterolemia and the use of genetic testing. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *318*(4), 381–382. https://doi.org/10.1001/jama.2017.8543

Nordestgaard, B. G., Chapman, M. J., Humphries, S. E., Ginsberg, H. N., Masana, L., Descamps, O. S., Wiklund, O., Hegele, R. A., Raal, F. J., Defesche, J. C., Wiegman, A., Santos, R. D., Watts, G. F., Parhofer, K. G., Hovingh, G. K., Kovanen, P. T., Boileau, C., Averna, M., Borén, J., … Tybjærg-Hansen, A. (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. *European Heart Journal*, *34*(45), 3478–3490. https://doi.org/10.1093/eurheartj/eht273

Palacios, L., Grandoso, L., Cuevas, N., Olano-Martín, E., Martinez, A., Tejedor, D., & Stef, M. (2012). Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain. *Atherosclerosis*, *221*(1), 137–142. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.021

Sim, N. L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G., & Ng, P. C. (2012). SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research*, *40*(W1), 452–457. https://doi.org/10.1093/nar/gks539

Sjouke, B., Kusters, D. M., Kindt, I., Besseling, J., Defesche, J. C., Sijbrands, E. J. G., Van Lennep, J. E. R., Stalenhoef, A. F. H., Wiegman, A., De Graaf, J., Fouchier, S. W., Kastelein, J. J. P., & Hovingh, G. K. (2015). Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia in the Netherlands: Prevalence, genotype-phenotype relationship, and clinical outcome. *European Heart Journal*, *36*(9), 560–565. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu058

7. Eskerrak eta Oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiot Eusko Jaurlaritzari Doktoretza-aurreko diru laguntza emateagatik. Era berean José Ángel Fernándezi web orria eta softwarea sortzeagatik.

Heltze egoeraren araberako hazkunde-lesio motak goi-mailako futbolari gazteetan

Monasterio, X.[1,2], Gil, S.M.[1], Bidaurrazaga-Letona, I.[1], Lekue, J.A.[1,2], Santisteban, J.M.[1,2], Diaz-Beitia, G.[1,2], Lee, D.J.[3], Zumeta-Olaskoaga, L.[3], Martin-Garetxana, I.[1,2], Bikandi, E.[2], Larruskain, J.[1]

[1] Fisiologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU), [2] Zerbitzu Medikuak, Athletic Club, [3] Basque Center for Applied Mathematics (BCAM).
xabier.monasterio@ehu.eus

Laburpena

Hazkunde-lesioek baja egun asko eragiten dituzte goi-mailako futbolari gazteetan. Altueraren puntako abiadura edo *peak height velocity*-a (PHV), lesio hauen agerpenarekin erlazionatu den arren, ez dakigu PHV-ak hazkunde-lesio espezifiko bakoitzarekin duen harremana. Ikerketa honetan hazkunde-kurba bidez 110 jokalariren PHVaren adina kalkulatu eta lesio espezifikoen lesio-zama (baja egunak/jokalari-denboraldi kopurua) aztertu dugu heltze egoeraren arabera (pre-, circa- eta post-PHV faseak). Fase bakoitzean eragin handiena duten lesioak ezagutzeak jokalari bakoitzaren heltze-ezaugarrien araberako prebentzio-programak diseinatzea ahalbidetuko du.

Hitz gakoak: Futbola, lesioak, hazkundea, heltzea, kirola.

Abstract

Growth-related injuries are one of the most burdensome injuries in elite academy football players. Peak height-velocity (PHV) has been associated with increased injury-risk for those injuries, however, an association with specific growth-related injuries is unclear. Thus, we modelled 110 growth-curves so as to detect each player's age at PHV and calculate specific growth-related injuries' burden (number of days lost/ number of player/seasons) in each maturity status period (pre-, circa- and post-PHV). Identifying the most burdensome injuries in each maturity status period is vital to design injury prevention programs according to each players' maturity profile.

Keywords: Football, injury, growth, maturity, sport.

1. Sarrera eta motibazioa/ momentuko egoera

Gizonezkoen goi-mailako futbolari gazteetan oso ohikoak dira lesioak, eta hauen ondorioz entrenamendu eta partidu asko galtzen dituzte futbolariek (Wik et al., 2020). Gainera, hainbat ondorio negatibo ekar ditzakete lesioek, hala nola, akademian jarraitzeko aukerak murriztea (Larruskain et al., berrikuspenean) eta berriro lesionatzeko edo nagusitan osasun-arazoak izateko arriskua handitzea (Swain et al., 2018). Hori dela eta, ezinbestekoa da lesioak prebenitzea.

Futbolari gazteetan lesioen arrisku-faktore bezala identifikatu dira hazkundea eta heltzea eta bereziki, hazkunde-lesioekin dute harremana (Monasterio et al., 2020). Lesio hauen inpaktua oso handia da futbol akademietan eta baja egunen %27-a eragiten dituzte (Wik et al., 2020). Konkretuki, 11-14 urtez azpiko kategorietan ematen dira sarriago hazkunde-lesioak, hau da, gizonezkoen altueraren puntako abiadura edo *peak height-velocity* (PHV) gertatzen den adinean (Malina eta Bouchard, 2004).

PHV-a nerabeen heltze-egoera somatikoa aztertzeko erreferentzia bezala hartzen da eta hiru fase bereizten ditu: PHV aurreko fasea (pre-PHV), PHV inguruko fasea (circa-PHV) eta PHV osteko fasea (post-PHV) (Malina eta Bouchard, 2004). Literaturaren arabera, circa-PHV-n lesioek baja egun gehiago eragiten dituzte (Johnson et al., 2019; Swain et al., 2018) eta bereziki, hazkunde-lesioak ematen dira fase horretan (Monasterio et al., 2021). Hala ere, hazkunde-lesio bakoitzak pre-, circa- eta post-PHV-n eragiten dituzten baja egunak aztertzeke dago. Lesio batzuk besteak baino larriagoak dira, sendatzeko denbora gehiago behar dute eta taldearen errendimenduan eragin handiagoa dute. Ondorioz, pre-, circa- eta post-PHV-n ematen diren lesio garrantzitsuenak ezagutzea ezinbestekoa da, izan ere, jokalari bakoitzaren heltze-ezaugarrien araberako interbentzio-programak diseinatzeko lagungarri izango litzateke.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Hazkunde-lesioen eragina handia izanik, hazkunde-lesio espezifiko bakoitzaren lesio-zama pre-, circa- eta post-PHV faseetan aztertzea da gure ikerketaren helburua.

Orain arte egindako ikerketekin konparatuta gure ikerketak hurrengo indarguneak ditu:

1) Lesio-zama (ingelesez, *injury burden*) aztertzen du eta ez lesioen intzidentzia. Lesio-zamak bai lesioen maiztasuna eta baita hauek eragindako baja egunak aztertzen ditu (Bahr et al., 2018).
2) Hazkunde-lesioak espezifikoki aztertzen ditu eta ez lesioak orokorrean. Lesio mota bakoitzaren eragina aztertzea ezinbestekoa da inpaktu handiena duten lesioak ezagutu eta hauek prebenitzeko programak diseinatu ahal izateko (Bahr eta Krosshaug, 2005).
3) PHV adina modu fidagarrian kalkulatzeko hazkunde-kurben modelizazio teknikak erabiltzen ditu (Cole et al., 2010).

3. Ikerketaren muina

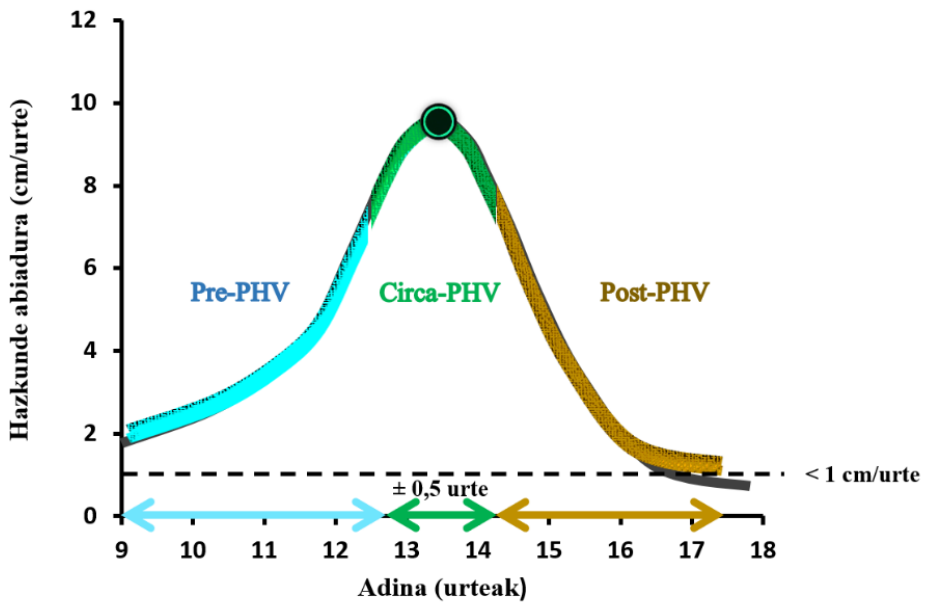
3.1. Metodologia

3.1.1. Lagina, neurketa antropometrikoak eta heltzea

2000-2020 urteen bitartean Athletic Club taldean-burutu zen ikerketa. Mediku zerbitzuko medikuek urtero gutxienez birritan neurtu zuten altuera beti ere, arratsaldeko entrenamenduen aurretik (Towlson et al., 2020). *Super-Imposition by Translation and Rotation* (SITAR) (Cole et al., 2010) kurba-modelizazio metodoa erabilita, 110 jokalariren hazkunde-kurbak modelizatu eta jokalari bakoitzaren PHV-a kalkulatu zen.

Jokalari bakoitzaren PHV adina zenbatetsi ondoren, jokalarien pre- (PHV-tik 0,5 urte baino arinago), circa- (PHV-a ± 6 hilabete) edo post-PHV (PHV ostean 0,5 urtetik eta 1 cm/urteko hazkuntza-abiadurara iritsi arte) faseak bereiztu ziren (Malina eta Bouchard, 2004).

1. irudia. Altueraren puntako abiadura edo *peak height velocity*-aren (PHV) arabera bereiztutako heltze-egoera faseak



3.1.2. Hazkunde-lesioak eta esposizio-denbora

Hurrengoa izan zen hazkunde-lesioen definizioa: "helduetan agertu ez baina eskeletikoki heldu gabeko kirolarietan ohikoak diren lesioak", hala nola hazkunde-plaken hausturak, apofisiak, apofisien abultsio-hausturak eta zurtoin berde gisako hausturak (Difiori, 2010). Lesio espezifikoei dagokionez, hurrengoak jaso ziren: Sever gaixotasuna (kalkaneaoaren apofisitia), Osgood-Schlatter gaixotasuna (belauneko tuberositate tibialaren apofisitia), osteokondrosiak (aurreko goiko arantza iliakoan, aurreko beheko arantza iliakoan eta tuberositate iskiatikoan) eta espondilolisiak (ornoetako pars interarticularis-aren haustura). Lesioek eragindako baja egunak erregistratu eta esposizio neurtzeko jokalari/denboraldia esposizio-unitate gisa definitu zen (esposizio-egunak - baja-egunak / 365,25) (Bahr et al., 2020).

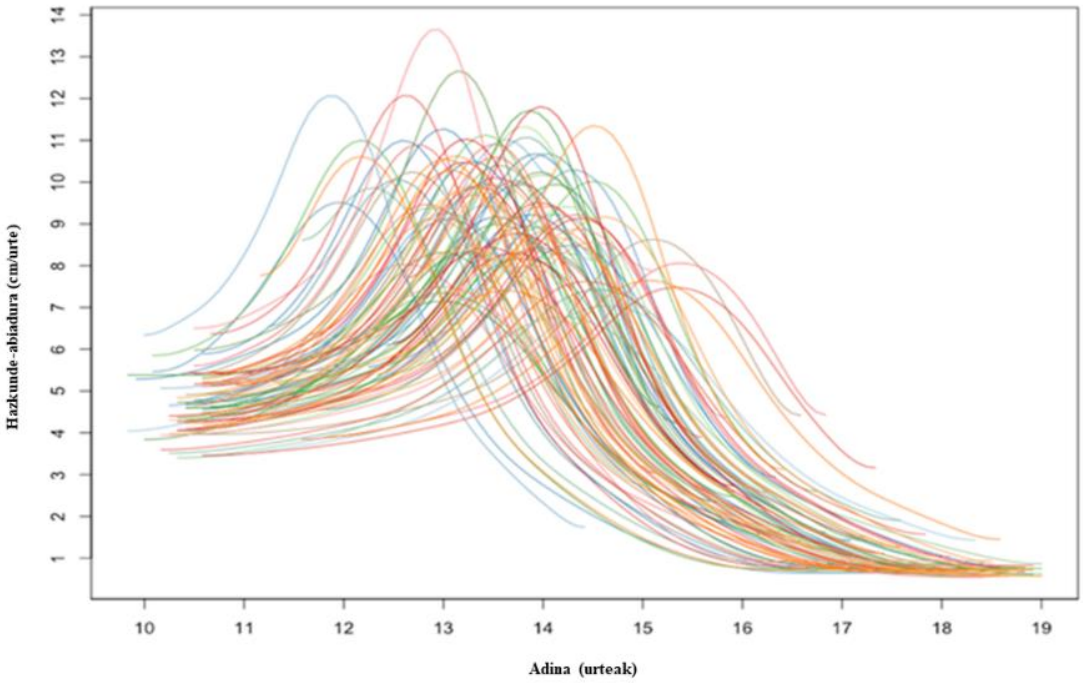
3.1.3. Datu analisia

Lesio-zamak baja egunak / jokalari-denboraldiak bezala adierazi ziren eta taldeen arteko konparaketak egiteko (pre- vs. circa- vs. post-PHV) *Rate Ratio*-ak (RR) erabili ziren. Talde batek besteak baino zama zenbat bider handiagoa duen adieraziko luke RR-ak. Eredu mistoen bidez eta *negative binomial zero inflated* modeloan oinarrituta (Agresti, 2007) modelizatu ziren datuak. Gainera, gehiegizko dispertsioa zuzendu nahian ausazko efektua kontutan hartu zen. R programaren (3.6.2 bertsioa) "glmmTMB" paketea erabiliz burutu zen analisi estatistikoa. Konfiantza-tarteak %95eko konfiantza-mailan kalkulatu ziren *bootstrap* prozedura jarraituta (Davison eta Hinkley, 1997) eta p balioak "*padjust*" paketea erabiliz zuzendu ziren adierazgarritasun-maila p<0,05- izanda.

3.2. Emaitzak

Guztira 695 jokalari/denboraldi aztertu ziren: 255, 98 eta 340 pre-, circa- eta post-PHV-n, hurrenez hurren. Denbora-tarte horretan 994 lesio eta 24368 baja egun erregistratu ziren, horietatik 224 lesio eta 8624 baja egun hazkunde-lesioek eragindakoak izanik. Lehenengo eta azken altuera neurketaren bataz besteko adina 10.7 ± 0.6 eta 17.89 ± 2.79 urtekoa izan zen, eta jokalari bakoitzak 20,2 ± 5,5 neurketa izan zituen. PHV-a 13.4 ± 0.8 urtetan eta 9.93 ± 1.81 cm/urteko abiadurarekin eman zen (2. irudia).

2. irudia. 110 jokalarien hazkunde-kurbak



Hazkunde-lesioek zama handiena circa-PHV-n izan zuten arren, lesio motaren arabera emaitzak aldatu ziren. 1. taulan lesio bakoitzaren lesio-zama eta pre-, circa- eta post-PHV taldeen arteko konparaketetarako RR-ak.

1. taula. Hazkunde-lesio espezifikoen lesio-zama pre-, circa- eta post-PHV-n eta taldeen arteko konparaketetarako *Rate Ratio*-ak (%95-eko konfiantza-tartearekin).

	Pre-PHV	Circa-PHV	Post-PHV	Circa vs. Pre	Post vs. Pre	Post vs. Circa
Hazkunde-lesioak	7.31 (4.71-11.43)	**25.56 (16.33-38.42)**	15.00 (9.11-23.68)	**3.49 * (1.99-5.94)**	**2.05 * (1.13-3.53)**	0.59 (0.32-1.05)
Sever gaixotasuna	**1.47 (0.77-2.35)**	1.15 (0.33-2.19)	0.15 (0.02-0.33)	0.78 (0.20-2.03)	**0.10 * (0.01-0.29)**	**0.13 * (0.01-0.57)**
Osgood-Schlatter gaixotasuna	1.51 (0.45-2.87)	**4.12 (1.50-7.41)**	0.18 (0.01-0.58)	2.73 (0.83-10.61)	**0.12 * (0.01-0.61)**	**0.04 * (0.01-0.18)**
Tuberositate iskiatikoko osteokondrosia	0.61 (0.12-1.43)	**4.17 (0.46-9.45)**	1.44 (0.33-2.92)	6.81 (0.67-42.01)	2.35 (0.45-12.55)	0.35 (0.07-2.63)
Aurreko goiko arantza iliakoaren osteokondrosia	2.74 (1.16-4.74)	**9.85 (3.74-17.96)**	2.40 (0.76-4.44)	**3.60 * (1.25-10.06)**	0.88 (0.24-2.50)	**0.24 * (0.07-0.75)**
Aurreko beheko arantza iliakoaren osteokondrosia			**1.92 (0.52-3.82)**			
Espondilolisia		8.10 (0.17-24.92)	**21.40 (7.72-40.60)**			2.64 (0.66-133.42)

PHV: *peak height velocity* edo altueraren puntako abiadura
* Ezberdintasun estatistikoki adierazgarriak ($p<0.05$) heltze-egoera taldeen artean

4. Ondorioak

Hazkunde-lesioek baja egun asko eragiten dituzte eliteko akademietako futbolarietan eta bereziki, circa-PHV eta post-PHV-n dauden jokalarietan. Lesio espezifikoei dagokionez, lesioek heltze-patroi distal-proximala jarraitu zuten; hau da, distalago (adibidez, kalkaneoan ematen den Sever gaixotasuna) agertutako lesioak proximalago (adibidez, enborrean gertatzen diren espondilolisiak) agertutakoak baino lehenago agertu ziren. Ondorioz, Sever gaixotasunak lesio-zama handiena pre-PHV-n izan zuen eta espondilolisiak, ordea, post-PHV-n.

Adin bereko jokalariek heltze-egoera ezberdina izan dezaketela ikusita (2. irudia), jokalarien heltze-ezaugarriak ezagutzeko neurketa erregularrak egitea funtsezkoa da. Horrela, jokalari bakoitzaren heltze-egoera ezagutu, norbanako bakoitzak jasan ditzakeen lesioak aurresan eta hauek prebenitzeko programak diseinatu ditzakegu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizuneko ikerketek lan honen mugak gainditzen saiatu beharko lituzkete; hala nola, heltze-egoerak beste lesio motetan (muskularrak edo artikularrak, adibidez) duen eragina aztertuz, entrenamendu eta partiduen esposizio indibiduala kontutan hartuz edota lagina handituz (akademia bakarreko gizonezko jokalarietan burututa dago ikerketa hau). Bestalde, hazkundeak eta heltzeak beste faktore batzuekin batera (ezaugarri teknikoak, taktikoak, fisikoak, psikosozialak) duten eragina aztertu beharra dago, izan ere, hauek lesioen agerpenarekin harreman zuzena izan dezakete.

6. Erreferentziak

Agresti, A. (2007): Generalized linear models. An introduction to categorical data analysis, Hoboken, New Jersey.

Bahr, R. eta Krosshaug, T. (2005). Understanding injury mechanisms: A key component of preventing injuries in sport. *British Journal of Sports Medicine*, 39, 324–329).

Bahr, R., Clarsen, B. eta Ekstrand, J. (2018). Why we should focus on the burden of injuries and illnesses, not just their incidence, *British Journal of Sports Medicine*, 52, 1018–1021.

Bahr, R., Clarsen, B., Derman, W., Dvorak, J., Emery, C. A., Finch, C. F., Hägglund, M., Junge, A., Kemp, S., Khan, K. M., Marshall, S. W., Meeuwisse, W., Mountjoy, M., Orchard, J. W., Pluim, B., Quarrie, K. L., Reider, B., Schwellnus, M., Soligard, T., … Chamari, K. (2020). International Olympic Committee consensus statement: Methods for recording and reporting of epidemiological data on injury and illness in sport 2020 (including STROBE Extension for Sport Injury and Illness Surveillance (STROBE-SIIS)), *British Journal of Sports Medicine*, 54, 372–389.

Cole, T. J., Donaldson, M. D. C. eta Ben-shlomo, Y. (2010). SITAR-a useful instrument for growth curve analysis, *International Journal of Epidemiology*, 39, 1558–1566.

Davison, A. C. eta Hinkley, D. V. (1997): Bootstrap Methods and Their Application, *Cambridge University Press, Cambr*idge.

Difiori, J. P. (2010). Evaluation of Overuse Injuries in Children and Adolescents, *Curr. Sports Med. Rep*, 9, 372-378.

Johnson, D. M., Williams, S., Bradley, B., Sayer, S., Murray Fisher, J. eta Cumming, S. (2019). Growing pains: Maturity associated variation in injury risk in academy football, *European Journal of Sport Science*, 20, 544-552.

Larruskain, J., Lekue, J. A., Martin-Garetxana, I., Barrio, I., Mccall, A. eta Gil, S. M. (berrikuspenean). Injuries have a negative impact on player progression in an elite football academy.

Malina RM eta Bouchard C, B.-O. O. (2004): Growth, maturation, and physical activity, *Champaign Human Kinetics*, Illinois.

Monasterio, X., Gil, S. M., Larruskain, J., Lekue, J. A., eta Bidaurrazaga, I. (2020). Hazkundea, heltzea eta lesioak gizonezkoen goi-mailako futbolari gazteetan. *EKAIA Euskal Herriko Unibertsitateko Zientzia Eta Teknologia Aldizkaria*, 38, 117-128.

Monasterio, X., Gil, S. M., Bidaurrazaga-Letona, I., Lekue, J. A., Santisteban, J., Diaz-Beitia, G., Martin-Garetxana, I., Bikandi, E. eta Larruskain, J. (2021). Injuries according to the percentage of adult height in an elite soccer academy. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 24, 218-223.

Monasterio, X., Gil, S. M., Bidaurrazaga-Letona, I., Lekue, J. A., Santisteban, J., Diaz-Beitia, G., Lee DJ., Zumeta, L., Martin-Garetxana, I., Bikandi, E. eta Larruskain, J. (berrikuspenean). The burden of injuries according to maturity status and timing: a two-decade study with 110 growth curves in an elite football academy

Swain, M., Kamper, S. J., Maher, C. G., Broderick, C., McKay, D. eta Henschke, N. (2018). Relationship between growth, maturation and musculoskeletal conditions in adolescents: A systematic review. *British Journal of Sports Medicine*, 52, 1246–1252.

Towlson, C., Salter, J., Ade, J. D., Enright, K., Harper, L. D., Page, R. M. eta Malone, J. J. (2020). Maturity-associated considerations for training load, injury risk, and physical performance within youth soccer: One size does not fit all. *Journal of Sport and Health Science*, S2095-2546:30119-8.

Wik, E. H., Lolli, L., Chamari, K., Materne, O., di Salvo, V., Gregson, W. eta Bahr, R. (2020). Injury patterns differ with age in male youth football: a four-season prospective study of 1111 time-loss injuries in an elite national academy. British Journal of Sports Medicine, [Epub ahead of print].

7. Eskerrak eta oharrak

Lan honen lehen egileak Eusko Jaurlaritzak finantzatutako Doktoretza Aurreko Programako laguntza jaso du (PRE_2020_2_0145).

American Journal of Sports Medicine aldizkarian (*Sports Science* arloan hirugarren postua JCR rankinean, Q1) berrikuspenean dagoen artikulu batetik eratorria da lan hau (Monasterio et al., berrikuspenean). Hala ere, artikulua oraindik ez da inon argitaratua izan eta lan honetan agertzen diren emaitzak guztiz berriak dira.

Morfinak eragindako aldaketa epigenetikoen azterketa *in vitro* eta *in vivo*

Araolaza, M., Muñoa-Hoyos, I., Irazusta, J. eta Subirán, N.

Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

manu.araolaza@ehu.eus

Laburpena

Epigenetikaren inguruko ikerketa gehienak kanpo faktoreek edo barne estimuluek, prozesu zelular eta fisiologikoetan nola eragiten duten ulertzean zentratzen dira. Aldaketa epigenetikoak, nukleotidoen sekuentzian inongo aldaketarik sortu gabe DNA-ri itsasten zaizkion molekula kimiko batzuk dira eta hauek, geneen adierazpena arautzen dute. Kanpo faktoreek aldaketa ugari sortu ditzakete patroi epigenetikoan, hala ere, prozesu honetan parte hartzen duten azpi-mekanismoen inguruan oso gutxi ezagutzen da. Hori dela eta, lan honen helburu nagusia, kanpo estimulu moduan morfina erabiliz geneen adierazpena arautzen dituzten marka epigenetikoak aztertzea da, DNA-ren metilazioan zentratuz eta interes berezia ezarriz hau baimentzen duen makineria erregulatzailearen adierazpenean.

Hitz gakoak: kanpo faktoreak, morfina, epigenetika, metilazioa eta hidroximetilazioa.

Abstract

Most of the research on epigenetics focuses on understanding how external factors or internal stimuli influence cellular and physiological processes. Epigenetic changes are chemical molecules that adhere to DNA without causing any change in the nucleotide sequence and that regulate the expression of genes. External factors can produce many changes in the epigenetic pattern, although very little is known about the sub-mechanisms involved in this process. Therefore, the main objective of this work is to analyse the epigenetic marks that regulate the expression of genes through the use of morphine as an external stimulus, focusing on the methylation of DNA and putting special interest in the gene-expression of its regulatory machinery.

Key words: external factors, morphine, epigenetic, methylation and hydroxymethylation.

1. Sarrera

Hurrengo hamarkadetan existitzen den erronka handienetako bat norberaren bizimoduak eta inguruneak osasunean nola eragiten duen jakitea da. Orain dela gutxi arte, banakoa bere geneek definitzen zutela uste zen, baina ideia hau zeharo aldatzen joan da. Izan ere, geroz eta ezagutza handiagoa dugu epigenetikaren inguruan. Aldaketa epigenetikoak, DNA-ren sekuentzian inolako mutaziorik sortu gabe DNA-ri itsasten zaizkion molekula kimikoak dira eta hauek, geneen adierazpena kontrolatzen dute (Marx, 2012). Orokorrean, hiru dira geneen adierazpena arautzen duten mekanismoak: DNA-ren metilazioa, histonen eraldaketak eta RNA ez-kodetzaileak (Kiefer, 2007). Ikerketa honetan, metilazioan eta honekin erlazionaturik dagoen hidroximetilazioan zentratuko gara. Izan ere, DNA-ren metilazioa, ugaztunon genomaren transkripzioaren plastikotasuna erregulatzen duen eraldaketa epigenetiko garrantzitsuenetariko bat da (Jaenisch eta Bird, 2003).

DNA-ren metilazioa, zitosina hondarraren bosgarren posizioko karbonoan ematen den metilo taldearen gehikuntza kobalentea da, 5´metilzitosina hondarra sortuz (5mC) (Bird et al., 1985; Gardiner-Garden eta Frommer, 1987). Honen presentziak izugarrizko garrantzia du zelulako transkripzioaren erregulazioan, geneen adierazpenaren isilpenarekin erlazionatua baitago (Baylin eta Jones, 2005). Metilo taldearen eta zitosina hondarraren artean sorturiko lotura mota hau itzulgarria den arren, biziraupen nahiko luzea du gainerako aldaketekin konparatuz gero (Lande-Diner eta Cedar, 2005). Horregatik, aldaketa epigenetiko egonkortzat hartzen da. DNA-ren metilazioaz arduratzen diren proteina katalitikoak DNMT1, DNMT3A eta DNMT3B entzimak (ingelesezko *DNA Methyltransferase*;

DNMT) dira eta MBD proteinek (ingelesezko *methyl-CpG-bindin domein*; MBD), oso paper garrantzitsua jokatzen dute hauen mantenuan (Okano et al, 1998; Gowher eta Jeltsch, 2001; Jaenisch eta Bird, 2003; Wade, 2001a). 5mC hondarrek zelularen desberdintzapen prozesua ahalbidetzen dute, zelula bakoitzari identitate zelular jakin bat emanez (Allis eta Jenuwein, 2016). DNA metilatuaren oxidazio prozesuaren bidez berriz, 5´hidroximetilzitosina hondarra (5hmC) eratzen da, 5mC-aren demetilazio prozesu aktiboko hondar bitartekaria. Prozesu hau ahalbidetzen duten proteina katalitikoak TET1, TET2 eta TET3 entzimak (ingelesezko *Ten-Eleven Translocation*; TET) dira. 5hmC hondarren presentzia, geneen adierazpenaren emendioarekin erlazionatuta dago (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010), aurretik aipaturiko 5mC hondarren kontrako efektua sortuz, hau da, pluripotentzia mailaren handipena (Leitch et al., 2013; Smith et al., 2012).

Metilazioaren patroi epigenetiko hau eraldatu egin daiteke kanpo faktoreen bidez eta honek, eragin zelular eta fisiologiko ugari izan ditzake. Faktore hauen artean, elikadura, toxikoekiko kontaktua, drogen kontsumoa (tabakoak, alkohola, opiazeoak, etab.), jarduera fisikoa eta estresa daude (Dunn eta Bale, 2011; Kaati et al., 2002; Whitelaw eta Whitelaw, 2006; Morgan eta Bale, 2011; Vassoler et al., 2014; Yohn et al., 2015). Morfina, opioaren konposatu aktiboena da eta hau izan zen lehendabizi isolatu zen opiazeoa. Konposatu hau, oso erabilia da analgesiko moduan medikuntzan, baino honen gehiegizko erabilerak albo efektu ugari sor ditzake. Hauen artean, neurona dopaminergikoetan alterazioak, portaera emozionalean aldaketak eta analgesiarako sentsibilitatearen galera daude. Horrez gain, efektu hauek belaunaldiz belaunaldi iragaten direla ere behatu da (Byrnes et al., 2011; Johnson et al., 2011). Hala ere, herentzia honen atzean dauden azpi mekanismoen inguruan ez da asko ezagutzen.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Proiektu hau garatzerako garaian, gure helburu nagusia morfinak eragiten dituen aldaketa epigenetikoak aztertzea eta bertan parte hartzen duten mekanismoen inguruan dagoen ezagutza handitzea izan zen. Gure ikerketa taldeak berriki deskribatu du, morfinaren tratamendu kronikoak H3K27me3 histonaren eraldaketak gidatutako asaldura transkripzionalak sortzen dituela saguen ama-zelula enbrionarioetan (mESC) (Muñoa-Hoyos et al., 2020). Emaitza horrek, aldaketa epigenetikoek enbrioiaren garapen prozesuan eragin nabarmena izan dezaketela adierazten du eta ondorioz, baita banako helduen fenotipoan ere. Dena dela, mekanismo horretan DNA-ren metilazioak betetzen duen funtzioaren inguruan ez da oraindik ezer adierazi. Gaiaren inguruko literatura zientifikoa aztertuz gero, informazio gehiena morfinak garuneko eremu espezifikoetan sortu dezakeen erregulazio-epigenetikoan zentratzen da, tolerantzia, menpekotasuna eta nahasmen psikiatrikoak bezalako efektu fenotipokoekin erlazionatuz (Browne et al 2020; Maze eta Nestler 2011). Gorputzeko beste organo eta aparatuetan eragiten dituen aldaketa epigenetikoen inguruan berriz, ez dira ikerketa asko ezagutzen.

Guzti hau kontuan hartuta, lan honen helburu nagusia *in vitro* eta *in vivo* ereduetan morfinaren tratamendu kronikoak eragiten dituen aldaketa epigenetikoak aztertzea da, prozesu honetan dauden mekanismoen inguruan ezagutza handituz. Honetarako, DNA katean ematen diren metilazio eta hidroximetilazio aldaketak, eta hauek erregulatzen dituzten konplexuen gene-adierazpen mailak aztertuko dira. Helburu espezifikoak:

1) Morfinaren tratamendu kronikoak mESC-etan eragiten dituen metilazio eta hidroximetilazio aldaketen azterketa, metilazioaren erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen aldaketekin batera. Ondoren, morfina presente ez dagoenean aldaketa hauen memoria epigenetikoaren identifikazioa burutuko da.

2) Morfinaren tratamendu kronikoak, sagu ar eta emeen organoen DNA-ren metilazio eta hidroximetilazio patroian sortzen dituen aldaketa globalak identifikatzea, metilazioaren erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen aldaketekin batera.

3. Ikerketaren muina

3.1. Metodologia

In vitro esperimentuetan mESC-ak erabili ziren, ESC Oct-4^{+} zelulak zehazki eta hauei, morfinaren (10 µm) 24 orduko tratamendu kronikoa gauzatu zitzaien. *In vivo* esperimentuetan berriz, 8-

10 astetako Swiss Webstar saguak erabili ziren. Saguen morfinaren tratamendu kronikoa aldiz, 12 orduko tartearekin 4 egunetan zehar gauzaturiko injekzio azpikutaneoaren bidez burutu zen, morfina dosiaren emendio gradual batekin (20, 30, 40, 50 mg/kg) (Yang et al., 2014; Crain eta Shen, 1995). Sagu kontroletan %0.9-ko sodio kloruroa injektatu zen. Morfinaz trataturiko saguak analgesia egoera batean aurkitzen zirela frogatzeko, Plater Beroaren Analgesia Test-a (ingelesezko *Hot-plate analgesia test*) froga gauzatu zitzaien. Saguekin zerikusia izan zuten protokolo guztiak UPV/EHU-ko Animaliekin Esperimentatzeko Batzorde Etikoa-ren bidez onartuak izan ziren (onespen-zenbakia: CEEA/339/2013/SUBIRAN CIUDAD eta M20/2016/142).

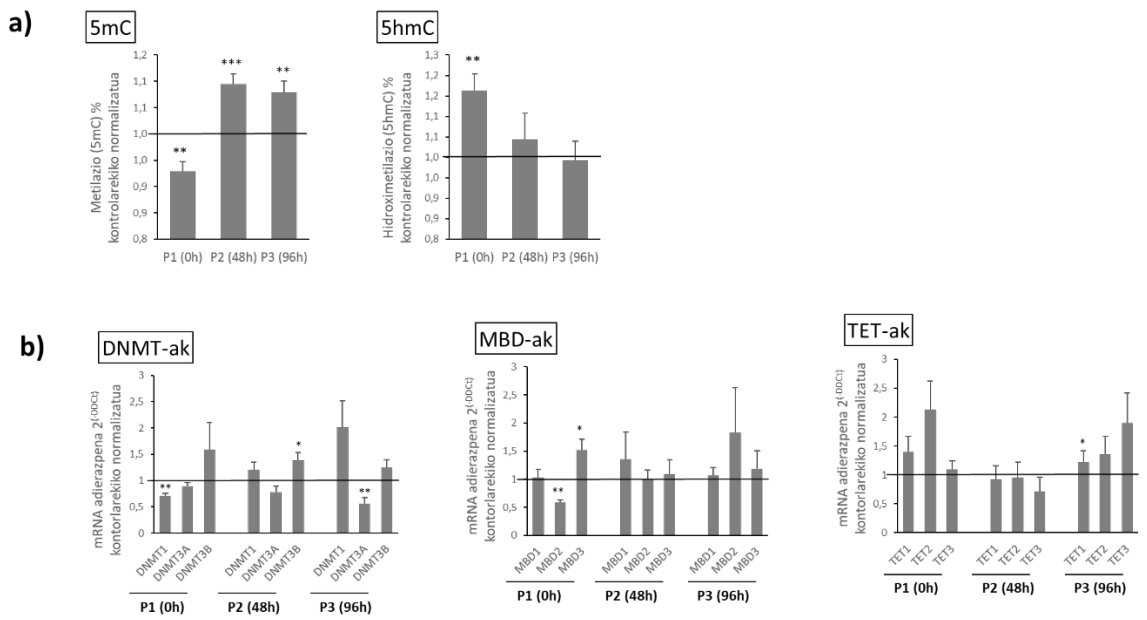
Genomako metilazio (5mC) eta hidroximetilazio (5hmC) maila globalak neurtzeko Kromatografia Likidora akoplaturiko Masa Espektometria (LC-MS/MS) teknika erabili zen, 5 N-ko laginarekin. Lorturiko datuak ehuneko moduan adierazi ziren, lagin bakoitzean neurturiko 5mC eta 5hmC hondakinen kopuruak C hondarren kopuru totalarekin zatituz. Geneen adierazpen maila neurtzeko berriz, Polimerasaren Kate-Erreakzio kuantitatiboa Denbora Errealean (RT-qPCR) teknika erabili zen, 3 N-ko laginarekin. Honetarako, hasle espezifikoak (ingelesezko *primer*) erabili genituen eta datuen normalizazioa burutzeko, erreferentzia gene egonkorrenak aukeratu ziren geneen normalizatzaile (ingelesezko *housekeeping*) moduan. Lorturiko geneen adierazpenen kuantifikazio erlatiboa $2^{\Delta\Delta CT}$ metodoaren bidez aurkeztu dira. Esperimentu hauen bidez lorturiko emaitzen analisi estatistikoa Student-en T proba (ingelesezko *Student's t-test*) erremintaren bidez gauzatu zen, emaitzen esanguratsutasun maila hirutan bereiziz: *$p<0.05$, **$p<0,01$ eta ***$p<0,001$.

3.2. Morfinaren tratamendu kronikoak mESC-etan eragiten dituen metilazio eta hidroximetilazio aldaketen azterketa, metilazioaren erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen aldaketekin batera.

Gure lehen helburua, mESC-tan morfinaren tratamendu kronikoak eragiten dituen aldaketak identifikatzea izan zen eta emaitza hauek, 1. irudian beha ditzakegu. 24 orduko tratamendu kronikoaren ostean, zenbait aldaketa esanguratsu deskribatu ziren. Alde batetik, metilazio maila globalaren jaitsiera eta hidroximetilazio maila globalaren igoera identifikatu ziren (1.a irudia; P1). Beste aldetik, gene-erregulatzaileen adierazpena aztertuz gero (1.b irudia; P1), *Dnmt1* eta *Mbd2* geneen jaitsiera eta *Mbd3*-aren igoera antzeman ziren. *Tet* geneen kasuan aldiz, ez genuen hauen adierazpenean inongo aldaketarik sumatu. Deskribatutako metilazio mailen jaitsiera, hidroximetilazioen igoerarekin bat dator eta hori demetilazio-prozesu aktiboren adierazle izan daiteke. *Dnmt* eta *Mbd* geneei dagokionez berriz, hauen presentzia metilazioarenarekin erlazionatzen denez, *Dnmt1* eta *Mbd2*-aren jaitsierak azaldutako emaitzekin bat datoz. *Mbd3*-aren adierazpenaren igoera aldiz, aurreko emaitzekin kontraesanean aurkitzen da. Ikerketa batean frogatu denez, MBD3 proteinaren presentzia ezinbestekoa da mESC zelula pluripotenteetan. Izan ere, proteina hau ezabatua duten saguak ez dira bideragarriak enbrioiaren garapeneko lehen etapetan (Hendrich et al., 2001), beste edozein MBD proteinen ezabapenarekin gertatzen ez den moduan. Horregatik, zelula hauen pluripotentzi maila handitzen denean, *Mbd3* genearen adierazpenaren igoera nahitaez eman behar dela pentsa dezakegu.

Morfinaren efektua denboran zehar mantentzen zen argitzeko, tratamendu ostean zelulak kultiboan mantendu ziren, laginak 48 eta 96 ordutara jasoz (P2 eta P3 hurrenez hurren). Ondoren, zelula hauen metilazio eta hidroximetilazioak aztertu ziren. Pase hauetan, zelulen egoera epigenetikoa erabat aldatu zen metilazioei dagokionez: P1 pasetik P2 pasera metilazio-maila globala nabarmenki handitu zen. Hidroximetilazioei dagokionez, P1 pasean maila altuagoak hauteman baziren ere, ondorengo bi paseetan (P2 eta P3) 5hmC-en maila globala bere horretara bueltatu zen. Geneen adierazpenari dagokionez, P2-an *Dnmt3b* genearen igoera esanguratsu bat behatu zen eta P3-an berriz, *Dnmt3a*-ren jaitsiera eta *Tet1*-aren igoera. Hortaz, metilazio mailetan igoera nabarmen bat eman zen arren, hidroximetilazio mailak konstante mantendu ziren. Metilazioaren erregulazio-konplexuetan lortutako emaitzen arabera, P2-an identifikatutako 5mC-mailen igoera, *de novo* metiltransferasa moduan ezagutzen den *Dnmt3b* genearen adierazpenaren igoerarekin erlazionaturik egon daiteke. P3-ari dagokionez berriz, 5mC-en mailan hauteman zen jaitsiera leuna, *Dnmt3a*-ren adierazpenaren jaitsierarekin eta *Tet1*-en adierazpenaren igoerarekin erlazionaturik egon daiteke. Edonola ere, *Tet1*-en igoerak ez zuen inongo aldaketarik sortu 5hmC-en mailan.

Hortaz, mESC-etan buruturiko morfinaren tratamendu kronikoa desagertzean metilazio-mailak esanguratsuki handitzen dira, pluripotentzia maila murriztuz. Morfinaren efektu hori denboran zehar mantendu egiten da, gutxienez 96 ordutan, hala moduko memoria bat eraginez. mESC zelulek 11-14 orduko ziklo zelularra dutela kontuan hartzen badugu (Waisman et al., 2019), morfinaren eragina 8 bat belaunalditan zehar topatzen da gutxienez.

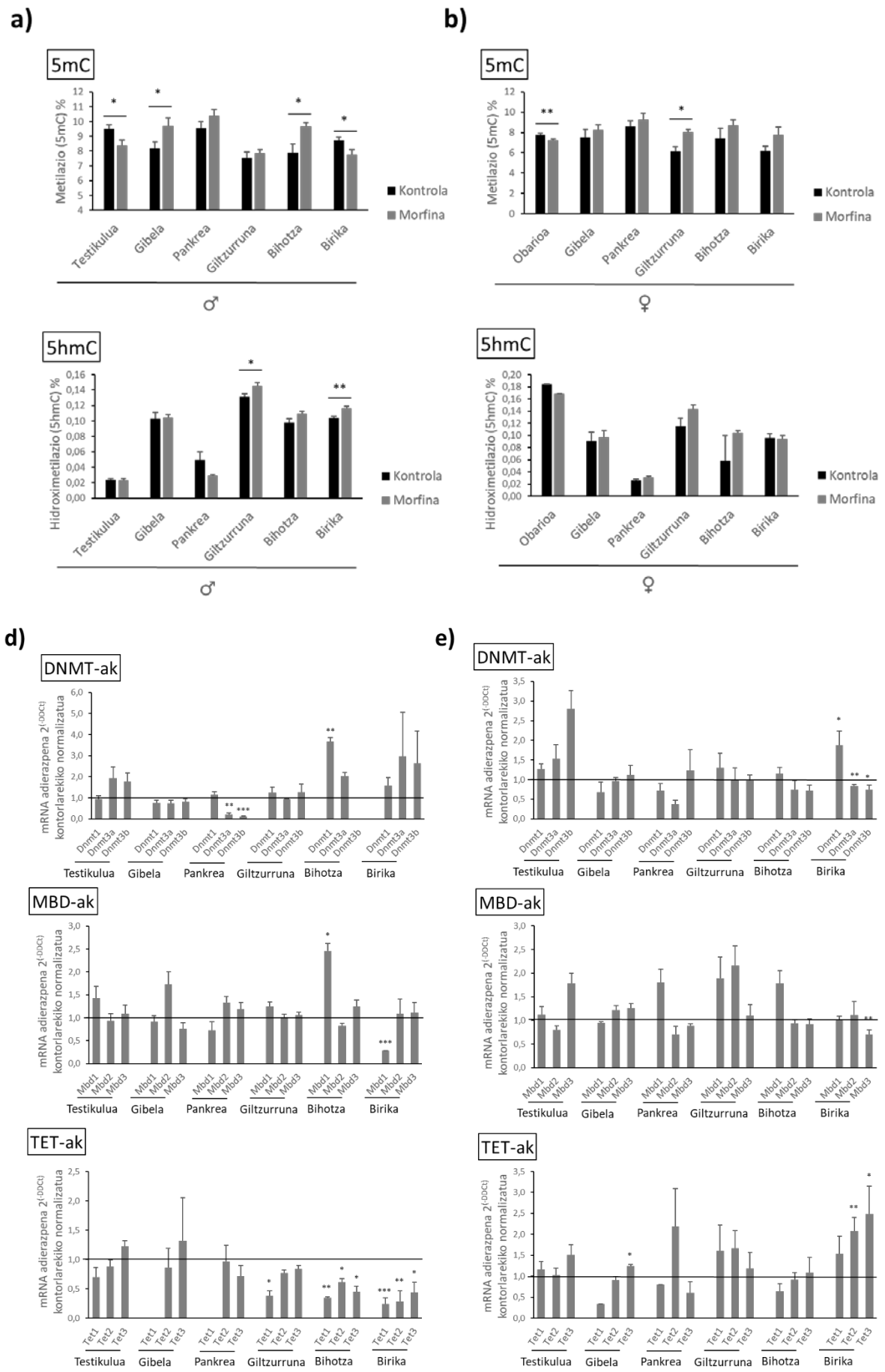


1. irudia. Morfinak eragindako metilazio eta hidroximetilazio maila globalen eta asoziaturiko geneen adierazpen aldaketak mESC zeluletan, 3 pasekin (0, 48 eta 96 ordu). Morfinaren tratamenduak eragindako aldaketak mESC zeluletan. **(a)** genomako metilazio eta hidroximetilazio hondarren maila globalari dagozkion ehunekoak (LC-MS/MS); eta **(b)**, erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen mailak (RT-qPCR). Bi neurketa hauek 3 pasetan zehar neurtu ziren, pase batetik bestera 48 orduko diferentzia zegoelarik (0, 48 eta 96 ordu).

3.3. Morfinaren tratamendu kronikoak, sagu ar eta emeen organoen DNA-ren metilazio eta hidroximetilazio patroian sortzen dituen aldaketa globalak identifikatzea, metilazioaren erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen aldaketekin batera.

Bigarren helburu nagusia, morfinaren tratamendu kronikoak saguetako organoetan dituen eragin epigenetikoak eta hauen erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen mailak aztertzea izan zen. Helburu honetan lortu ditugun emaitzak 2. irudian azaltzen dira. Metilazio eta hidroximetilazioei dagokionez, emaitza oso ezberdinak eskuratu ziren azterturiko bi sexuetan eta sagu arretan aldaketa adierazgarriagoak topatu ziren. Arretan (2.a irudia), testikuluek eta birikek metilazio-mailen jaitsiera erakutsi zuten eta gibelak eta bihotzak berriz, metilazioen igoera. Hidroximetilazioen kasuan aldiz, giltzurrunek eta birikek igoera bat jasan zuten. Emeetan (2.b irudia), 5mC balioei dagokionez, obarioek jaitsiera eta giltzurrunek igoera bat erakutsi zuten eta 5hmC balioetan aldiz, ez zen inongo aldaketarik identifikatu. Bi prozesu hauen erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpenari dagokionez, emaitza oso ezberdinak hauteman ziren. Arretan esaterako (2.d irudia), pankrean *Dnmt3a/b* geneen jaitsiera; giltzurrunetan *Tet1*-en jaitsiera; bihotzean *Dnmt1* eta *Mbd1*-en igoera eta *Tet1/2/3*-en jaitsiera; eta birikan, *Mbd1* eta *Tet1/2/3*-en jaitsiera identifikatu ziren. Emeetan (2.e irudia) aldiz, gibelean *Tet3*-aren igoera; eta birikan, *Dnmt1* eta *Tet2/3*-ren igoera eta *Dnmt3a/b* eta *Mbd3*-aren jaitsiera hauteman ziren.

Erabilitako bi tekniken bidez lorturiko emaitzetan, aldi berean aldaketak agertutako organo bakarrak, sagu arretako giltzurrunak, bihotza eta birikak izan dira. Giltzurrunean ez dago korrelaziorik datuen artean; 5hmC mailak igo egiten badira ere, *Tet1* genea topatzen da. Bihotzean, *Tet*-etako datuak bat ez badatoz ere, *Dnmt1* eta *Mbd1*-en datuak metilazioen igoerarekin erlazionaturik daude. Biriken kasuan berriz, *Tet*-en adierazpen maila ez dator bat 5hmC-en mailekin, baina *Mbd1*-en jaitsiera, metilazioarenarekin erlazionaturik egon daiteke. Gainerako organoetan metilazio eta hidroximetilazio -mailei dagokionez, ez dira aldaketa esanguratsurik topatu edo ez dute azterturiko gene-erregulatzaileen mailarekin zuzenean bat egiten. Horregatik, kasu hauetan morfinaren bidez eman daitezkeen aldaketen jatorria besteren bat izan litekeela pentsa genezake. Aipagarria da sexu organoek, bai testikuluak eta bai obarioak, metilazio maila globalen jaitsiera adierazgarriak jasan zituztela. Izan ere, morfinak organo hauetan eragin zuen efektu epigenetikoa antzekoa izan zen, gainerako organoetan gertatu ez zen moduan. Kointzidentzia honen arrazoiak ezezagunak baditugu ere, argi dago organo hauetan ematen diren aldaketa epigenetikoak hurrengo belaunaldietara heredatzeko duten potentzialtasuna ikaragarri handia dela (Gapp et al.,2014; Yohn et al., 2015). Horrez gain, lorturiko emaitzak kontuan hartuta, morfinaren *in vivo* tratamendu kronikoak, organo eta sistema biologiko ezberdinetan metilazio/hidroximetilazio aldaketak eragin ditzakeela baieztatu dezakegu, erlazionaturik dauden zenbait gene-erregulatzaileen adierazpenarekin batera.



2. irudia. Saguen organoetako metilazio eta hidroximetilazio maila globalak eta asoziaturiko gene-familien adierazpen mailaren neurketak. Saguetako organo ezberdinetan neurturiko DNA-ren metilazio eta hidroximetilazio -maila globalak arretan (a) eta emeetan (b) eta erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen maila arretan (d) eta emeetan (e). Aztertutako saguen organoak sei dira: testikulu/obarioak, gibela, pankrea, giltzurrunak, bihotza eta birikak, hurrenez hurren.

4. Ondorioak

mESC zeluletan, morfinaren tratamendu kronikoak, metilazio-mailaren jaitsiera eragiten du (1.a irudia; P1). Honek genomako gene kopuru zabalago bat adieraztea ekartzen du eta hau, zelularen pluripotentziaren emendio batekin erlazionatzen da (Aoki et al., 1997; Han et al., 2011). Ondorio hau, aurretik argitaratutako emaitzekin bat dator (Muñoa-Hoyos et al., 2020). Hortaz, pluripotentziaren emendioa ekartzen duen transkripzioaren igoera hau, morfinaren ondoriozko H3K27me3 eraldaketak eta DNA-ren metilazioren jaitsierak gidatzen duela esan dezakegu. Bestalde, morfinaren tratamendu kronikoak DNA-ren metilazioaren bidez memoria epigenetikoa sortzen duela ere ondorioztatzen dugu (1.2 irudia; P1, P2 eta P3). Izan ere, 24 ordutara ikusten diren emaitzak bere horretan mantentzen ez badira ere, metilazio mailak eta gene-erregulatzaileen adierazpenak desdoiturik jarraitzen dute denbora iragan ahala.

Bestalde, *in vivo* buruturiko morfinaren tratamendu kronikoak, organo eta sistema biologiko ezberdinetan metilazio/hidroximetilazio aldaketa nabarmenak eragin ditzakeela frogatu dugu, prozesu horien gene-erregulatzaileen adierazpena ere aldatuz. Aurkezturiko emaitza hauek ekarri dituzten ekarpenak garrantzitsuak dira oso. Lan hau orain arte egon diren ikerketen osagarria da, garunaren inguruan dagoen ezagutzari beste organoetan izan dezakeen eraginaren informazioa gehitzen duelako. Deskribatu ditugun morfinaren eragin sistemikoak ondorio fisiologiko garrantzitsuak sortu ditzakete. Esaterako, zenbait ikerketek aditzera eman dutenez, morfina arazo kardiakoen eragile da (McCarthy et al., 2016) eta hori, guk deskribatutako bihotzeko metilazio mailaren igoerarekin erlazionatua egon daiteke. Hala ere, aldaketa epigenetiko hauen atzean egon daitezkeen mekanismo molekular eta erregulazio-prozesuak zeintzuk diren ezin izan dugu zehaztu. Lorturiko emaitzak mekanismo hauek ulertzeko interesgarriak badira ere, proba eta azterketa gehiago (proteinen presentzia, hauen aktibitate entzimatikoa, etab.) burutzea beharrezkoa da.

Amaitzeko, morfinak metilazio eta hidroximetilazio mailan sortzen dituen efektuak sexuaren arabera erabat ezberdinak direla nabarmentzea ezinbestekoa egiten da. Ikus dezakegunez, morfinak sortzen dituen aldaketa epigenetikoak sexuaren menpekoak dira eta hau bat dator beste ikerketa askok aipatzen dutenarekin (Pasternak, 1993; Cicero et al., 1996; Islam et al., 1993; Baamonde et al., 1989). Ezberdintasun hauen jatorria, bi sexuen artean μ hartzaile-opioideak aurkezten duen barreiapen ezberdinean egon daiteke (Chakrabarti et al., 2012; Verzillo et al., 2014) eta hau, bi sexuen arteko dimorfismo sexualaren erakusgarria ere bada. Lorturiko emaitzek baieztatzen duten moduan, aldaketa hauek nabarmenagoak dira arretan emeetan baino, arrek opioideekiko duten sentiberatasuna handiagoa delarik (Cicero et al., 1996; Islam et al., 1993; Baamonde et al., 1989; Kest et al, 2000). Sentikortasun handiago honen jatorria, arrek duten nozizepzioaren ezaugarri nabariagoak edota bi sexuen artean dauden diferentzia hormonalak izan daitezke. Honen harira, aipatu beharra dago, metodologian zehar aldagai guztiak kontrolatzen eta estandarizatzen saiatu bagara ere, bien arteko egoera hormonala ezberdina izaten jarraitzen duela, drogek izan ditzaketen efektuak ezberdinak direlarik. Beraz, gure emaitzak morfinak sorturiko sexu menpeko efektuaren oinarriak ulertzeko baliagarriak izan daitezke eta gainera, bi sexuak independenteki aztertzeko beharra azpimarratzen dute, arren eta emeen artean efektu fisiologiko nabariak daudela berretsiz.

Azkenik, emaitzetan aipatu dugun moduan, morfinaren tratamendu kronikoak bi ugaltze-organoetan histonen metilazio aldaketa komunak aurkeztu dituzte. Honek morfinak eragindako aldaketa epigenetikoek herentzia epigenetiko transgenerazionalean parte hartu dezaketela iradokitzen du. Izan ere, gametoetan ematen diren aldaketak heredatuak izateko aukera gehien duten hautagaiak dira.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan proposaturiko esperimentuen bidez, *in vitro* eta *in vivo* estrategiak erabili dira, morfinaren tratamendu kronikoak eragiten dituen aldaketa epigenetikoak aztertzeko. Edonola ere, ikerturiko eraldaketa epigenetiko hauek maila global batean bakarrik aztertu dira. Baina egokia izango litzateke eraldaketa hauek modu zorrotzago batean aztertu ahal izatea, aldaketa espezifikoak identifikatuz, horietako bakoitzaren inplikazio zehatzagoa aztertuz eta era berean, gene-erregulatzaile edo mekanismo berriak ikertuz. Hortaz, etorkizunerako planteatzen dugun pausua, modifikazio hauek nukleotido mailan antzemango dituen analisi bat gauzatzea da, *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS) teknikaren bidez. Teknika honek, jada identifikatu ditugun aldaketa globalak genomako zein puntutan ematen diren aztertzeko aukera eskainiko digu, oso informazio baliagarria eskainiz.

6. Erreferentziak

Allis, C.D. eta Jenuwein, T. (2016), The molecular hallmarks of epigenetic control, *Nat. Rev. Genet.* 17(8), 487-500.

Aoki, F., Worrad, D.M. eta Schultz, R.M. (1997), Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo, *Dev. Biol.* 181, 296–307.

Baamonde, A.I., Hidalgo, A. eta Andrés-Trelles, F. (1989), Sex-related differences in the effects of morphine and stress on visceral pain, *Neuropharmacology* 28(9), 967-70.

Baylin, S.B. eta Jones, P.A. (2016), Epigenetic Determinants of Cancer, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a019505.

Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J. eta Macleod, D. (1985), A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA, *Cell* 40, 91–99.

Browne, C.J., Godino, A., Salery, M. eta Nestler, E.J. (2020), Epigenetic Mechanisms of Opioid Addiction, *Biol Psychiatry* 87, 22-33.

Byrnes, J.J., Babb, J.A., Scanlan, V.F. eta Byrnes, E.M. (2011), Adolescent opioid exposure in female rats: transgenerational effects on morphine analgesia and anxiety-like behavior in adult offspring, *Behav. Brain Res.* 218(1), 200-205.

Chakrabarti, S., Liu, N.J., Zadina, J.E., Sharma, T. eta Gintzler, A.R. (2012), Pleiotropic opioid regulation of spinal endomorphin 2 release and its adaptations to opioid withdrawal are sexually dimorphic, *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 340(1), 56-63.

Cicero, T.J., Nock, B. eta Meyer, E.R. (1996), Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279(2), 767-73.

Crain, S.M. eta Shen, K.F. (1995), Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance/dependence during chronic cotreatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92(23), 10540-10544.

Dunn, G.A. eta Bale, T.L. (2011), Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage, *Endocrinology* 152(6), 2228-36.

Gapp, K., Jawaid, A., Sarkies, P., *et al.* (2014), Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice, *Nat. Neurosci.* 17(5), 667-669.

Gardiner-Garden, M. eta Frommer, M. (1987), CpG Islands in vertebrate genomes, *J. Mol. Biol.* 196, 261–282.

Gowher, H. eta Jeltsch, A. (2001), Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites, *J. Mol. Biol.* 309(5), 1201-8.

Han, H. *et al.* (2011), DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter, *Hum. Mol. Genet.* 20, 4299–4310.

Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V.A. eta Bird, A. (2001), Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development, *Genes Dev.* 15(6), 710-23.

Islam, A.K., Cooper, M.L. eta Bodnar, R.J. (1993), Interactions among aging, gender, and gonadectomy effects upon morphine antinociception in rats, *Physiol. Behav*. 54(1), 45-53.

Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., Hong, K., Sowers, L.C. eta Zhang, Y. (2010), Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification, *Nature* 466(7310), 1129-33.

Jaenisch, R. eta Bird, A. (2003), Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nat. Genet. Mar.* 33 Suppl., 245-254.

Johnson, N.L., Carini, L., Schenk, M.E., *et al.* (2011), Adolescent opiate exposure in the female rat induces subtle alterations in maternal care and transgenerational effects on play behaviour, *Front. Psychiatry* 2, 29.

Kaati, G., Bygren, L. eta Edvinsson, S. (2002), Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period, *Eur. J. Hum. Genet.* 10, 682–688.

Kest, B., Palmese, C. eta Hopkins, E. (2000), A comparison of morphine analgesic tolerance in male and female mice, *Brain Res.* 879(1-2), 17-22.

Kiefer, J.C. (2007), Epigenetics in development, *Dev. Dyn.* 236, 1144-1156.

Lande-Diner, L. eta Cedar, H. (2005), Silence of the genes--mechanisms of long-term repression, *Nat. Rev. Genet*. 6, 648-654.

Leitch, H.G., McEwen, K.R., Turp, A., *et al.* (2013), Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 311–316.

Marx, V. (2012), Epigenetics: Reading the second genomic code, *Nature* 491(7422), 143-7.

Maze, I. eta Nestler, E.J. (2011), The epigenetic landscape of addiction, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1216, 99-113.

McCarthy, C.P., Mullins, K,V., Sidhu, S.S., Schulman, S.P. eta McEvoy, J.W. (2016), The on- and off-target effects of morphine in acute coronary syndrome: A narrative review, *Am. Heart J.* 176, 114-21.

Morgan, C.P. eta Bale, T.L. (2011), Early prenatal stress epigenetically programs dysmasculinization in secondgeneration offspring via the paternal lineage, *J. Neurosci*. 31, 11748–11755.

Muñoa-Hoyos, I., Halsall, J.A., Araolaza, M. *et al.* (2020), Morphine leads to global genome changes in H3K27me3 levels via a Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) self-regulatory mechanism in mESCs, *Clin. Epigenet.* 12, 170.

Ng, S.B., Bigham, A.W., Buckingham, K.J., *et al.* (2010), Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat. Genet.* 42, 790–793.

Okano, M., Xie, S. eta Li, E. (1998), Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases, *Nat. Genet.* 19, 219-220.

Pasternak, G.W. (1993), Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clin. Neuropharmacol.* 16(1), 1-18.

Smith, Z.D., Chan, M.M., Mikkelsen, T.S., *et al.* (2012), A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo, *Nature* 484, 339–344.

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., *et al.* (2009), Conversion of 5-methylcytosine to 5- hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science* 324, 930-935.

Vassoler, F.M., Byrnes, E.M. eta Pierce, R.C. (2014)a, The impact of exposure to addictive drugs on future generations: Physiological and behavioral effects, *Neuropharmacology* 76(Pt B), 269–275.

Verzillo, V., Madia, P.A., Liu, N.J., Chakrabarti, S. eta Gintzler, A.R. (2014), Mu-opioid receptor splice variants: sex-dependent regulation by chronic morphine, *J. Neurochem.* 130(6), 790-796.

Wade, P.A. (2001)a, Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation, *Oncogene* 20, 3166-3173.

Waisman, A., Sevlever, F., Elías Costa, M., *et al.* (2019), Cell cycle dynamics of mouse embryonic stem cells in the ground state and during transition to formative pluripotency, *Sci. Rep.* 9, 8051.

Whitelaw, N.C. eta Whitelaw, E. (2006), How lifetimes shape epigenotype within and across generations, *Hum. Mol. Genet.* 15(2), 131-7.

Yang, X., Han, H., De Carvalho, D.D., Lay, F.D., Jones, P.A. eta Liang, G. (2014), Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer, *Cancer Cell* 26, 577-90.

Yohn, N.L., Bartolomei, M.S. eta Blendy, J.A. (2015), Multigenerational and transgenerational inheritance of drug exposure: The effects of alcohol, opiates, cocaine, marijuana, and nicotine, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 118, 21-33.

7. Eskerrak eta oharrak

Manu Araolaza-k Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) beka predoktorala jaso du eta Iraia Muñoa-Hoyos-ek Eusko Jaurlaritzako beka predoktorala jaso zuen. Horrez gain, buruturiko proiektu hau, ISCIII eta Osasun Ministerioak eta Eusko Jaurlaritzako Osasun Departamentuak emandako diru laguntzen bidez gauzatu dugu. LC-MS/MS teknika, Sgiker Analisirako Zerbitzu Zentralaren laguntzaz burutu dugu.

Emakumeekiko sexismo maila osasun arloko profesional eta ikasleengan: lehen hurbilketa

Goñi-Balentziaga, O.[1], Aliri, J.[1] , Prego-Jimenez, S.[1], Pereda-Pereda, E.[1], Pérez-Tejada, J.[3] eta Labaka, A.[2]

[1]Psikologia Klinikoa eta Osasunaren Psikologia eta Ikerketa Metodologia Saila, Psikologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). [2]Erizaintza II Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). [3]Onkologikoa Ospitalea.

Harremanetarako helbide elektronikoa: olatz.goni@ehu.eus

Laburpena

Osasun profesionalen emakumeekiko sexismo mailak osasun arretan eragina du, genero alborapenak eraginez. Emakumeekiko sexismo maila ezagutzeko ASI galdetegiaren bertsio laburtua aproposa da. Hori dela eta, 89 osasun arloko profesionali eta ikasleri galdetegi hau aplikatu zaie, beraien emakumeekiko sexismo mailaren inguruko informazioa eskuratu eta populazio orokorreko datuekin konparatzeko. Galdetegia sexismo anbibalentearen bi dimentsioak, etsaitasunezko eta onginahiko sexismoa, neurtzeko egokia dela adierazi dute analisi psikometrikoek. Osasun arloko lagin honetako partaideek emakumeekiko sexismo maila populazio orokorraren sexismo maila baino baxuagoa azaldu duten arren, lagin kopurua handiagoarekin joera hau aztertu beharko litzateke.

Hitz gakoak: ASI, genero alborapena, sexismoa, osasuna.

Abstract

Sexism towards women in health professionals and students impacts on medical care, producing gender biases. The shortened version of ASI scale is an appropriate method to measure the level of sexism toward women. Thus, 89 health professionals and students were evaluated with this scale to obtain information about their level of sexism towards women and compare it with the general population. The psychometric analyses indicate that the scale is appropriate to measure the two dimensions that constitute ambivalent sexism, hostile and benevolent sexism. Lower levels of sexism towards women have been found in this sample of health field in comparison to general population, although it must be analyzed in a wider sample.

Keywords: ASI, gender bias, sexism, health.

1. Sarrera eta motibazioa

Jarrera sexistak gaur gaurkoz gure gizartean barneraturik dauden egoerak dira. Sexismoa sexu biologikoa jarraikiz esperotako ezaugarri eta jokaera desberdinen ondorioz pertsonak diskriminatzea litzateke. Maiz sexismo hitza emakumeen kontrako jarrera moduan soilik ulertzen da, baina "sexistatzat" jo litezke emakume zein gizonei zuzenduriko edozein jarrera, positibo zein negatibo (Expósito et al., 1998). Honen atzean bada sexismo tradizionalaren eragina, emakumeak ahulagoak kontsideratu eta beraiekiko jarrera diskriminatzaileetan oinarritzen dena (Glick eta Fiske, 1996). Gaur egun aldiz, sexismoarekiko irudikapen berria zabaldu da, sexismo anbibalentea izenekoa. Ikuspuntu berri honen barruan bi sexismo mota bereizten dira, etsaitasunezko sexismoa, sexismo tradizionalaren ezaugarriak barneratzen dituena, eta onginahiko sexismoa, antzematen zailagoa dena eta emakumeak babestu beharreko izaki ahul bezala kontsideratu eta aldi berean, emakumeei dagokien ama eta emazte rol "naturala" gurtzen duten jarrerez osatua (Glick eta Fiske, 1996).

Sexismo jarrerek arlo askotan eragiten dute, hala nola, hezkuntzan, ekonomian, lan munduan, baita osasun arloan ere, genero alborapenak eraginez. Ruiz-Canterok eta Verdú-Delgadok (2004, 119. or.) honela definitzen dute osasun arloko genero alborapena "*osasun zerbitzuetan eta ikerketan parekoak ez diren jokaerak eragin ditzakeen eta hortaz sexu batentzat diskriminatzailea litzatekeen emakume eta gizonen arteko berdintasun eta desberdintasunen – izaerari, jarrerari zein arrazoinamenduari dagozkionak - planteamendu okerra*". Genero desberdintasun hauek erikortasunean eta hilkortasunean eragina dute (Shannon et al., 2019). Hori dela eta, azken bi hamarkadetan hainbat arlotan, hala nola,

prebentzioan, diagnostikoan, ikuspuntu terapeutikoan, pronostikoan eta eragin psikologiko eta sozialean, emakume eta gizonen arteko desberdintasunen inguruko ikerketak ugaritu egin dira (Baggio et al., 2013; Jacobs, 2009; Shannon et al., 2019). Ikerketa hauek osasun arloan emakume eta gizonen arteko desberdintasunak daudela agerian utzi dute, hala nola, ikerketa ezberdinek miokardioko infartu akutua pairatzen duten emakumeek gizonek baino diagnosi froga eta tratamendu gutxiago jasotzen dituztela ondorioztatu dute (Ayanian eta Epstein, 1991; Jacobs, 2009; Ruiz-Cantero, 2019). Zehazki, Espainian egindako ikerketa batean, emakumeengan diagnosi frogen atzerapena % 13,6 aldiz handiagoa zela ikusi zen gizonen aldean (Abásolo et al., 2014). Euskal Autonomia Erkidegoko ikerketei erreparatuz, datuak ildo beretik doaz eta esaterako, miokardioko infartu akutua pairatzen duten emakumeen diagnosirako eta tratamendurako baliabide gutxiago daude, eta hauen erabileran atzerapen handiagoa da gizonekin alderatuz (Telleria et al., 2017).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Genero alborapenak osasun arloan dituen ondorio kaltegarriak eta osasun arloko profesionalen sexismo mailak bertan duen eragina nabaria izan arren, ez da gure gizartean osasun profesionalen sexismo mailaren informazio nahikorik. Ikerketa honetarako eskuratutako laginaren mugak direla eta, ikerketa honen helburua osasun profesionalen sexismo mailaren inguruko lehen hurbilpen bat egin eta ikerketa sakonago bat egiteko informazio baliagarria eskuratzea izan da.

2.1. Berariazko helburuak

- Osasun arloko profesionalez eta ikaslez osaturiko lagin honen sexismo maila neurtzeko erabilitako ASI galdetegiaren egokitasunaren inguruko informazioa eskuratzea.
- Emakumeekiko etsaitasunezko eta onginahiko sexismo mailen eta gizonekiko etsaitasunezko eta onginahiko sexismo mailen artean subjektu barneko desberdintasunak dauden aztertzea.
- Osasun arloko profesionalen eta ikasleen lagin honen sexismo maila populazio orokorreko sexismo mailarekin alderatzea, arlo honetako langileen sexismo maila gainontzeko populazioarekin erkatu ahal izateko lehen hurbilpen bat burutzeko.

3. Metodologia

3.1. Parte-hartzaileak

Ikerketa pilotu honetan osasun arloko 89 profesionalek eta ikaslek parte hartu zuten, % 87 emakumeak, % 12 gizonak eta % 1 ez binarioa ziren. Batezbesteko adina 30,11 (*DT* = 9,42) izan zen, 20 eta 63 urte bitarteko adin tartearekin. Parte hartzaileen % 79a erizaintza arlokoak ziren, % 65 erizain profesionalak eta % 14 erizaintza ikasleak, eta gainontzekoak medikuntza arlokoak, laginaren % 14 mediku profesionalak ziren eta % 7 medikuntza ikasleak. Batezbeste 6,42 urteko lan esperientzia zuten (*DT* = 7,56). Laginaren % 94a Hego Euskal Herritarra zen eta % 78a Gipuzkoarra.

3.2. Prozedura

Ikerketa honek etika batzordearen oniritzia du (CEISH, erreferentzia: M10_2019_139). Lagina komenentzia bidez eskuratu zen, hau da, osasun arloko profesionalei eta ikasleei e-mailez eta telefono mugikor bidez esteka bat bidali zitzaien, eta ikerketan parte-hartzeko oniritzia eman zutenei online galdetegira bideratu zitzaien. Laginketa osasun arloko profesionalen bilgune heterogeneo ezberdinetara bidali zen, eta une oro jasotako erantzunen anonimotasuna eta konfidentzialtasuna mantendu zen.

3.3. Materiala

Emakumeekiko sexismo anbibalentea neurtzeko erabiltzen den frogarik ohikoena *Ambivalent Sexism Inventory* (ASI, Glick eta Fiske, 1996) litzateke. Galdetegi honek euskarazko bertsiorik ez duenez, gaztelerazko bertsioa erabili da (Expósito et al., 1998). Hortaz, ezin izan da hizkuntzaren alborapenaren eragina saihestu, baina hainbat ikerketek emaitza egokiak eskuratu zituzten gaztelerazko bertsioak Euskal laginean dituen ezaugarri psikometrikoak aztertu eta baremo bat osatu ostean (Garaigordobil eta Aliri, 2013). Bestalde, *Ambivalence Towards Men Inventory* (AMI, Glick eta Fiske, 1999) gizonenganako sexismo anbibalentea neurtzeko erabiltzen den galdetegia da. Ikerketa honetan gaztelerara egokitutako bi galdetegi hauen bertsio laburtuak erabili ziren (Rodriguez et al., 2009), Likert motako erantzunetan oinarrituta daudenak (0 = *erabat desados/totalmente en desacuerdo – 5= erabat ados/totalmente de acuerdo*). ASI galdetegiaren bertsio laburraren ezaugarri psikometrikoak aztertu zituen jatorrizko artikuluak fidagarritasun maila egokia azaldu zuen eskala osoarentzat, baita azpieskalentzat ere (sexismo anbibalentea α = 0,83; etsaitasunezko sexismoa α = 0,82; onginahiko sexismoa α = 0,67). AMI eskalaren fidagarritasun maila ere egokia izan zen (α = 0,79) (Rodriguez et al., 2009).

3.4. Datuen analisia

Datuak Jamovi 1.6.1. eta Mplus 8 software-ak erabiliz aztertu ziren. Item bakoitzaren batezbestekoa, desbiderazio tipikoa eta diskriminazio indizeak (item bakoitzak puntuazio total zuzenduarekin duen korrelazioa) kalkulatu ziren. Fidagarritasuna Cronbach-en alfa koefizientea erabiliz kalkulatu zen, eta galdetegiaren barne egitura teoriarekin bat datorren aztertzeko, baieztatzeko analisi faktoriala burutu zen. Pertsona berak ASI eta AMI eskaletan eskuratutako puntuazioen alderaketa, neurri errepikatuen ANOVA froga bidez burutu zen eta efektuaren tamaina ezagutzeko *eta partzial karratua* kalkulatu zen (η_p^2 = 0,01: txikia / η_p^2 = 0,059: ertaina / η_p^2 = 0,138: handia). Emakumeekiko sexismo maila populazio osoko mailarekin alderatzeko subjektu bakoitzak eskuratutako puntuazioaren pertzentilak eskuratu ziren, ASI bertsio luzeko baremo taulan oinarrituz (Garaigordobil eta Aliri, 2013).

4. Emaitzak

4.1. Osasun arloko profesionalengan eta ikasleengan ASI eskalaren funtzionamenduaren azterketa

Orokorrean, esan daiteke item guztiek puntuazio baxuak azaldu dituztela, hala, batezbestekoak ASI eskalako etsaitasunezko sexismoan 0,99 – 1,46 bitartekoak eta onginahiko sexismoan 0,80 – 2,07 bitartekoak izan dira.

Bertsio laburtuaren egokitzapeneko datuak baieztatuz, fidagarritasunaren adierazle den Cronbach-en alfek balio egokia azaldu dute ASI eskalan eta bi azpieskaletan (ASI α = 0,90; etsaitasunezko sexismoa α = 0,88; onginahiko sexismoa α = 0,80). Gainera, item guztiek diskriminazio indize egokiak azaldu dituzte (> 0,56), hau da, item guztiek galdetegiaren puntuazio totalarekin eta dimentsio bakoitzeko puntuazioekin erlazio indartsua dute (ikusi 1. eta 2. taulak).

1. taula. ASI eskalako etsaitasunezko sexismoko itemen informazioa.

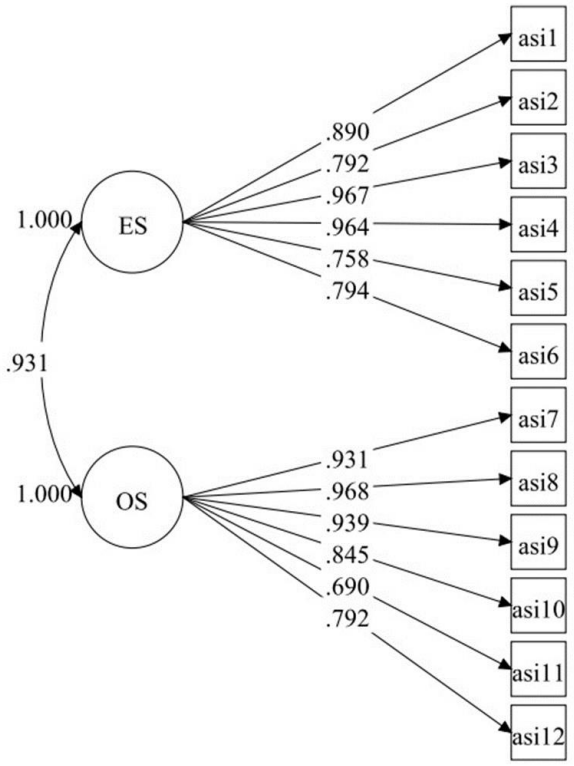
Etsaitasunezko sexismoari dagozkien itemak	Batez-bestekoa	Desbiderapen tipikoa	Diskriminazio indizea
1. Las mujeres intentan ganar poder controlando a los hombres.	1,08	0,94	0,81
2. Las mujeres exageran los problemas que tienen en el trabajo.	1,46	1,31	0,63
3. Una vez que una mujer logra que un hombre se comprometa con ella, por lo general intenta controlarle estrechamente.	1,04	1,00	0,75
4. Cuando las mujeres son vencidas por los hombres en una competencia justa, generalmente ellas se quejan de haber sido discriminadas.	0,99	0,83	0,80
5. Existen muchas mujeres que para burlarse de los hombres, primero se insinúan sexualmente.	1,42	1,35	0,63
6. Las mujeres feministas están haciendo demandas completamente irracionales a los hombres.	1,13	1,08	0,68

2. taula. ASI eskalako onginahiko sexismoko itemen informazioa.

Onginahiko sexismoari dagozkion itemak	Batez-bestekoa	Desbiderapen tipikoa	Diskriminazio indizea
7. Muchas mujeres se caracterizan por una pureza que pocos hombres poseen.	0,87	0,79	0,63
8. Las mujeres deben ser queridas y protegidas por los hombres.	0,80	0,62	0,62
9. Todo hombre debe tener una mujer a quien amar.	0,83	0,73	0,57
10. El hombre está incompleto sin la mujer.	1,21	1,37	0,56
11. Las mujeres en comparación con los hombres, tienden a tener un sentido más refinado de la cultura y el buen gusto.	2,07	1,62	0,57
12. Los hombres deberían de estar dispuestos a sacrificar su propio bienestar con el fin de proveer seguridad económica a las mujeres.	1,22	1,14	0,66

Eskalaren barne baliagarritasunari dagokionez, bertsio laburtuen jatorrizko ikerketan proposatutako dimentsio banaketa betetzen zen aztertzeko, baieztatzeko analisi faktoriala burutu zen eta bertan eskuratutako indizeak, hau da, eredu teorikoaren doikuntzaren egokitasuna adierazten duten indizeak egokiak dira (CFI = 0,979; TLI = 0,974). Datu hauek itemak bi azpieskalatan banatuta egotea egokia dela adierazten dute. Hala ere, dimentsio banaketa honetan dagoen errore maila altua litzateke (RMSE = 0,167), eta honen arrazoia lagin kopuru txikia izatea izan liteke. Item bakoitzak bere dimentsioarekin duen pisu faktoriala gainera oso egokia da (> 0,690). Etsaitasunezko sexismo eta onginahiko sexismo azpieskalen arteko erlazioa ere oso indartsua da (r = 0,931; p < 0,001), honek azpieskala batean puntuazio altua duten pertsonek beste azpieskalan ere puntuazio altua eskuratzen duela adierazten du (ikusi 1. irudia).

1. irudia. ASI eskalaren dimentsioak baieztatzen dituen analisi faktorialean eskuratutako balioak.



Oharra: ES = etsaitasunezko sexismoa; OS = onginahiko sexismoa.

4.2. Emakumeekiko eta gizonekiko sexismo mailen konparaketa

ASI eta AMI eskaletako puntuazio totalak konparatuz, AMIko balioak (1,34 ± 0,08) ASIko balioak (1,18 ± 0,08) baino handiagoak dira ($F_{(1,88)}$ = 7,581; p = 0,007; η_p^2 = 0,08). Hala ere, azpieskalak aztertzerakoan, desberdintasun hauek etsaitasunezko sexismoari soilik dagozkiola ikus dezakegu ($F_{(1,88)}$ = 16,221; p < 0,001; η_p^2 = 0,16). Zehazki, AMIko etsaitasunezko sexismoaren balioak (1,59 ± 0,10) ASIko dimentsio honetako balioak (1,19 ± 0,10) baino handiagoak izanik, gainera desberdintasun honen efektuaren tamaina handia litzateke. Onginahiko sexismoari dagokionez, aldiz, ez da desberdintasun estatistikoki esanguratsurik aurkitu ($F_{(1,88)}$ = 1,103; p = 0,151; η_p^2 = 0,02), AMI (1,08 ± 0,07) eta ASI (1,27 ± 0,07).

4.3. Osasun arloko profesionalen eta ikasleen emakumeekiko sexismo maila populazioko orokorraren aldean

Baremoei erreparatuz, bi ebaketa-puntu osatu ditugu, alde batetik 25. pertzentilean edo baxuago kokatzen diren pertsonek sexismo maila baxua dutela kontsideratu dugu eta aldiz 75. pertzentilean edo gorago kokatu direnak sexismo maila altua. Horrela ikusi da gure laginaren % 27k emakumeekiko etsaitasunezko sexismo maila baxua duela eta % 24k aldiz emakumeekiko onginahiko sexismo baxua duela. Portzentaje hauek baxuagoak dira sexismo maila altuaren kasuan, non portzentajeak % 9koak eta %6 koak diren hurrenez hurren.

5. Ondorioak

Lagin kopuruak eskuratutako emaitzen irismena mugatzen duten arren, hurrengo ikerketa zabalago bat burutu ahal izateko informazioa baliagarria eskaini du lan honek. Hala, emaitzek ASI galdetegiaren bertsio laburtua osasun arloko profesionalez eta ikaslez osatutako lagin honen emakumeekiko sexismo maila eta bere bi azpi-dimentsioak ezagutzeko egokia dela adierazi dute. Galdetegiak fidagarritasun maila oso egokia luke, hau da, sexismo maila neurtzeko orduan bere errorea oso txikia litzateke, edo beste modu batera esanda, galdetegia behin eta berriz pasako bagenu emaitza egonkorrak eskuratuko genituzke. Gainera, galdetegiak barne baliagarritasun egokia azaldu du, hau da, gaur egungo sexismoaren inguruko teoria nagusiek barneratzen dituzte bi dimentsioen, etsaitasunezko sexismoaren eta onginahiko sexismoaren, inguruko informazioa biltzen du.

Bestalde, emakumeekiko eta gizonekiko onginahiko sexismo maila antzerakoak eskuratu diren bitartean, etsaitasunezko sexismoan, gizonekiko sexismo maila altuagoak azaldu dituzte emakumeekiko sexismoaren aldean. Hau interpretatzerakoan laginaren % 87a emakumeak zirela kontuan izan behar da, eta ikerketa ezberdinek erakutsi dutenez, emakumeek errazago onartzen dute gizonekiko etsaitasunezko sexismoa emakumeekiko etsaitasunezko sexismoa baino (Glick eta Fiske, 1996, 1999). Izan ere, emakumeek errazago identifikatzen dute beraiekiko etsaitasunezko sexismoa, eta hortaz, errazago arbuiatzen dute. Gainera, baliteke gizartean emakumeekiko etsaitasunezko sexismoaren inguruko kutsu negatiboa gizonekiko etsaitasunezko sexismoa baino barneratuago egotea, nahiz eta ez den ASI eta AMI eskalen eta gizarte desiragarritasunaren arteko erlaziorik aurkitu (Expósito et al. 1998; Glick eta Fiske, 1996, 1999).

Azkenik, populazio orokorreko datuekin alderatuz, osasun arloko profesionalez eta ikaslez osatutako lagin honen portzentaje handiagoa kokatzen da 25. pertzentiletik behera 75. pertzentiletik gora baino. Izan ere, oso portzentaje baxua kokatzen da 75. pertzentiletik gora. Hortaz, esan genezake, lagin hau osatzen duten osasun arloko profesionalen eta ikasleen emakumeekiko sexismo mailak populazio orokorrarenak baino baxuagoak direla. Osasun arloko profesionalen eta populazioaren sexismo mailaren desberdintasunen inguruan oso ikerketa gutxi diren arren, bada antzeko emaitzak aurkitu dituenik, Turkiako osasun arloko profesionalek bertako populazioaren aldean sexismo maila baxuagoak azaldu baizituzten (Özerdoğan et al., 2017). Datuak positiboak badira ere, lan honetan buruturiko inferentziek lagin honetarako soilik balio dute, ikerketa honetan parte hartu duten pertsona kopuru mugatua eta bere hetereogeneotasun faltak datuen irismena mugatzen baidute.

6. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa honetan eskuratutako datuek osasun profesionalen eta ikasleen lagin honetan emakumeekiko sexismo maila baxuak azaltzen dituen arren, osasun arloan genero alborapena badela adierazteko duten datuak baditugu. Hori dela eta, gai honen inguruko ikerketa konplexuago eta zabalagoaren beharra legoke, alde batetik lagin handiago eta hetereogeneoago batean burutua, eta bestetik, genero kontzientzia eta genero ikuspegi bezalako konstruktuak neurtuz. Bestalde, beste hainbat arlotan gertatzen den bezala, galdetegiak bideratuta dauden laginaren ama-hizkuntzara egokitzea ezinbestekoa litzateke euskal gizartearen sexismo mailaren ezagutza hobea izateko.

7. Erreferentziak

Abásolo, I., Negrín-Hernández, M. A. eta Pinilla, J. (2014). Equity in specialist waiting times by socioeconomic groups: Evidence from Spain. *European Journal of Health Economics, 15*(3), 323–334. https://doi.org/10.1007/s10198-013-0524-x

Ayanian, J. eta Epstein, A. (1991). Differences in the use of procedures between women and men hospitalized for coronary heart disease. *The New England Journal of Medicine, 325*(4), 221-225.

Baggio, G., Corsini, A., Floreani, A., Giannini, S. eta Zagonel, V. (2013). Gender medicine: A task for the third millennium. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 51*(4), 713–727. https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0849

Expósito, F., Moya, M. C. eta Glick, P. (1998). Sexismo ambivalente: Medición y correlatos. *Revista de Psicologia Social*, *13*(2), 159–169. https://doi.org/10.1174/021347498760350641

Garaigordobil, M. eta Aliri, J. (2013). Ambivalent Sexism Inventory: Standardization and normative data in a sample of the Basque Country. *Behavioral Psychology, 21*(1), 173-186.

Glick, P. eta Fiske, S. T. (1996). The Ambivalent Sexism Inventory: Differentiating hostile and benevolent sexism. *Journal of Personality and Social Psychology, 70*(3), 491–512. https://doi.org/10.1037/0022-3514.70.3.491

Glick, P. eta Fiske, S. T. (1999). The Ambibalence Toward Men Inventory. *Psychology of Women Quarterly, 23*(3), 519–536. https://doi.org/10.1111/j.1471-6402.1999.tb00379.x

Jacobs, A. K. (2009). Coronary intervention in 2009. Are women no different than men? *Circulation: Cardiovascular Interventions, 2*(1), 69–78. https://doi.org/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.108.847954

Özerdoğan, N., Coşkun, A., Ergin, A., Özdilek, R., Doğan-Merih, Y. eta Gönç, T. (2017). Sexism among healthcare professionals working in women's health in inpatient care. *The Journal of Academic Social Science*, *57*, 21-39.

Rodríguez, Y., Lameiras, M. eta Carrera-Fernández, M.V. (2009). Validación de versión reducida de las escalas ASI y AMI en una muestra de estudiantes españoles. *Psicogente. 12*(22), 284-295.

Ruiz-Cantero, M. T. eta Verdú-Delgado, M. (2004). Sesgo de género en el esfuerzo terapéutico. *Gaceta Sanitaria, 18*(Supl 1), 118–125. https://doi.org/10.1157/13062260

Ruiz-Cantero, M.T. (2019). Perspectiva de género en medicina.Fundación Dr. Antoni Esteve. ISBN: 978-84-947204-5-1

Shannon, G., Jansen, M., Williams, K., Cáceres, C., Motta, A., Odhiambo, A., Eleveld, A. eta Mannell, J. (2019). Gender equality in science, medicine, and global health: where are we at and why does it matter? *The Lancet, 393*(10171), 560–569. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)33135-0

Telleria, M., Loma, A., Artaecheverria, J., San Roman, K. G., Rumoroso, J. R., Andres, A., Vazquez, P. eta Oria, C. (2017). Miokardioko infartu akutuen maneiua Euskal Autonomia Erkidegoan (EAE) sexuaren arabera, Bihotzez sarearen eragina. *Osagaiz. 1*(1), 16-25. https://doi.org/10.26876/osagaiz.1.2017.76

8. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa honek ez du diru-laguntza publikorik zein pribaturik jaso.

Aurresan ezin den Estres Kroniko Moderatua (Chronic Unpredictable Mild Stress, CUMS): depresioaren animalia-eredua

Erkizia-Santamaria, I.[1], Ortega, J.E.[1,2,3], Horrillo, I.[1,2]

[1]Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Farmakologia Saila. Leioa, Bizkaia
[2]Centro de Investigacón Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)
[3]Biocruces Bizkaia
ines.erkizia@ehu.eus

Laburpena

Depresioa gaixotasun mental garrantzitsuenetakoa da egungo gizartean. Haren oinarri neurobiologikoak erabat argi ez dauden arren, bai faktore biologikoek, bai ingurumenekoek ere depresioa garatzeko arriskua areagotzen dutela jakina da. Azken hauen artean aipatzekoa da estresa, ikerketa anitzek deskribatu baitute estresaren eta depresioaren arteko erlazioa. Gaixotasun psikiatrikoen ikerketarako funtsezkoak dira animalia-ereduak. Kasu honetan, estres kronikoa eragitean oinarritzen den animalia-eredu baten garapena burutu da. *Chronic Unpredictable Mild Stress* (CUMS) baliotasun handiko depresioaren eredua da, karraskarietan erabiltzen dena. Ikerketa honetan, portaera-frogen bidez nahiz markatzaile biologikoak neurtuz, animalia-ereduaren ebaluazioa burutu dugu.

Hitz-gakoak: depresioa; estresa; animalia-ereduak; neuropsikofarmakologia.

Abstract

Depression is one of the most relevant mental diseases in current society. Its neurobiological bases have yet not been elucidated, but it is well known that biological and environmental factors play an important role in the development of the condition. Stress has been established as one of the main contributors, as research studies have correlated it with the disease. Animal models are essential for the research of psychiatric disorders. In this case, an animal model based on the exposure to chronic stress has been developed. Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS) is a widely used rodent model of depression, which has high validity. In the current study, the model has been produced and evaluated through behavioural tests and biological marker measurements.

Keywords: depression; stress; animal-models; neuropsychopharmacology.

1. Sarrera eta motibazioak

Gaixotasun mentalen artean, depresioa ohikoena da gaur egun, izan ere, mundu mailan 250 milioi pertsona baino gehiagok pairatzen du, Munduko Osasun Erakundearen arabera (WHO, 2020). Bere intzidentziak gorakada izan du azken urteetan, eta joera hori mantentzen ari dela dirudi, hamarkada honen amaieran ezgaitasun-kausarik ohikoena izango dela estimatzen baitute adituek (Malhi eta Mann, 2018). Depresioaren prebalentzia emakumezkoengan gizonezkoengan neurtu denaren bikoitza da (Malhi eta Mann, 2018).

Depresioaren sintoma nagusiak, Gaixotasun Mentalen Eskuliburu Diagnostiko eta Estatistikoak (DSM-V) jasotzen dituen moduan, bederatzi multzok osatzen dituzte: tristura, barne-hustasuna eta itxaropen eza; anhedonia (plazerra sentitzeko ezgaitasuna); pisua galtzea edo irabaztea eta jateko gogoaren galera; insomnioa edo hipersomnia; atzerapen psikomotorea; energia falta eta nekea; arreta mantentzeko zailtasuna; gutxiespen eta erruduntasun sentimenduak; eta heriotzaren edo suizidioaren inguruko ideiak (American Psychiatric Association, 2013). Hauez gain, oso ohikoa da paziente deprimituek antsietatea pairatzea, eta maiz oroimena nahiz beste funtzio kognitiboak ere kaltetuta daude gaixoetan. Sintoma hauek guztiek ezgaitasunera eramaten dute pazientea, eta kasurik larrienetan suizidioa ere ekar dezakete.

Depresioaren tratamendu farmakologikoa psikoterapiarekin konbinatu ohi da, sintomen maneiu optimoa bilatzeko. Antidepresiboei dagokionez, hainbat multzotan sailkatzen dira, haien ekintza mekanismoaren arabera. Era berean, ekintza mekanismo ezberdineko antidepresiboek indikazio ezberdinak dituzte, eta pazientearen ezaugarriekin hobekien egokitzen direnen hautaketa egiten dute lehen mailako arretaren medikuek nahiz psikiatrek. Gehien preskribatzen diren antidepresibo klasikoek monoaminen eskuragarritasuna areagotzen dute, eta zenbait azpitaldetan sailkatzen dira: monoaminooxidasen inhibitzaileak, antidepresibo triziklikoak eta monoaminen birxurgapenaren inhibitzaileak. Erabilera mugatuagoa duten beste antidepresibo klasikoen artean trazodona eta mirtazapina dira aipagarriak. Berriki garatu diren beste batzuek agomelatina, tianeptina edo bortioxetina esaterako, mekanismo alternatiboak dauzkate, baina haien eraginkortasuna murritzagoa da orokorrean. Depresioaren tratamendu farmakologikoan eman den azken aurrerapausoa ketaminaren onarpena izan da: berehalako eragin antidepresiboa duela erakutsi du entsegu klinikoetan, baita depresio erresistentean ere (Molero et al., 2018). Patologiaren oinarri neurobiologikoak ez daude guztiz argi, hori dela eta tratamendua ez da erabat eraginkorra: pazienteen heren batek ez dio farmakoei erantzuten. Hori horrela, ezinbestekoa da tratamenduaren eraginkortasun-tasa areagotzeko gaixotasunaren kausak eta alterazio neurobiologikoak ikertzea.

1.1. Depresioren etiologia

Depresioaren etiologia ezezaguna da oraindik, eta faktore anitzek eragiten dute gaixotasunaren agerpenean; genetikoak eta psikosozialak, nahiz neurotransmisioaren, hormonen, immunitate-sistemaren eta neurogenesiaren asaldurak. Gaixo deprimituen organismoan hainbat desoreka deskribatu dira: hipotalamo-hipofisi-adrenal (HHA) ardatzaren hiperaktibazioa, erantzun immunearen erregulazio okerra, nerbio-sistema sinpatikoaren eta parasinpatikoaren arteko desoreka eta abar (Nedic Erjavec et al., 2021). Estres kronikoarekiko esposizioak ere paper garrantzitsua jokatzen du depresioaren agerpenenean nahiz fisiopatologian. Izan ere, populazioaren estres-mailak gora egin du azken hamarkadetan, garapen sozial eta ekonomikoaren hazkuntza direla eta (Iwata et al., 2012). Estimulu estresagarriak, bai psikologiko bai fisikoak, depresioarekin lotu dira, erantzun immunea eta inflamazio-prozesuak abiarazi ditzaketela postulatu baita. Zentzu honetan, hainbat biomarkatzaile identifikatu dira depresioa eta inflamazioa elkar erlazionatu dituztenak.

Alde batetik, HHA ardatza estres erantzuna erregulatzeaz arduratzen da, bere rol fisiologikoa erantzun neuroendokrinoen sorrera integratua baita; kanpotik nahiz barnetik datozen estres-estimuluei aurre egiteko, eta organismoaren biziraupena bermatzeko. Seinalizazio bide honen asaldurak deskribatu dira behin eta berriro gaixo deprimituetan: pazienteen %73k kortisolaren kontzentrazio areagotuak dauzka odolean (Nedic Erjavec et al., 2021), hipofisiaren tamaina eta aktibitatea ere handituak agertzen dira (Nemeroff eta Vale, 2005), glukokortikoideen hartzaileen (GR) desentsibilizazioa eta funtzio okerra pairatzen dute, eta ardatzaren *feedback* negatiboak huts egiten du. Ez hori bakarrik, HHA-ren gainaktibazioa eta kortisol areagotua tratamendu antidepresiboarekiko erantzun gabeziarekin ere lotu dira, baita anhedonia maila altuagoarekin ere. Gainera, estres goiztiarra pairatu duten pazienteek HHA ardatzaren alterazioak aurkezten dituzte (Nedic Erjavec et al., 2021).

Beste alde batetik, paziente deprimituen sistema immunearen anormaltasunak deskribatu dira behin eta berriro; bai periferian, bai maila zentralean ere. Horrek depresioaren teoria neuroinflamatorioaren garapena ekarri du. Hipotesi horren arabera, periferiako zitokina proinflamatorioek hantura zentrala eragiten dute, eta, epe luzean, garuneko zenbait eremuren atrofia eta neurogenesiaren kalteak sortuko lituzkete. Depresioarekin lotu diren hanturaren biomarkatzaile garrantzitsuenak interleukina-6 (IL-6) eta C proteina erreaktiboa (CRP) izan dira, korrelazio estua erakutsi baitute anhedoniarekin (Troubat et al., 2020).

Estres-erantzunaren sistema estuki lotuta dago sistema immunearen funtzioarekin: estres kronikoak gradu baxuko inflamazioa eragin dezake eta HHA ardatzaren disfuntzioa hantura-erantzunean askatzen diren mezulariekin (zitokinak) erlazionatu da (Nedic Erjavec et al., 2021). Estresa depresioa garatzeko arrisku faktore nagusien artean dago. Gaixotasunaren eta estres kronikoaren arteko erlazioa ikerketa ugarik kontsolidatu duten arren, mekanismo zehatzak ikertzeko premia eztabaidaezina da.

1.2. Depresioaren animalia-ereduak

Depresioa eta beste gaitz psikiatriko ugari aztertzeko ezinbestekoa da animalia-ereduen erabilera. Gaixotasunaren sintoma bat edo gehiago erreplikatzen dituzte, eta oinarri biologiko eta fisiopatologikoa aztertzen laguntzen dute. Era berean, tratamendu farmakologikoaren ebaluazioa gauzatzeko erabilgarriak dira. Animalia-ereduek hiru baliotasun-irizpide nagusi bete behar dituzte: **eduki-baliotasuna**, animalia-ereduaren eta gaixoen sintomatologiaren antzekotasuna jasotzen duena; **konstruktu-baliotasuna**, animalia-eredua gizakietan behatzen diren alterazioetan oinarritzen dena; **aurreikuspen-baliotasuna**, patologia tratatzeko erabiltzen diren farmakoek animaliaren sintomak arintzeko gaitasuna duena (Willner, 2017a). Depresioaren animalia-eredu anitz garatu eta erabili dira, gaixotasunaren faktore etiologikoetan oinarrituz: inguruneko balditzen aldaketa, estres kroniko edo akutuaren esposizioa, farmakoen administrazioa… Beste eredu batzuek, konstruktu-baliotasunik ez duten arren, sintomen erreprodukzio egokia eskaintzen dute, hala nola prozedura kirurgikoek (usain-bulbektomia) edo manipulazio genetikoak. Hala, haien guztien artean *Chronic Unpredictable Mild Stress* (CUMS, Aurresan ezin den Estres Kroniko Moderatua) ereduaren erabilera oso hedatua dago. 80ko hamarkadan garatu zen (Katz, 1982), eta depresioa ikertzeko ereduen artean fidagarri eta sendo sailkatzen da, hain zuzen, aipatutako baliotasun irizpideak betetzen dituelako (Willner, 2017a). Karraskariekin erabiltzen den animalia-eredua da, bai arratoiekin eta baita saguekin ere.

CUMS animalia-ereduan depresioarekin lotutako asaldura biokimiko eta neurokimikoak behatu dira. Esaterako, HHA ardatzaren gehiegizko aktibitatea, kortikosterona maila areagotuak, hipokanpoaren tamaina murriztua, garunazal prefrontalaren kalteak eta atrofia, amigdalaren funtzioaren handipena, neurotoxikotasuna eragiten duten prozesu biokimikoak (kinureninen bide metabolikoaren gainaktibazioa), eta abar (Willner, 2017a).

Animalia-ereduen portaeraren alterazioak ebaluatzeko portaera froga espezifikoak erabiltzen dira, kasu honetan, depresioaren sintomen adierazle direnak. Azukrearekiko zaletasunaren froga (*Sugar Preference Test,* SP), anhedonia neurtzeko baliatzen da. Animalia normalek azukrearekiko zaletasuna garatzen dute azukredun ura eta ur soila aldi berean eskaintzen zaizkienean; aldiz, anhedonia, pairatzen duten animaliek ez dute zaletasun hori garatzen, ordainsari-zirkuituen alterazioak agertzen baitira (Willner, 2005). Sintoma prodepresiboak eta farmako antidepresiboak identifikatzeko froga garrantzitsuenen artean, behartutako igeriketaren froga dugu (*Forced Swimming Test,* FST). Bertan, karraskariak urez betetako kubeta batean sartzen dira, eta 4-6 minututako denbora tartean igeriketa eta geldirik egotearen portaerak kuantifikatzen dira. Geldirik geratzen diren animaliek etsipena adierazten dutela onartzen da (Castagné et al., 2011), eta gertakari hau egoera depresiboarekin erlazionatu da. Antsietatea, depresioarekin batera agertzen den ohiko sintoma izanik, gurutze goratuaren labirintoa (*Elevated Plus Maze,* EPM) izeneko frogan neurtzen da (Carobrez eta Bertoglio, 2005). Bertan, sagua edo arratoia gurutze formako egitura batean kokatzen da, bi beso ireki eta beste bi estalita dituena. Antsietate mailaren araberako portaera erakusten du animaliak 5 minutu irauten dituen frogan. Hori horrela, antsietate-maila normala duenean, karraskariak miatzeko joera duenez, beso irekietan igarotzen du denbora gehiena. Aldiz, antsietate-maila altua beso irekietan pasatako denboraren murrizketarekin erlazionatu da.

CUMS animaliek sintomatologia depresiboa aurkezten dute azaldutako portaera-frogetan. SP frogak kronikoki estresatutako animaliek anhedonia pairatzen dutela demostratzen du, azukrea duen uraren kontsumo baxuagoa dutelako kontrolen aldean; FST-an, geldirik dauden denbora luzeagoa da CUMS animalietan, etsipen jokabidearen adierazle (Willner, 2005). Antsietate mailari dagokionez, estres kronikoa jasandako animaliek denbora laburragoa pasatzen dute EPM-aren beso irekietan (Monteiro et al., 2014). Sintoma depresiboen indikatibo diren beste ezaugarri batzuk ere agerikoak dira estres prozedurak jaso dituzten animalietan, adibidez, pisu-hartzearen murrizketa, ilajearen egoera hondatzea, eta abar (Nollet et al., 2013). Farmako antidepresiboen tratamendu kronikoak portaera anormal hauen leheneratzea lortzen du, hain zuzen ere aipatutako aurreikuspen-baliotasun irizpidea betetzen baitu.

CUMS eredua garatzeko protokolo ezberdinak erabiltzen dira ikerketa-laborategi ezberdinetan, ez dago prozedura estandarizaturik eta metodologia bakoitzak emaitza aldakorrak izan ditzake animalien

portaeran nahiz aldaketa bio-neurokimikoetan (Willner, 2005). Orokorrean, modu aleatorioan aplikatutako estres estimuluen egutegi bat aplikatzen zaie animaliei, zenbait astetako iraupena duena, 4-8 aste bitartean kasu gehienetan. Erabiltzen diren estimulu estresagarrien intentsitatea arina edo moderatua izan behar da, era akutuan animaliaren ongizatearentzat kaltegarriak izan gabe, baina era kronikoan aplikatuta, sintoma prodepresiboak eragingo dituztenak. Era berean, estimuluen ordena ausazkoa mantentzea garrantzitsua da animaliak ohitu ez daitezen (Nollet et al., 2013; Muscat eta Willner, 1992). CUMS protokoloetan erabiltzen diren estimulu estresagarrien artean ohikoenak hurrengoak dira: kaiolako lurra bustitzea edo erabat kentzea, kaiolaren inklinazioa, argi-iluntasun zikloaren disrupzioa, janari- edo/eta ur-gabezia, mugimenduen murrizketa, ingurugiroan zarata sortzea, ur hotzean igeriketa, eta abar (Willner, 2017b). Estimulu horietako batzuek iraupen luzea dute, hots, 12 eta 24 ordu bitartean; beste batzuk aldiz laburrak dira, eta errepikakorrak izan daitezke.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Ikerketa-lan honen helburua CUMS depresioaren animalia-eredua garatzea da. Baliotasun handiko animalia-eredu hau abiarazteak farmako eta estrategia antidepresibo berrien azterketa ahalbidetuko du. Depresioaren garrantzi soziala eta intzidentzia nabarmenak dira, eta aipatu bezala, gorantza doaz. Hau dela eta, tratamenduen hobekuntza premiazkoa da. Animalia-eredu hau tresna baliotsua izan daiteke farmakologia basikoaren ikuspuntutik, farmako berrien *screening* prozesua aurrera eramateko.

Helburu horrekin, Euskal Herriko Unibertsitateko Farmakologiako Saileko ikerketa-taldeek eskuragarri dauzkagun baliabideak eta instalazioak erabiliko dira CUMS animalia eredua sortzeko. Ikerketaren muina hiru fase nagusitan garatuko da:

I. CUMS protokoloaren diseinua eta aplikazioa, C57BL/6J anduiko saguak erabiliz.
II. Portaera frogak: animalien sintomatologia depresiboaren nahiz antsietatearen ebaluazioa.
III. Disekzioa eta ehunen estrakzioa, azterketa anatomiko, biokimiko eta neurokimikoak burutzeko.

3. Ikerketaren muina

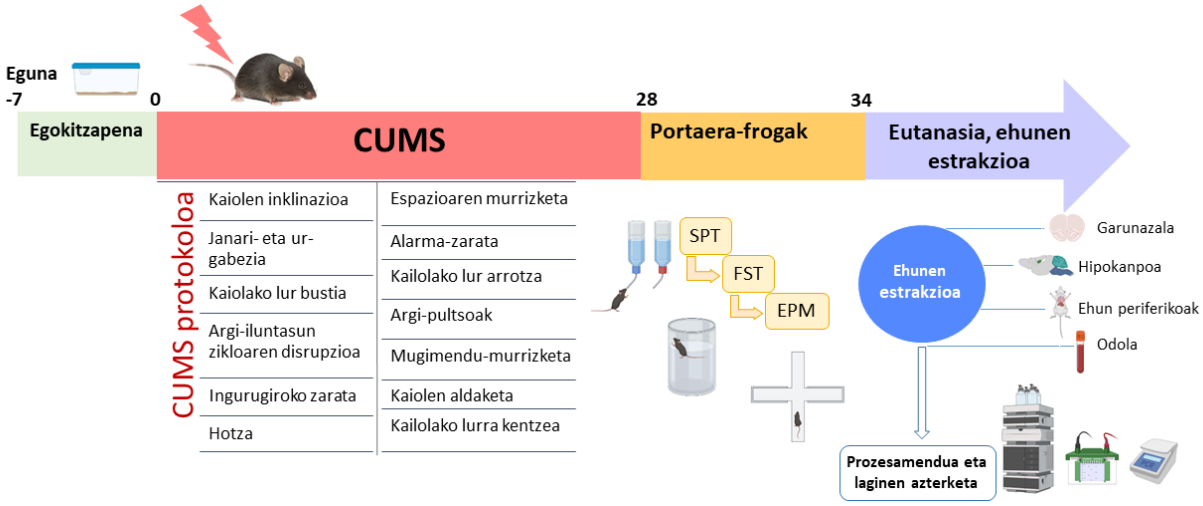
CUMS animalia-eredua ekoizteko erabiliko den protokoloaren diseinua 60 erreferentzia bibliografiko baino gehiago kontsultatu ondoren egin da. Ereduaren hastapenetatik hasita (Katz, 1982), azken lau hamarkadetan izan duen eboluzioa jarraitu da, protokoloen (Nollet et al., 2013) eta berrikuspenen bidez (Willner, 2005, 2017a, 2017b), eta egin diren meta-analisi berrienak hartu dira kontuan (Antoniuk et al., 2019).

Azken urteotan, ikerketa laborategien aldetik, CUMS prozedurak leuntzeko joera nabarmena izan da: aplikatzen diren estres-estimuluen intentsitatea baxuagoa da egun, hasierako urteetakoen aldean. Fenomeno honek bi kausa nagusi ditu atzean. Alde batetik, aspektu etikoa (Willner, 2017a), izan ere, egun animaliekin egiten diren ikerketa-proiektu guztiak onartu behar ditu eskudun aginpideak; Animaliekin egiten den Esperimentaziorako Etika Batzordeak, Euskal Herriko Unibertsitatearen kasuan. Era berean, gizartearen pertzepzioak bilakaera handia izan du animalien ustiapenari dagokionean, eta animalien tratuarekiko tolerantzia atariak nabarmen egin du behera. Beste alde batetik, konstruktu baliotasun printzipioari jarraiki, estimulu estresagarri arin/moderatuek parekotasun handiagoa dute depresioaren egiazko kausekin. Antzina erabiltzen ziren estimulu estresagarrietako batzuk ur- edo janari-gabezia periodo luzeak (40 ordu), beroagatiko estresari esposizioa (40ºC), bainua izotz-uretan ala shock-erako estimuluen aplikazioa dira, baina egun halako prozedura agresiboak ekiditen dira (Willner, 2017a).

Ikerlan honetan 8 astetako C57BL/6J saguak erabili dira, eta talde esperimentala 48 sagukoa izan da. Aste beteko egokitzapen-aldiaren ostean, esperimentazioa hasi dugu, **1. irudian** laburbiltzen den eran. Animalia kopuru osoaren erdiari (24 sagu) aplikatu zaie CUMS protokoloa 4 astetan zehar; beste erdiak kontrol taldea osatu du, eta estabulazio-baldintza normaletan mantendu dira: 19-22ºC-tako tenperatura, %50-60-ko hezetasuna, 12:12 ordutako argi-iluntasun zikloa, *ad libitum* jana eta ura. Euskal Herriko Unibertsitateko Animaliekin egiten den Esperimentaziorako Etika Batzordeak prozedura

guztiak onartu ditu. Hautatutako estres estimuluak ausazko ordenan banatu dira 4 astetako egutegi batean, eta haien arteko ausazko konbinazioak prestatu dira, egunean estres-estimulu bat baino gehiago jaso zezaten saguek. Behin 4 astetako CUMS prozedura beteta, animalia guztiak portaera frogetan ebaluatu dira: SP, FST eta EPM. Azkenik, animaliak sakrifikatu dira, ehunen estrakzioa egiteko. Eskuratutako garun-eremuak *in vitro* determinazioetan erabili dira: monoaminen erauzketarako ehunaren homogeneizazioa, eta bereizmen-handiko kromatografia likido (HPLC) bidezko azterketa. Bestalde, ehun periferikoen azterketa egin da (birikak, guruin adrenalak), nahiz plasmako hainbat substantziaren kuantifikazioa (IL-6, kortikosterona), ELISA entseguen bidez.

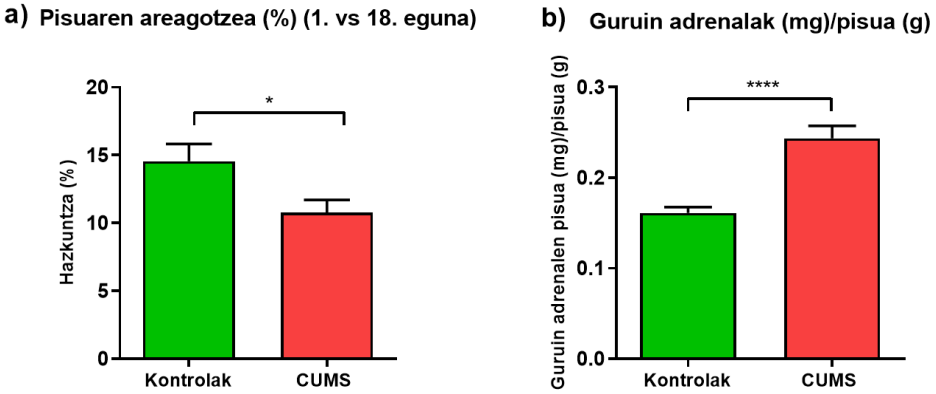
1. irudia. Esperimentuaren denbora-diagrama: egokitzapen aldia, CUMS protokoloa, portaera-frogak, disekzioa eta ehunen azterketa.



4. Ondorioak

Esperimentu-multzo honetan emaitza positiboak nahiz negatiboak lortu ditugu. CUMS protokoloa jasan duten animaliek aldaketa nabariak izan dituzte maila mikroskopiko nahiz makroskopikoan. Pisu-irabaztea nabarmenki baxuagoa izan da estresatutako saguetan, kontrolekin alderatuta (**2. irudia, a**). Honez gain, guruin adrenalen hipertrofia garatu dute (**2. irudia, b**). Portaera-frogetan, alabaina, emaitzak ez dira estatistikoki esanguratsuak, eta ez dute CUMS animalien sintoma prodepresiboen agerpen argirik adierazten.

2. irudia. CUMS protokoloak eragindako alterazio makroskopikoak. **a)** Gorputz-pisuaren areagotzea (%) CUMS protokoloaren 28. egunean, hasierako pisuarekiko. CUMS animalien hazkuntza txikiagoa izan da, era estatistikoki esanguratsuan, kontrolekin alderatuta (*Unpaired t test*, * p<0,05). **b)** Guruin adrenalen pisua gorputz-pisuarekiko normalizatuta (mg/g), CUMS egutegiaren ondoren. CUMS animalien guruin adrenalak kontrolenak baino handiagoak ziren, era estatistikoki esanguratsuan (*Unpaired t test,* **** p<0,0001).



5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

CUMS depresioaren animalia-ereduak aldaketa garrantzitsuak izan ditu lehen aldiz garatu zenetik. Eboluzio honek prozeduren finketa ahalbidetu du, eta baliotasun-irizpideak zehaztasun handiagoz betetzea. Eredu hau ezinbestekotzat jotzen dute aditu batzuek depresioaren neurobiologiaren inguruan egin diren aurkikuntza anitz azaltzeko. Ez hori bakarrik, tratamendu antidepresiboaren aurrerapena ere baimendu du, farmakoek CUMS animaliek pairatzen dituzten alterazioak leheneratzeko gaitasuna erakusten dutelako. Garrantzi berezia du ereduak aspektu honetan, terapia antidepresiboan aurrerapen urriak egin direlako azken hamarkadetan. Gainera, ereduaren konstruktu-baliotasuna bikaina da, eta honek balio translazionala ematen dio.

Animalien ongizatearen ikuspegitik ere CUMS ereduak abantailak eskaintzen ditu, estrategia moderatua baita patologia psikiatriko baten sintomatologia karraskarietan eragiteko. Historian zehar erabili izan diren beste eredu batzuk baino askoz leunagoa da, eta animalien sufrimendua hein batean murrizteko aukera eman du.

Gure laborategian martxan ipinitako CUMS protokoloa lehen aurrera pausu bat izan da eredu honen aplikazioekin lan egiten hasteko. Prozeduren hobekuntzaren beharra ukaezina da, portaera frogen emaitzak argitzeko, besteak beste. Estres egutegiarengan negatiboki eragin duten hainbat faktore identifikatu dira, eta hauek zuzentzeko azterketa bat egin da. Lortutako ondorioen arabera, protokoloaren errefinamendu-aldaketak abiaraziko dira datorren hilabeteetan.

Azkenik, estresaren eta depresioaren arteko erlazioa behin eta berriro erakutsi dute ikerketek. Estresak organismoan eragiten dituen erantzun fisiologikoak nahiz prozesu patologikoak sakonki aztertzeko premia du komunitate zientifikoak, gizartean geroz eta zabalduago dagoen fenomenoa da eta. CUMS eta bestelako animalia ereduek prozesu horien aspektu ezberdinak ikertzeko aukera ematen dute, eta gizarte osoaren onurarako aurkikuntza bultzatuko dute.

6. Erreferentziak

American Psychiatric Association. (2013). Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-5). Editorial Médica Panamericana, Espainia.

Antoniuk, S., Bijata, M., Ponimaskin, E., & Wlodarczyk, J. (2019). Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 99, 101-116.

Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1193-1205.

Castagné, V., Moser, P., Roux, S., & Porsolt, R. D. (2011). Rodent models of depression: Forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 55(1), 8.10A.1-8.10A.14.

Iwata, M., Ota, K. T., & Duman, R. S. (2012). The inflammasome: Pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 31, 105-114.

Katz, R. J. (1982). Animal model of depression: Pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacology*, *Biochemistry and Behavior*, 16(6), 965-968.

Malhi, G. S., & Mann, J. (2018). Depression. The Lancet, 392:2299-312.

Molero, P., Ramos-Quiroga, J. A., Martin-Santos, R. R., Calvo-Sánchez, E. E., Gutiérrez-Rojas, L. L., & Meana, J. J. (2018). Antidepressant efficacy and tolerability of ketamine and esketamine: A critical review. *CNS Drugs* 32, 411-420.

Monteiro, S., Roque, S., de Sá-Calçada, D., Sousa, N., Correia-Neves, M., & Cerqueira, J. J. (2015). An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. *Frontiers in Psychiatry,* 6, 6.

Muscat, R., & Willner, P. (1992). Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: A methodological analysis. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 16(4), 507-517.

Nedic Erjavec, G., Sagud, M., Nikolac Perkovic, M., Svob Strac, D., Konjevod, M., Tudor, L., et al. (2021). Depression: Biological markers and treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 105, 110139.

Nemeroff, C. B., & Vale, W. W. (2005). The neurobiology of depression: Inroads to treatment and new drug discovery. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 66 Suppl 7, 5-13.

Nollet, M., Guisquet, A. L., & Belzung, C. (2013). Models of depression: Unpredictable chronic mild stress in mice *Current Protocols in Pharmacology*, Chapter 5, Unit 5.65.

Troubat, R., Barone, P., Leman, S. S., Desmidt, T. T., Cressant, A., Atanasova, B., et al. (2020). Neuroinflammation and depression: A review. *European Journal of Neuroscience* 53(1), 151-171.

Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52(2), 90-110.

Willner, P. (2017a). The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*, 6(C), 78-93.

Willner, P. (2017b). Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. *Neurobiology of Stress*, 6(C), 68-77.

World Health Organization [Internet]. Geneva: World Health Organization, c2020. Depression. Fact sheet: 2020 Urt 30 [Kontsulta: 2021-02-10]; [3 or.]. Eskuragarri: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa-proiektu hau Euskal Herriko Unibertsitateko Farmakologiako Sailean eraman da aurrera, Doktorego Tesi proiektu baten barnean. Euskal Herriko Unibertsitateko Ikertzaileak Prestatzeko Beka baten bidez finantzatu da (2019ko deialdia).

Paziente eskizofreniko eta kontrolen garun kortexean D2, CB1 eta mGlu2 hartzaileen espresio aldakortasunaren ikerketa

DelaCuesta-Barrutia, J.[1], Peñagarikano , O.[1, 2], Callado, L.F.[1, 2], Meana, J.J[1,2], Ramos, A.[1, 2] eta Erdozain, A.M.[1, 2]

[1] *Farmakologia saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU*
[2] *Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)*
jon.delacuesta@ehu.eus

Laburpena

Eskizofrenia gaixotasun psikiatriko larria da, non sistema dopaminergiko, kannabinoide eta glutamatergikoaren asaldura dagoen. Ikerketa honetan sistema hauen parte diren D2 dopamina, CB1 kannabinoide eta mGlu2 glutamato hartzaileen espresioa aztertzen da subjektu eskizofreniko eta kontrolen post-mortem garunen kortex prefrontalean. Honetarako, fluoreszentzian eta kimioluminiszentzian oinarritutako Western Blot teknika erabili da. Honenbestez, CB1 eta mGlu2 hartzaileen espresio murrizpen esanguratsua aurkitu da eskizofrenikoetan, antipsikotikoen tratamenduaren eraginak ere honetan lagunduz. Alabaina, D2 hartzailearekiko ez da inolako desberdintasun esanguratsurik antzeman.

Hitz gakoak: D2, CB1, mGlu2, eskizofrenia, kortexa, Western Blot.

Abstract

Schizophrenia is a serious psychiatric disorder where dopaminergic, cannabinoid, and glutamatergic neurotransmission systems are severely affected. Expression of receptors part of these systems consisting in dopamine D2, cannabinoid CB1, and metabotropic glutamate mGlu2 are analysed in the prefrontal cortex of post-mortem brains of schizophrenia and control subjects. For this purpose, Western Blot technique based on fluorescence and chemiluminescence is employed. As result, a significant reduction in the expression of CB1 and mGlu2 receptors is found in schizophrenics, and antipsychotic treatment also contributes in this decline. Nonetheless, no significant alteration is observed for D2 receptor.

Keywords: D2, CB1, mGlu2, schizophrenia, cortex, Western Blot.

1. Sarrera eta motibazioa / momentuko egoera

Eskizofrenia gaixotasun psikiatriko ahultzaile kronikoa da, biztanleriaren % 0.4 eta % 1.2 bitartean aurkezten dena (Whiteford et al., 2015). Sintoma positibo, negatibo eta kognitiboetan laburbiltzen da koadro klinikoa. Sintoma positiboen artean nabarmentzekoa dira eldarnioa, pentsamendu nahasiak eta haluzinazioak; negatiboen artean, motibazio falta, isolatze soziala eta komunikatzeko zailtasunak; eta kognitiboen artean, arreta defizita, ikasteko zailtasuna eta mugimendu desberdinak burutzeko ahalmen gutxitua (American Psychiatric Association, 2013). Eskizofrenia kausa anitz dituen gaixotasun multigenetiko eta multifaktoriala da, hau da, faktore genetiko eta ingurune faktore ugarik baldintzatzen dute gaixotasunaren bilakaera. Hala ere, eskizofreniaren etiologia espezifikoa neurri handi batean ezezaguna da.

Eskizofreniaren bilakaeran zerikusi handia dute sistema dopaminergikoak (Howes & Kapur, 2009), serotonergikoak (Meltzer & Massey, 2011), kannabinoideak (Muguruza et al., 2019) eta glutamatergikoak (Eltokhi et al., 2020). Azkenaldian sistema oxitozinergikoaren influentzia ere dagoela proposatu da (Uhrig et al., 2016). Sistema hauetako neurotransmisoreak G proteinari akoplatutako hartzaileei (GPCR) batzen dira gehienetan. GPCR hauek mintz zelularra 7 domeinutan zeharkatzen dute eta zelula barneko seinale kaskadak aktibatzeko gai dira. Oro har, GPCRak tratamendu farmakologiko guztien %30 eta %40 artekoren eta tratamendu antipsikotiko gehienen itu

terapeutikoak dira (Albizu et al., 2010). Ikerketa honetan dopamina D2, kannabinoide CB1 eta glutamato mGlu2 GPCR hartzaileen forma monomerikoetan sakontzen da.

Eskizofrenian eragiten duen GPCR garrantzitsuena D2 hartzailea da, eskizofreniarekin erlazionatu zen lehenengoa delako eta antipsikotiko guztiak honi lotzen direlako. Hipotesi dopaminergikoa gaixotasunaren oinarri biomolekular gisa ezarri da, D2 hartzailearen antagonista den klorpromazina antipsikotiko tipikoaren eraginkortasunari buruzko lehen aurkikuntzek bultzatuta, batez ere sintomatologia positiboa hobetzerako orduan. Metabolito, irudi teknika, animalia eredu eta post-mortem laginekin egindako ikerketek ere sendotu dute hipotesia (Howes & Kapur, 2009; Seeman et al., 1975). Antipsikotiko tipikoak eta gero, atipiko edo bigarren belaunaldikoak sortu ziren, D2 hartzailea antagonizatzeaz gain, gehienak 5-HT2A hartzailea ere antagonizatzen dutenak, gaixotasunaren sintomatologia negatiboa tipikoek baino hobeto kontrolatuz (Meltzer & Massey, 2011).

CB1 hartzaileari dagokionez, eskizofrenia eta beste prozesu neuropatologiko ugaritan parte hartzen duela frogatu da. Alde batetik, kalamuaren erabilera goiztiarrak eskizofrenia garatzeko arriskua handitu dezake pertsona batzuetan, eta CB1 hartzailearen polimorfismo genetiko konkretu batzuek areagotu egiten dute arrisku hori (Chase et al., 2016). Bestetik, CB1 hartzailearen asaldurak deskribatu dira eskizofrenia duten post-mortem giza garunetan, CB1 hartzailearen mRNA maila urrituta egonik subjektu eskizofrenikoetan kontrolekin alderatuta (Muguruza et al., 2019; Tao et al., 2020). Murrizpen hau tratamendu antipsikotikoari esleitu diote beste artikulu batetan (Urigüen et al., 2009), eta mRNA mailak aldatu gabe baina hartzailearen lotura aldatuta aurkitu dute beste autore batzuek (Dalton et al., 2011).

Bestalde, mGlu2 hartzailearen eta eskizofreniaren inguruan ebidentzia mota desberdinak aurkitu dira ere, esaterako, eskizofrenikoen mGlu2ren mRNA adierazpena murriztuta aurkitu da kortex prefrontalean (González-Maeso et al., 2008) eta zerebeloan (Bullock et al., 2008).

2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa lerro hau zehazki D2, CB1 eta mGlu2 hartzaileen forma monomerikoen espresioa gaixo eskizofrenikoen eta subjektu kontrolen (patologia gabekoak) post-mortem giza garunean desberdina den aztertzera fokatzen da, zehazki, kortex prefrontal dortsolateralean. Ikerlan hau ikerketa proiektu itxaropentsu baten lehenengo pausua da, non eskizofrenikoen eta kontrolen garuneko GPCR hartzaile monomeroen baturaz osatutako heteromeroen arteko desberdintasunak bilatzen eta aztertzen diren, ondoren eskizofrenian desberdintasunak aurkeztu dituzten heteromeroak modulatuz itu terapeutiko berriak aurkitzeko xedez.

3. Ikerketaren muina

Helburua gauzatzeko Western Blot teknika erabili da, eta gizakien kohortea 27 subjektu eskizofreniko eta 27 subjektu kontrolek osatu dute, sexuaren, adinaren eta post-mortem denboraren arabera parekatuta. Adin tarte desberdinetako 44 gizonezko eta 10 emakumezko dira. Horrez gain, bi azpitaldetan banatu dira heriotzaren momentuan odolean antipsikotikorik zutenaren arabera, 20 gaixo izanik antipsikotikoak zituztenak. Kontrolek ez zuten tratamendu antipsikotikorik hartzen. Garunak Bilboko Auzitegiko Medikuntzako Euskal Institutuan egindako autopsietatik lortu dira, ikerketa eta berrikuspen etikoen batzordeen politikak betez.

3.1. D2 hartzaileen alderapena fluoreszentzian oinarritutako Western Blot bidez

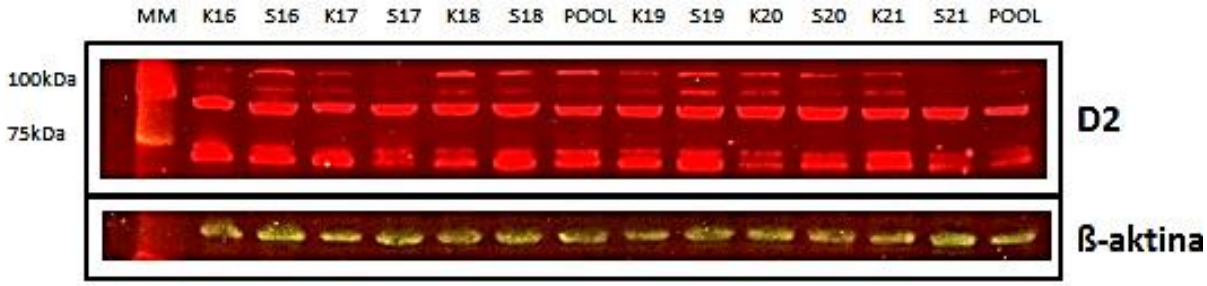
Western Blot teknikaren bitartez, D2 hartzaileen adierazpena modu semikuantitatibo batean aztertu da. Lehenengo, lagineko proteinak pisu molekularraren arabera banatzen dira. Ondoren, intereseko proteina, hau da, D2 hartzailea, hura zehazki ezagutzen duen antigorputz batekin, primarioa deritzona, markatzen da. Kasu honetan Merck Millipore AB5084P D2 hartzailea ezagutzen duen antigorputza, D2 hartzailea ez espresatzeko genetikoki eraldatutako saguetan, hau da, D2 Knock Out saguetan, frogatua izan da espezifikoa dela (Stojanovic et al., 2017). Jarraian, primario honi batuko den beste

antigorputz batekin, sekundarioa deritzona, inkubazioa burutzen da. Sekundarioa mutur batetik antigorputz primariora lotuta egongo da, eta beste muturrean fluoreszentzia igortzen duten fluorokromoak izango ditu, fluoreszentzia infragorri irudi sistema baten bidez D2 hartzailearen seinale immunoerreaktiboa detektatzea ahalbidetuko dutena.

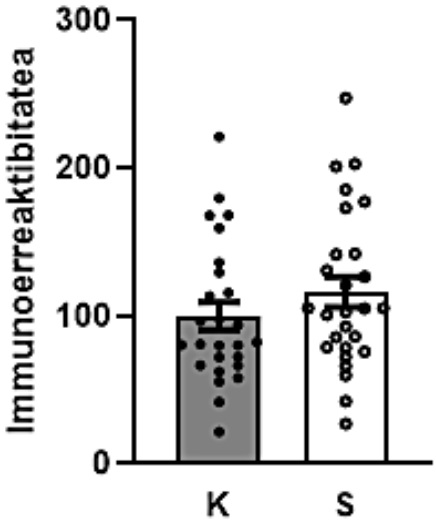
Lagin guztiak kantitate berean erabiliak izan direla ziurtatzeko β-aktina erabili da kontrol moduan. Honen espresioak aldakortasun gutxi aurkezten duenez, intereseko proteina, kasu honetan D2 hartzailea, normalizatzeko erabiltzen da β-aktinaren seinale immunoerreaktiboa. Esperimentu desberdinetako gelak alderatzeko erreferentziazko lagin bat erabili da, kontrol guztiekin eginiko nahaste edo pool-a.

Ondoren aipatzen da ikerketan ikusi duguna. Lehendabizi, hiru banda desberdin ikusi eta kuantifikatu dira, 70kDa, 95kDa eta 125kDa tamainetan (1.irudia). Heteromerizazio, estruktura aldaketa edo glikosilazioak izan daitezke D2 hartzailea tamaina desberdinetan banatu izanaren arrazoiak. Eskizofrenian aldaketarik ote dagoen aztertzerakoan, ikusi dugu banda hauetako batean ere ez dagoela D2 hartzailearen espresioan desberdintasun esanguratsurik eskizofrenia dutenen eta ez dutenen artean (p=0.4057), nahiz eta eskizofrenikoen espresioaren igoera %10koa izan kontrolekin alderatuta (1.grafikoa). Bestetik, tratamendu farmakologikoak ere D2aren espresioan eraginik ez duela ematen du, honen espresioa ez delako esanguratsuki aldatu heriotza momentuan odolean antipsikotikoak zituztenen (p=0.0809) eta ez zituztenen artean (p=0.1716).

1. irudia. 6 subjektu eskizofreniko eta 6 subjektu kontrolen fluoreszentzian oinarritutako Western Blot irudia. Gorriz D2 hartzailearen bandak, 70kDa, 95kDa eta 125kDa tamainetan, eta berdez β-aktinaren bandak. Markatzaile molekularra (MM), kontrolak (K), eskizofrenikoak (S) eta pool-a ageri dira



1. grafikoa. 27 subjektu kontrolen (K) eta 27 subjektu eskizofrenikoen (S) arteko D2 hartzailearen immunoerreaktibitatearen alderapena

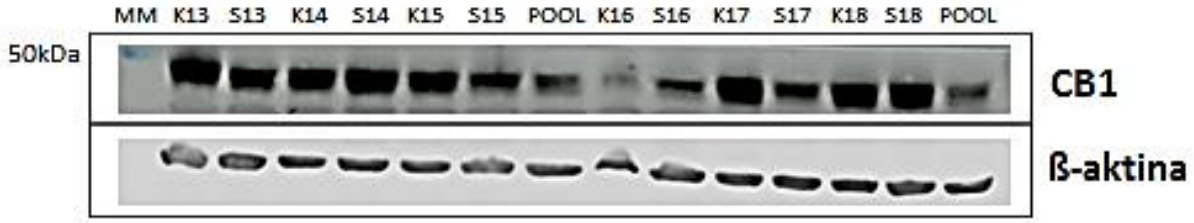


3.2. CB1 eta mGlu2 hartzaileen alderapena kimioluminiszentzian oinarritutako Western Blot bidez

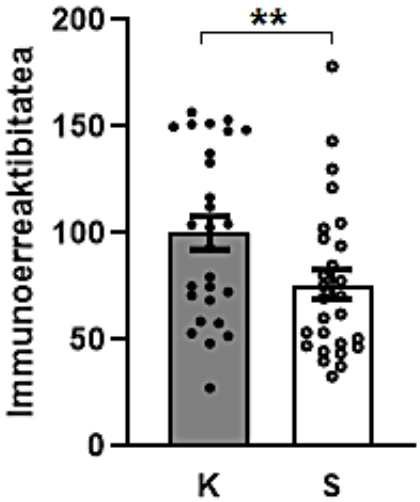
Western Blot teknikaren bitartez, CB1 eta mGlu2 hartzaileen adierazpena ere modu semikuantitatibo batean aztertu da, baina kasu honetan aldaera kimioluminiszentea erabiliz. CB1 eta mGlu2 hartzaileak ezagutzen dituzten antigorputzak, Abcameko ab23703 eta ab15672 hurrenez hurren, hartzaileak ez espresatzeko genetikoki eraldatutako saguetan, hau da, CB1 Knock Out eta mGlu2 Knock Out saguetan, espezifikoak direla frogatuta dago (Moreno et al., 2012; von Rüden et al., 2015). Teknika honetan, antigorputz sekundarioa ezberdina da: antigorputz primariorarekin lotzen ez den beste muturrean entzima bat izango du, eta substratu konkretu batekin kontaktuan jartzean, sortzen den erreakzioak argi espektro konkretu bat igorriko du. Seinale hau detektatzen duen kimioluminiszentzia aparatuaren bidez CB1 eta mGlu2 hartzaileen seinale immunoerreaktiboa detektatzea posible da. Hemen ere, lagin kantitatearen normalizazioa β-aktinaren seinale immunoerreaktiboaren bidez burutzen da, eta gel desberdinen alderaketa pool bidez.

Alde batetik, CB1 hartzailearen bandak 50kDa inguruan kuantifikatu dira (2.irudia). Interesgarria izan da hartzailearen espresioa nabarmen murriztuta agertu izana eskizofrenikoetan kontrolekin alderatuta (p=0.0026), %24ko jaitsiera izanik (2.grafikoa). Bestetik, tratamendu farmakologikoa kontuan edukita, antipsikotiko hartzaile eskizofrenikoen taldeak esanguratsua den espresio baxuagoa du kontrolekin alderatuta (p=0.0071), aldiz, antipsikotikoak hartzen ez zituen eskizofrenikoen taldeak ez du aldaketa esanguratsurik aurkezten kontrolekin alderatzean (p=0.2229).

2. irudia. 6 subjektu eskizofreniko eta 6 subjektu kontrolen kimioluminiszentzian oinarritutako Western Blot irudia. Goiko aldean CB1 hartzailearen bandak 50kDa inguruko tamainan, eta beheko aldean β-aktinaren bandak. Markatzaile molekularra (MM), kontrolak (K), eskizofrenikoak (S) eta pool-a ageri dira

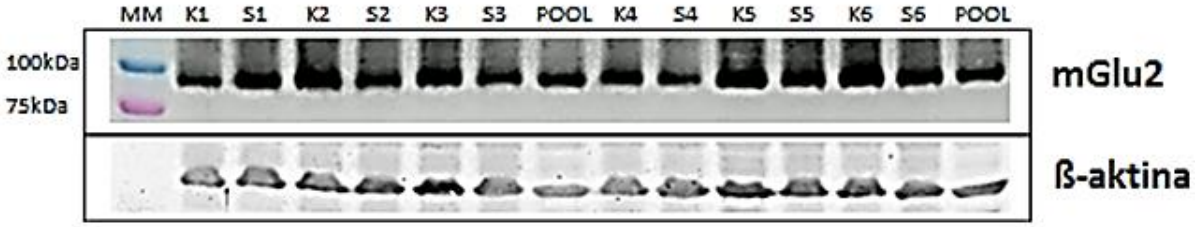


2. grafikoa. 27 subjektu kontrolen (K) eta 27 subjektu eskizofrenikoen (S) arteko CB1 hartzailearen immunoerreaktibitatearen alderapena

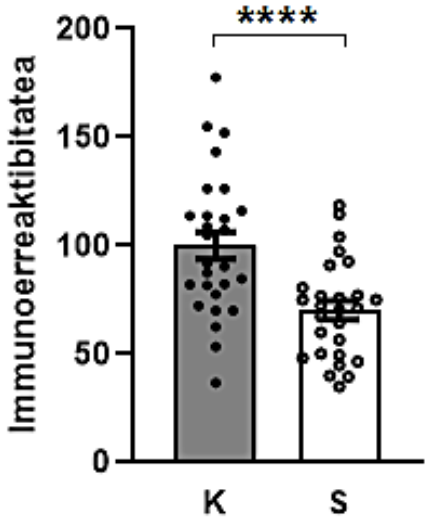


Halaber, mGlu2 hartzaileari dagokionez, banda immunoerreaktiboak 100kDa inguruan kuantifikatu dira (3.irudia). CB1arekin ikusten zen moduan, mGlu2 hartzailearen espresioa ere nabarmen murriztuta dago eskizofrenikoetan kontrolekin alderatuta ($p<0.0001$), %30ko jaitsiera izanik (3.grafikoa). Horrez gain, tratamendu farmakologikoa kontuan edukita, murrizpenaren esangura handiagoa da eskizofreniko tratatuetan ($p<0.0001$) ez tratatuetan baino ($p=0.0101$) kontrolekin alderatuta.

3. irudia. 6 subjektu eskizofreniko eta 6 subjektu kontrolen kimioluminiszentzian oinarritutako Western Blot irudia. Goiko aldean mGlu2 hartzailearen bandak 100kDa inguruko tamainan, eta beheko aldean β-aktinaren bandak. Markatzaile molekularra (MM), kontrolak (K), eskizofrenikoak (S) eta pool-a ageri dira



3. grafikoa. 27 subjektu kontrolen (K) eta 27 subjektu eskizofrenikoen (S) arteko mGlu2 hartzailearen immunoerreaktibitatearen alderapena



4. Ikerketaren ondorioak

Eskizofrenian D2 hartzailearen adierazpenaren desberdintasun esanguratsurik ez da aurkitu, beraz, forma monomerikoaren espresioaren eragina ez da nabarmengarria. Haatik, D2 hartzailearen influentzia eskizofrenian justifikatzen duen ebidentzia sakona onartuta dago, batez ere antipsikotikoen itu farmakologiko garrantzitsua delako. Nahiz eta hartzailearen forma monomerikoaren espresio totalean aldaketarik ez egon, funtzioa aldatuta egon daiteke, eta honen arrazoi bat eskizofrenian heteromeroak modu ezberdinean sortzen dituela izan daiteke. Bestalde, CB1 hartzailearen espresioaren murrizpen esanguratsua eskizofrenikoetan bat dator literaturako beste emaitzekin, non lehen aipatu bezala CB1 hartzailearen mRNA maila urrituta dagoen subjektu eskizofrenikoen kortexean kontrolekin alderatuta (Muguruza et al., 2019; Tao et al., 2020). Horrez gain, badirudi eskizofrenia gaixotasun bera baino gehiago, emaitzek iradokitzen dutela tratamendu antipsikotikoa izan daitekeela CB1 hartzailearen espresioaren jaitsieraren arrazoia, tratamendu antipsikotiko gabeko kontrol eta eskizofrenikoak alderatzean ez baitago esangurarik eta tratatuen artean bai. Halaber, mGlu2 hartzailearen espresioa esanguratsuki jaitsita egotea subjektu eskizofrenikoetan ere koherentea da

sarreran aipatutako ikerketen emaitzekin, hots, zerebeloko eta kortexeko hartzailearen mRNA mailen murrizpenarekin (Bullock et al., 2008; González-Maeso et al., 2008). Gainera, badirudi mGlu2ren murrizpen hau eskizofrenia gaixotasunaren berezkoa dela, eta tratamendu antipsikotikoak murrizpen hori handitzen duela, tratamendu antipsikotikodun eskizofrenikoak haien kontrolekin alderatzean, esangura tratamendu antipsikotiko gabekoetan baino handiagoa delako. Ikerketa lerro honek dagoeneko lortu ditu eskizofrenian D2, CB1 eta mGlu2 hartzaileen forma monomerikoen eraginaren froga berriak, eta nahiz eta hiru GPCR hartzaile hauek eskizofreniaren bilakaeran eragina dutenaren ebidentzia gehiago badagoen ere, ikerketa gehiago behar dira, batez ere giza laginetan eta heteromerizazioa aztertzen duten teknikekin.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Hurrengo pausua 5-HT2A eta OXT hartzaileen forma monomerikoak kimioluminiszentzian oinarritutako Western Blot bidez ikertzea da. Baina lehenik eta behin GPCR hartzaile hauek espezifikoki detektatuko dituzten antigorputz primarioak aurkitu eta karakterizatu behar dira.

Ondoren, heteromerizazioak eskizofrenian eduki dezakeen inpaktuan sakonduko da, patologiaren garapenean faktore garrantzitsua izan baitaiteke ikerketa proiektu honen hipotesiaren arabera. GPCRak elkarrekin batu daitezkeela heteromeroak osatzeko dagoeneko onartuta dago gaur egungo ebidentzia kontuan edukita, eta propietate biologiko desberdinak aurkezten dituzte forma monomerikoekin alderatuta (Farran, 2017; Jones et al., 1998; Moreno et al., 2013). Ildo berean, ikerketa lerro honetan monomerikoki aztertutako GPCR hauen arteko heteromero batzuek eskizofrenian eta psikosian eragin zuzena dagoeneko aurkeztu duten ikerketak daude; esaterako, 5-HT2A-mGlu2 hartzaile heteromeroak (González-Maeso et al., 2008) eta D2-5HT2A hartzaile heteromeroak (Albizu et al., 2011; Borroto-Escuela et al., 2014). Horrez gain, antipsikotiko batzuen itu farmakologikoak direla ere frogatu da (Bagher et al., 2020; Borroto-Escuela et al., 2014; Maggio & Millan, 2010; Zhang et al., 2020). Hala eta guztiz ere, eskizofreniarekin erlazioa duten beste asaldura neuropsikiatrikoetan ere paper garrantzitsua jorratzen dute GPCR hauen arteko beste heteromero batzuek, adibidez, suminkortasunean CB1-D2 hartzaile heteromeroak (Marcellino et al., 2008), antsietatean D1-D2 hartzaile heteromeroak (Hasbi et al., 2020) eta antsietate eta depresioan D2-OXT hartzaile heteromeroak (Kohli et al., 2019).

Hipotesi hau frogatzeko xedez, D2, CB1, mGlu2, 5-HT2A eta OXT hartzaileek eratu ditzaketen heteromeroen forma natiboa errespetatuko duen Blue Native Western Blot teknika erabiliz, subjektu eskizofreniko eta kontrolen artean heteromero espresioan desberdintasunik dagoen ikertuko da. Desberdintasunik aurkituz gero, eskizofrenia animalia ereduetan desberdintasun hauek erreplikatzen diren aztertuko da, eta horrela izanez gero, eskizofrenian espresio desberdina aurkeztu duen intereseko heteromeroa interferentzia peptido batekin banatuko da, itu terapeutiko berriak aurkitu nahian, eskizofreniaren sintomatologia hobetzen duen edo ez aztertzeko.

6. Erreferentziak

Albizu, L., Holloway, T., González-Maeso, J., & Sealfon, S. C. (2011). Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT2A and dopamine D2 receptors. *Neuropharmacology*, 61, 770–777.

Albizu, L., L. Moreno, J., Gonzalez-Maeso, J., & C. Sealfon, S. (2010). Heteromerization of G Protein-Coupled Receptors: Relevance to Neurological Disorders and Neurotherapeutics. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 9, 636–650.

American Psychiatric Association (Ed.). (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5* (5th ed). American Psychiatric Association.

Bagher, A. M., Young, A. P., Laprairie, R. B., Toguri, J. T., Kelly, M. E. M., & Denovan-Wright, E. M. (2020). Heteromer formation between cannabinoid type 1 and dopamine type 2 receptors is altered by combination cannabinoid and antipsychotic treatments. *Journal of Neuroscience Research*, 98, 2496-2509.

Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Narvaez, M., Oflijan, J., Agnati, L. F., & Fuxe, K. (2014). Hallucinogenic 5-HT2AR agonists LSD and DOI enhance dopamine D2R protomer recognition and signaling of D2-5-HT2A heteroreceptor complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443, 278–284.

Bullock, W. M., Cardon, K., Bustillo, J., Roberts, R. C., & Perrone-Bizzozero, N. I. (2008). Altered Expression of Genes Involved in GABAergic Transmission and Neuromodulation of Granule Cell Activity in the Cerebellum of Schizophrenia Patients. *American Journal of Psychiatry*, 165, 1594–1603.

Chase, K. A., Feiner, B., Rosen, C., Gavin, D. P., & Sharma, R. P. (2016). Characterization of peripheral cannabinoid receptor expression and clinical correlates in schizophrenia. *Psychiatry Research*, 245, 346–353.

Dalton, V. S., Long, L. E., Weickert, C. S., & Zavitsanou, K. (2011). Paranoid Schizophrenia is Characterized by Increased CB1 Receptor Binding in the Dorsolateral Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, 36, 1620–1630.

Eltokhi, A., Santuy, A., Merchan-Perez, A., & Sprengel, R. (2020). Glutamatergic Dysfunction and Synaptic Ultrastructural Alterations in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorder: Evidence from Human and Rodent Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 59.

Farran, B. (2017). An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers. *Pharmacological Research*, 117, 303–327.

González-Maeso, J., Ang, R. L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N. V., López-Giménez, J. F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L. F., Milligan, G., Gingrich, J. A., Filizola, M., Meana, J. J., & Sealfon, S. C. (2008). Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*, 452, 93–97.

Hasbi, A., Nguyen, T., Rahal, H., Manduca, J. D., Miksys, S., Tyndale, R. F., Madras, B. K., Perreault, M. L., & George, S. R. (2020). Sex difference in dopamine D1-D2 receptor complex expression and signaling affects depression- and anxiety-like behaviors. *Biology of Sex Differences*, 11, 8.

Howes, O. D., & Kapur, S. (2009). The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III--The Final Common Pathway. *Schizophrenia Bulletin*, 35, 549–562.

Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., Craig, D. A., Durkin, M. M., Dai, M., Yao, W.-J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.-Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J. A., Morse, K., Laz, T., Smith, K. E., Nagarathnam, D., Noble, S. A., Branchek, T. A., & Gerald, C. (1998). GABAB receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABABR1 and GABABR2. *Nature*, 396, 674–679.

Kohli, S., King, M. V., Williams, S., Edwards, A., Ballard, T. M., Steward, L. J., Alberati, D., & Fone, K. C. F. (2019). Oxytocin attenuates phencyclidine hyperactivity and increases social interaction and nucleus accumben dopamine release in rats. *Neuropsychopharmacology*, 44, 295–305.

Maggio, R., & Millan, M. J. (2010). Dopamine D2–D3 receptor heteromers: Pharmacological properties and therapeutic significance. *Current Opinion in Pharmacology*, 10, 100–107.

Marcellino, D., Carriba, P., Filip, M., Borgkvist, A., Frankowska, M., Bellido, I., Tanganelli, S., Müller, C. E., Fisone, G., Lluis, C., Agnati, L. F., Franco, R., & Fuxe, K. (2008). Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis. *Neuropharmacology*, 54, 815–823.

Meltzer, H., & Massey, B. (2011). The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, 11, 59–67.

Moreno, J. L., Holloway, T., & González-Maeso, J. (2013). G Protein-Coupled Receptor Heterocomplexes in Neuropsychiatric Disorders. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 117, 187–205). Elsevier.

Moreno, J. L., Muguruza, C., Umali, A., Mortillo, S., Holloway, T., Pilar-Cuéllar, F., Mocci, G., Seto, J., Callado, L. F., Neve, R. L., Milligan, G., Sealfon, S. C., López-Giménez, J. F., Meana, J. J., Benson, D. L., & González-Maeso, J. (2012). Identification of Three Residues Essential for 5-Hydroxytryptamine 2A-Metabotropic Glutamate 2 (5-HT2A·mGlu2) Receptor Heteromerization and Its Psychoactive Behavioral Function. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 44301–44319.

Muguruza, C., Morentin, B., Meana, J. J., Alexander, S. P., & Callado, L. F. (2019). Endocannabinoid system imbalance in the postmortem prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Journal of Psychopharmacology*, 33, 1132–1140.

Seeman, P., Chau-Wong, M., Tedesco, J., & Wong, K. (1975). Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: Direct binding assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 4376–4380.

Stojanovic, T., Orlova, M., Sialana, F. J., Höger, H., Stuchlik, S., Milenkovic, I., Aradska, J., & Lubec, G. (2017). Validation of dopamine receptor DRD1 and DRD2 antibodies using receptor deficient mice. *Amino Acids*, 49, 1101–1109.

Tao, R., Li, C., Jaffe, A. E., Shin, J. H., Deep-Soboslay, A., Yamin, R., Weinberger, D. R., Hyde, T. M., & Kleinman, J. E. (2020). Cannabinoid receptor CNR1 expression and DNA methylation in human prefrontal cortex, hippocampus and caudate in brain development and schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 10, 158.

Uhrig, S., Hirth, N., Broccoli, L., von Wilmsdorff, M., Bauer, M., Sommer, C., Zink, M., Steiner, J., Frodl, T., Malchow, B., Falkai, P., Spanagel, R., Hansson, A. C., & Schmitt, A. (2016). Reduced oxytocin receptor gene expression and binding sites in different brain regions in schizophrenia: A post-mortem study. *Schizophrenia Research*, 177, 59–66.

Urigüen, L., García-Fuster, M. J., Callado, L. F., Morentin, B., La Harpe, R., Casadó, V., Lluis, C., Franco, R., García-Sevilla, J. A., & Meana, J. J. (2009). Immunodensity and mRNA expression of A2A adenosine, D2 dopamine, and CB1 cannabinoid receptors in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: Effect of antipsychotic treatment. *Psychopharmacology*, 206, 313–324.

von Rüden, E. L., Jafari, M., Bogdanovic, R. M., Wotjak, C. T., & Potschka, H. (2015). Analysis in conditional cannabinoid 1 receptor-knockout mice reveals neuronal subpopulation-specific effects on epileptogenesis in the kindling paradigm. *Neurobiology of Disease*, 73, 334–347.

Whiteford, H. A., Ferrari, A. J., Degenhardt, L., Feigin, V., & Vos, T. (2015). The Global Burden of Mental, Neurological and Substance Use Disorders: An Analysis from the Global Burden of Disease Study 2010. *PLOS ONE*, 10, e0116820.

Zhang, C., Li, Q., Meng, L., & Ren, Y. (2020). Design of novel dopamine D_2 and serotonin $5\text{-}HT_{2A}$ receptors dual antagonists toward schizophrenia: An integrated study with QSAR, molecular docking, virtual screening and molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38, 860–885.

7. Eskerrak

Ikerketa lan honek Estatuko Industria, Zientzia eta Unibertsitate ministerioaren (RTI2018-094414-A-I00) eta Eusko jaurlaritzaren (IT1211-19) diru-laguntzak jaso ditu. DelaCuesta-Barrutia Jon Euskal Herriko Unibertsitatearen Doktoratu Aurreko Programaren laguntza baten jabea da.

Gernutik lortutako zelula ama mesenkimalak (hUSC) pseudohipoparatiroidismoaren (PHP) terapia geniko ez-biralerako

Vado, Y.[1,2], Pedraz, J.L.[1], Perez de Nanclares, G.[2], Zarate, J.[1]

[1]*NanoBioCel Ikerketa Taldea, Farmazia eta Elikagaien Zientziak Saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitaeta (UPV/EHU), BioAraba Osasun Ikerketa Institutua, Networking Research Center of Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Vitoria-Gasteiz, Araba, Espainia.*

[2]*Gaixotasun Arraroen Ikerketa Taldea, (Epi)Genetika Molekularreko Laborategia, BioAraba Osasun Ikerketa Institutua, Arabako Unibertsitate Ospitalea-Txagorritxu, Vitoria-Gasteiz, Araba, Espainia.*

yerai.vado@ehu.eus

Laburpena

Zelula ama mesenkimalak (MSC) giza gorputzean hainbat nitxotan aurkitzen diren zelula ama heldu multipotenteak dira. Gizakien gernutik lortutako MSCak (hUSC), ohiko MSCen abantaila biologiko guztiak mantentzen dituzte eta era ez-inbaditzailean lortzen dira. Pseudohipoparatiroidismoa (PHP) gaixotasun (epi)genetiko talde heterogeneo eta arraroa da, hormona paratiroideoaren (PTH) aurkako erresistentziak ezaugarritzen dituena. Ikerketa honetan hUSCak isolatzeko protokoloa garatu dugu eta niosoma deritzan bektore ez-biral lipidikoekin transfektatzeko prozedura zehaztasunez aztertu dugu, etorkizunean PHP moduko gaixotasunen terapia genikoan aplikatu ahal izateko.

Hitz gakoak: pseudohipoparatiroidismoa, hUSC, bektore ez-biralak, niosomak, terapia genikoa.

Abstract

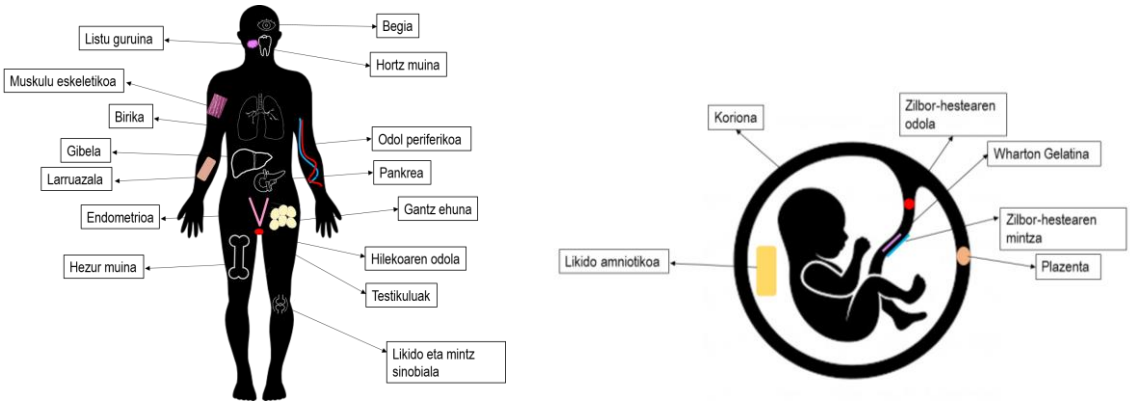
Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult multipotent stem cells that can be found in several niches. Human urine-derived mesenchymal stem cells (hUSCs) maintain the advantages of MSCs and in addition, they can be isolated in a non-invasive way from and easily accessible source. Pseudohypoparathyroidism (PHP) is an heterogeneous group of (epi)genetic disorders characterized by parathyroid hormone (PTH) resistance. In this research, we have developed and validated a protocol based on the non-viral vectors known as niosomes for transfecting hUSCs. This strategy could be used in the future with gene therapy purposes in genetic diseases such as PHP.

Keywords: pseudohypoparathyroidism, hUSC, non-viral vectors, niosomes, gene therapy

1. Sarrera eta motibazioa

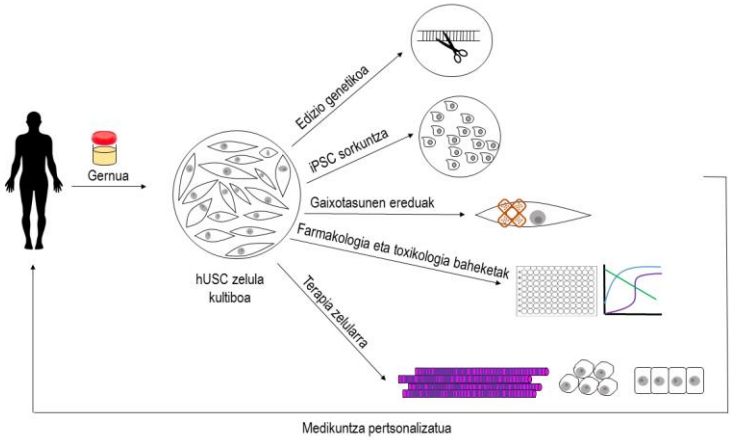
Zelula ama mesenkimalek (MSC) autoberriztapenerako gaitasuna dute, multipotenteak dira eta egonkortasun genomiko bikaina mantentzen dute kultiboan (Horwitz et al., 2005). Era berean, zelulak pazientearengandik bertatik lor daitezke, hau da, jatorri autologoa izan dezakete, eta, kasu horietan, ez dute inolako erantzun immunerik sustatzen (Chen et al., 2018).

1. Irudia. MSCak aurkitu daitezkeen nitxoak, gorputz helduan (ezkerra) eta fetuan (eskuina).



2008an, Zhang eta kideek lehen aldiz deskribatu zuten giza gernutik isolatutako zelula ama mesenkimalen (hUSC) kultiboa (Zhang et al., 2008). Gainerako MSCen erara, hUSCek ugaltzeko eta autoberritzeko gaitasun handia dute eta hainbat zelula leinutan diferentziatzeko potentziala mantentzen dute (Guan et al., 2014). Era berean, beste nitxo batzuetatik lortutako MSCekin alderatuta, hUSCak modu ez-inbaditzaile, erraz eta seguruan isolatu daitezkenez, jatorri autologoko zelula gisa hainbat gaixotasun tratatzeko potentzial handia dute (Pavathuparambil et al., 2018). Izan ere, hUSC zelulei lotutako hainbat aplikazio kliniko aurki daitezke (2. Irudia). Adibidez, hainbat esparrutan terapia genikorako erabili dira, hala nola patologia neurologikoetan eta baita tumore-hazkundea murrizteko ere (Reiser et al., 2005).

2. Irudia. hUSCen aplikazioak. Irudi honen bidez, hUSCek gernutik jaso eta kultibatu ondoren izan ditzaketen aplikazioak eskematizatzen dira.



Pseudohipoparatiroidismo (PHP) gisa ezagutzen diren adierazpen kliniko ezberdinetan, *GNAS* genearen mailako aldaera genetikoak zein lokus mailako inprontaren alterazioak deskribatu dira (Turan eta Bastepe, 2013). PHPa hormona paratiroideoaren (PTH) aurkako erresistentziak eta hipokaltzemiak eta hiperfosfatemiak ezaugarritzen dituen gaixotasun (epi)genetiko talde heterogeneo eta arraroa da.

Azken urteotan gene-terapian bektore ez-biralak erabili dira bektore biralen alternatiba gisa. Bektore ez-biralak fabrikatzeko errazagoak eta merkeagoak dira, eta printzipioz tamaina mugagabeko material genetikoa garraiatu dezakete. Gainera, seguruagoak dira, ez baitute erantzun immunerik sortzen (Mintzer eta Simanek, 2009). Bestalde, bektore ez-biralek duten desabantailarik handiena transfekzio-tasa baxua da, eta, aldi berean, material genetiko exogenoaren adierazpen-denbora laburra (Pezzoli et al., 2012). Bektore ez-biralen artean, gehien aztertu eta erabiltzen direnak nanopartikula lipidikoak dira, bereziki liposomak (Pezzoli et al., 2013).

Niosomak liposomen ordezko moduan erabili daitezkeen bigeruza lipidikoko besikula esferikoak dira. Bere egitura dela eta, material hidrofilikoak eta lipofilikoak garraiatu ditzakete (Moghassemi eta Hadjizadeh, 2014). Liposomekin alderatuta, niosomak ez dira hain toxikoak zelularentzat, hauen ekoizpena errazagoa eta merkeagoa da, maneiua seguruagoa da eta, gainera, kimikoki egonkorragoak dira (Marianecci et al., 2014). Helburua zelulan material genetikoa sartzea denean, niosoma kationikoak ekoiztu eta elkarrekintza elektrostatikoen bidez azido nukleikoa mintzeko besikuletara errazago batu daiteke (Ma et al., 2007).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gure ikerketa taldeak zenbait urte daramatza terapia genikorako bektore ez-biralak garatzen, bereziki niosoma kationikoak (Grijalvo et al., 2019). Bektore ez-biralak MSCen bidezko terapia genikoan erabiltzeko hautagai egokiak izan daitezke. Terapiarako hautagai diren geneak garraiatzaile ez-biralen laguntzarekin MSCetan transfektatu daitezke eta dagokion transgenea adierazi daiteke zelula hauetan. Nahiz eta MSCen bidezko terapia genikoa estrategia nahiko

berria izan, zenbait gaixotasun genetikoren tratamendurako aukera oso egokia izan daiteke (Mohammadian et al., 2016). MSCak are interesgarriagoak bihurtzen dira, hUSCen kasuan bezala, gaixoarengandik modu ez-inbaditzaile, erraz, sinple eta seguruan isolatu daitezkenean.

2.1. Helburu nagusia

Ikerketa lan honetan arlo klinikoko eta unibertsitateko ikertzaileok bat egin dugu ondorengo helburu nagusia lortu nahian: PHP eragiten duten *GNAS* genearen mutazio ezagunak zuzentzea helburu duen hUSC zeluletan eta bektore ez biraletan oinarritutako terapia genikorako protokoloa diseinatzea eta balidatzea. Aukera ezberdinen artean, genetikoki manipulatutako hUSC zelula autologoak ex vivo transferitzeko estrategia daukagu begiz jota.

2.2. Azpihelburuak

1) Ospitaleko pazienteen gernutik hUSCak erauzi eta *in vitro* kultibatzeko prozedimendua garatzea.
2) Gernutik isolatutako zelulak benetan MSCak direla balidatzea.
3) hUSCak genetikoki manipulatzeko material genetikoaren bektore moduan erabiliko den niosoma diseinatzea eta fisikokimikoki karakterizatzea.
4) hUSCetan niosomaren bidezko genearen transfekzio prozesuaren ezagutza handitzea eta efizientzia neurtzea.

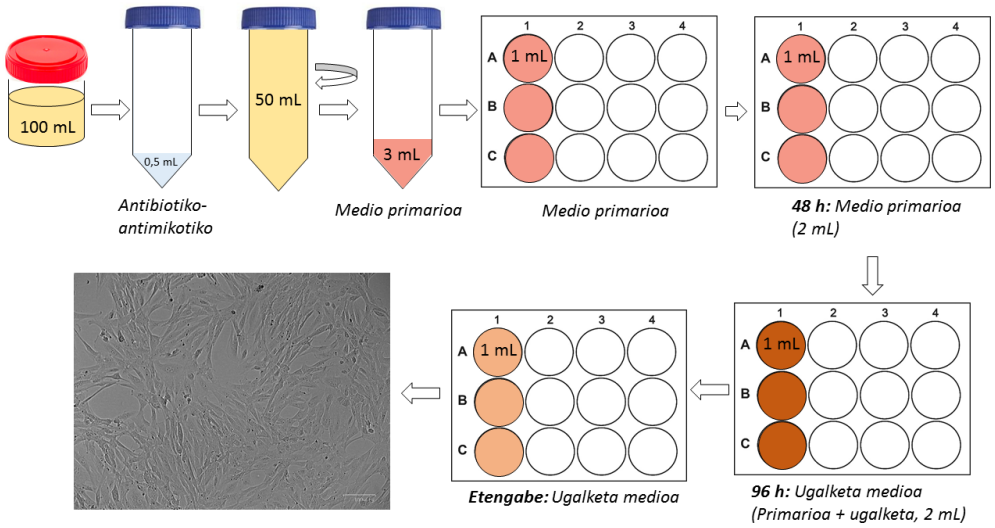
3. Ikerketaren muina

Atal honetan ikerketako helburuak betetzeko ospitalean eta laborategian buruturiko ekintzak edota entseguak eta lortutako emaitza nagusiak deskribatzen dira.

3.1. Pazienteen gernutik hUSCen erauzketa eta *in vitro* kultiboa

Zelulen isolaketarako, Chen C-Y. eta kideek (Chen et al., 2018) garatutako protokoloa jarraitu da (3. Irudia).

3. Irudia. Gernutik hUCSak erauzteko prozesua. Prozesuaren amaieran lortutako kultiboaren argazkia ageri da.



Pazienteengandik gernua jaso eta zentrifugazio eta garbiketa prozesuak burutu dira. Lehenengo, zelulak medio primario deituriko mediotan (konposaketa zehatza aurretik aipatutako erreferentzian dago) erein dira. Erein eta hiru egunetara, ugalketa medioa (Chun-

Yuan C.-ren artikuluan deskribatuta) erabili da medio primarioarekin batera. Laugarren egunetik aurrera, zelulen hazkuntzarako ugalketa medioa bakarrik erabili da. Gutxi gorabehera, laugarren egunean lehenengo zelulak ikusi dira. Zelula hauek luzangak dira eta populazio homogeneoa eratzen dute.

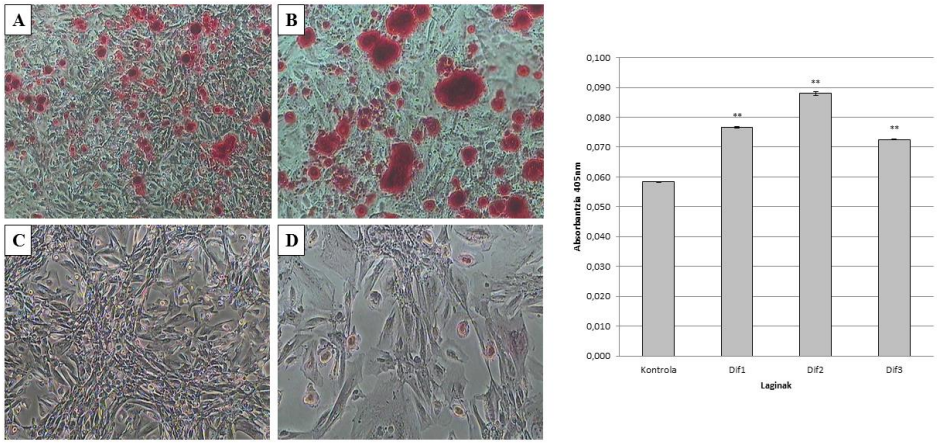
3.2 Isolatutako hUSCen balidazioa

Gernutik isolatutako zelulak benetan MSCak direla frogatzeko, bi entsegu bideratu dira.

3.2.1. Osteozitoetara diferentziatzeko gaitasuna frogatzeko entsegua

hUSCek osteozioetara diferentziatzeko duten gaitasuna aztertu da "*StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit*" erabilita. Behin protokoloa burututa, *Alizarin red* tindaketarekin baieztatu da osteozitoetara diferentziazioa gertatu den edo ez. Gainera, mikroskopioarekin ikusteaz gain, kaltzio kuantifikatu da, kontrol negatibo batekin konparatuz.

4. Irudia. Ezkerreko irudietan, *Alizarin red* tindaketa egin eta gero diferentziatutako zelulen (A: 4X, B: 10X) eta kontrol negatiboen (C: 4X, D: 10X) mikroskopioko argazkiak ikusi daitezke. Gorriz kaltzio pilaketak ikusten dira A eta B irudietan. Era honetan, bisualki frogatzen da tratatutako zelulak osteozitoetara diferentziatu direla. Eskuineko grafikan, kaltzioaren kuantifikazio kolorimetrikoa adierazten da (absorbantzia 405 nm). Mann-Whitney's test estatistikoa gauzatu da eta ezberdintasun esanguratsuak (p<0,01) aurkitu dira tratatutako laginen (Dif1, Dif2 eta Dif3) eta kontrolaren artean.**



3.2.2. Fluxu-zitometria

Terapia Zelularrerako Nazioarteko Elkarteak (ISCT) zehazten duen moduan, zelula kultibo batean zelula mesenkimalak daudela esan ahal izateko, fluxu-zitometria bidez mintzeko markatzaile batzuk ikusi behar dira (zelulak positiboak izan behar dira horietarako) eta beste batzuen gabezia egon behar da (zelulak negatiboak izan behar dira). Gure kasuan, markatzaile positiboak CD73, CD90 eta CD105 izan dira eta negatiboak CD14, CD34 eta CD45. Entsegurako, gernutik lortutako zelulez gain, kontrol positibo gisa zelula mesenkimal komertzialak erabili dira eta kontrol negatibo gisa HEK293 zelula epitelialak.

2. Taula. Mintzeko proteina bakoitzeko lortu diren zelula positiboen portzentajea adierazten da. CD73, CD90 eta CD105 antigenoak espezifikoki adierazten dira zelula mesenkimaletan eta CD14, CD34 eta CD45 ez dira adierazten. FITC, APC, PE eta AlexaFluor488 fluoroforoak erabili dira.

	Positiboak (>%95)			Negatiboak (<%2)		
	CD73-AlexaFluor488	CD90-APC	CD105-PE	CD14-FITC	CD34-APC	CD45-PE
MSC komertzialak	%63,4	%81,7	%70,1	%0,8	%1,3	%20,5
hUSCak	%78,6	%86,4	%66,1	%6,8	%13,4	%52,4
HEK293	%36,5	%0,9	%3,5	%2,8	%0,8	%11,3

Zitometroko emaitzetan ez da ISCTak ezartzen duen balio minimoa lortu (%95 markatzaile positiboetarako). Hala ere, argi ikusten da markatzaile positiboetarako portzentaje altuak lortzen direla eta negatiboetarako ez dagoela ia seinalerik. Gainera, zelula komertzialak eta laborategian isolatutako hUSCak antzeko emaitzak dituzte, batez ere markatzaile positiboetarako. Espero zen moduan, HEK293 zelulek ez dute seinalerik ematen MSC zelulen markatzaile espezifikoekin.

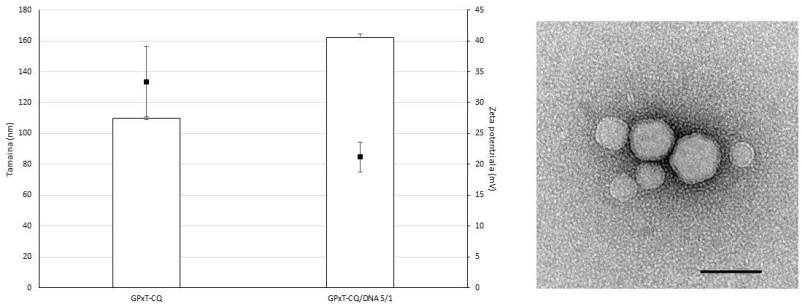
3.3. Niosomen diseinua eta karakterizazio fisikokimikoa

Niosomen sintesirako, fase lurrunketa alderantzikatua teknika erabili da. Alde batetik, disoluzio hidrofobikoa eta bestetik, disoluzio hidrofilikoa prestatu dira. Ondoren, bi disoluzioak batu eta sonikazio bidez emultsionatu dira. Jarraian, irabiaketa mekanikoarekin disolbatzaile organikoa lurruntzen utzi eta niosomen esekidura lortu da, 1 mg/mL-ko kontzentrazioduna.

Karakterizazio fisikokimikorako *Z-sizer*-arekin partikulen tamaina eta karga (zeta potentziala) neurtu dira. Bestalde, besikulen morfologia ezagutzeko, transmisiozko mikroskopio elektronikoa (TEM) erabili da. GPxT-CQ formulazioaren niosoma/DNA proportzio desberdinak frogatu ostean, 5/1 erlazioa duten nioplexoek (niosomak eta DNA elkartzean sortzen diren konplexuak) erakutsi dituzte ezaugarri fisikokimiko onenak.

Tamainari dagokionez, espero zen moduan, tarte nanometrikoan aurkitzen dira. Niosomek biluzik 110 nm dituzte eta 162 nm-ra arte handitzen da DNA gehitzean. Niosomaren karga +33,4 ± 5,7 mV-ekoa da. Karga hori +25 mV baino handiagoa denez, DNA arazorik gabe lotu dakioke (Hosseinkhani eta Tabata, 2006). Behin DNA gehituta, nioplexoaren zeta potentziala +21,2 ± 2,4 mV-ekoa da. Mikroskopiotik behatzerakoan, besikulak forma esferikoa dute eta ez dute agregaturik erakusten. Gainera, baieztatzen da esperotako tamaina dutela (100 nm inguru).

5. Irudia. Bektore ez-biralen karakterizazio fisikokimikoa. Ezkerrean tamaina (zutabe zuria) eta zeta potentziala (lauki beltza) (n=3). Eskuinean TEM irudia (eskala barra 100 nm eta handipena 80.000X).



3.4. Transfekzio, zelulan barneratze eta banaketa *in vitro* entseguak

3.4.1. Transfekzio entseguak

Proteina berde fluoreszentea (GFP) duen plasmidoa erabili da gene erreportari gisara. Esperimentu honetan, lipido kationiko/DNA erlazio desberdinak frogatu dira eta fluxu-zitometria bidez transfekzioaren efizientzia eta zelulen bideragarritasuna neurtu dira. Transfekzioaren kontrol positibo gisa lipofektamina komertziala erabili da. Kontrol positiboarekin alderatuz, 5/1 erlazioan prestatutako GPxT-CQ nioplexoek (GPxT-CQ/DNA 5/1) izan dute emaitzarik onena: %6,81 ± 0,8-ko transfekzio efizientzia eta %77,5 ± 4,7-ko zelula-bideragarritasuna. Ez da oso transfekzio tasa altua, baina bibliografian deskribatu da zelula kultibo primarioak transfektatzea zaila dela (de Carvalho et al., 2018).

3.4.2. Zelulan barneratze eta banaketa entseguak

Transfekzio maila baxua ikusita, barneratze entsegua burutu da niosomak zelula barrura sartzen direla ziurtatzeko. Horretarako, kasu honetan plasmidoa FITC fluoroforoa du atxikita, nioplexoaren jarraipena gauzatu ahal izateko. Kasu honetan ere kontrol positibo gisa lipofektaminarekin osatutako lipoplexoa erabili da. GPxT-CQ/DNA 5/1 nioplexoaren

barneratzea zelulara %15,16 ± 1,07-koa izan da eta zelulen bideragarritasuna %64,2 ± 1,05-koa. Beraz, esan daiteke prestatutako formulazioa zelulara sartzen dela eta gainera, lipofektaminak baino toxikotasun txikiagoa erakusten du.

Behin baieztatuta nioplexoak zelulan barneratzen direla, zelulan ze bidetik sartzen diren eta behin barruan nola banatzen diren ikertu da. Kasu honetan, zelulara sartzeko dauden bide desberdinak (kabeolak, klatrinak, makropinozitosia) eta lisosomak fluoreszentziarekin gorriz markatu dira. Ondoren, niosomaren fluoreszentzia berdea ze biderekin kolokalizatzen den begiratu da mikroskopio konfokalean. Mikroskopioan kolokalizazioa ikusteaz gain, CCF funtzioa (*cross-correlation function*) erabilita kuantifikatu da. Guzti hau eginda, ondorioztatu daiteke GPxT-CQ/DNA nioplexoa batez ere kabeolen bidetik sartzen dela zelulara. Alabaina, ez dago kolokalizaziorik lisosomekin. Honek esan nahi du nioplexoak ez direla elkartzen lisosomekin eta beraz, ez direla degradatuko zelulara sartu bezain pronto.

4. Ondorioak

Batetik, ikerketa honek hUSCak pazientetik modu ez-inbaditzaile, erraz, sinple eta seguruan isolatzeko lehen protokoloa deskribatzen du. Bestetik, ikerketa honetan garatutako nioplexoek hUSCetan trasfekzio-efizientzia txikia erakutsi duten arren, lortutako emaitzekin transfekzio prozesu konplexuaren ezagutza handitu da aurrera begira hobekuntza ekarriko duten estrategiak diseinatu ahal izateko. Azkenik, agerian gelditzen da hUSCak iturri oso interesgarria direla biralak ez diren bektoreekin burututako terapia genikorako edota aurrerantzen aztertu beharreko beste aplikazio kliniko batzuetarako.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Oraindik fase oso goiztiarrean dauden eta optimizazioa behar duten entseguak dira lan honetan aurkeztutakoak. Hala ere, zelula hauek pazientearengandik erraz lortzen direnez, medikuntza pertsonalizaturako gaixotasun eredu zehatzak garatzeko oso interesgarriak dira. Horrez gain, zelula hauek potentzial handia izan dezakete klinikaren beste alor batzuetan, terapia zelularrean esaterako.

6. Erreferentziak

Chen, C-Y. et al. (2018), Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitaets diabetic wound repair by promotng angiogenesis, *Theranostics*, 8(6), 1607-1623.

Chen, L. et al. (2018), Human Urine-Derived Stem Cells: Potential for Cell-Based Therapy of Cartilage Defects, *Stem Cells International*, 4686259.

de Carvalho, T.-G. et al. (2018), A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells, *Biotechnology Letters*, 40, 617-622.

Grijalvo, S. et al. (2019), Cationic Niosomes as Non-Viral Vehicles for Nucleic Acids: Challenges and Opportunities in Gene Delivery, *Pharmaceutics*, 11(2), 50-73.

Guan, J.-J. et al. (2014), Biological characteristics of human-urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy in neurology, *Tissue Engineering Part A*, 20, 1794-1806.

Horwitz, E. M. et al. (2005), Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 7, 393-395.

Hosseinkhani, H. eta Tabata, Y. (2006), Self Assembly of DNA Nanoparticles with Polycations for the Delivery of Genetic Materials into Cells, *Journal for Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 2320-2328.

Ma, B. (2007), Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 123, 184-194.

Marianecci, C. et al. (2014), Niosomes from 80s to present: the state of the art, *Advances in Colloid and Interface Science*, 205, 187-206.

Mintzer, M.-A. eta Simanek, E.-E. (2009), Nonviral vectors for gene delivery, *Chemical Reviews*, 109, 259-302.

Moghassemi, S. eta Hadjizadeh, A. (2015), Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review, *Journal of Controlled Release*, 185, 22-36.

Mohammadian, M. et al (2016), Mesenchymal stem cell-based gene therapy: A promising therapeutic strategy, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(5), 1206-1211.

Pavathuparambil, A.-M. et al. (2018), Urine-derived cells for human cell therapy, *Stem Cell Research & Therapy*, 9, 180-191.

Pezzoli, D. (2012), We still have a long way to go to effectively deliver genes!, *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 10, 82-91.

——————— , (2013), Lipid-Based Nanoparticles as Nonviral Gene Delivery Vectors, *Methods in Molecular Biology*, 1025, 269-279.

Reiser, J. et al. (2005), Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5, 1571-1584.

Turan, S. eta Bastepe, M. (2013), The GNAS complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprinted gene, *Hormone Research in Paediatrics*, 80, 229-2411.

Zhang, Y. et al. (2008), Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction, *Journal of Urology*, 180, 2226-2233.

7. Eskerrak eta oharrak

- Lan hau hainbat dirulaguntzari esker burutu ahal izan da: EITB Maratoia (BIO16/ER/005), Euskal Herriko Unibertsitatea (PIF17/29) eta Eusko Jaurlaritza (PRE_2017-1-0365). Asistentzia tekniko eta intelektuala eskertuko nahiko genioke "NANBIOSIS" plataformari, zehazki, Bioingeniaritza, Biomaterial eta Nanomedikuntza CIBER (CIBER-BBN) medikamendu formulazio unitateari (U10), Euskal Herriko Unibertsitatean. Ikerketa aurrera eramateko, idatzi honen autoreaz gain beste pertsona batzuek hartu dute parte: Myriam Sainz-Ramos eta Gustavo Puras doktorea (NanoBioCel Ikerketa Taldea), Arrate Pereda doktorea (Gaixotasun Arraroen Ikerketa Taldea), Shifa Jebari-Benslaiman eta Cesar Martin doktorea (Biofisika institutua) eta Melania Rosique eta Marian Martinez de Pancorbo doktorea (BIOMICS Ikerketa Taldea).
- Lan hau Yerai Vadoren tesirako ikerketaren atal bati dagokio. Gainera, aldizkari zientifiko batean argitaratzeko bidean dago.

Giza garun postmortemeko nukleo neuronalen eta ez-neuronalen banaketa

Martinez-Peula, Ɵ.[1], Ramos, A.[1,2], Morentin, B.[4], Callado, L.F.[1,2,3], Meana, J.J.[1,2,3], Rivero, G.[1,2,3]

[1]Farmakologia saila, Medikuntza eta Erizaintza fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Espainia, [2]CIBERSAM (Centro de investigación Biomédica en red de Salud Mental), Espainia, [3]Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketa Institutua, Barakaldo, Espainia, [4]Auzitegiko Euskal Medikuntzako Institutua, Bilbo, Espainia
oihane.martinez@ehu.eus

Laburpena

Zelulen banaketa teknikak gaixotasun ezberdinen diagnostikoan eta pronostikoan maiz erabiltzen dira. Ikerkuntza arloan, teknika hauek ere mekanismo zelular ezberdinak ulertzeko erabilgarriak izan daitezke. Fluoreszentzia bidez aktibatutako zelulen banaketak (FACS) eskaintzen dituen abantailak direla eta, gaixotasun neuroendekaitzaileen eta psikiatrikoen etiopatogenia ulertzeko tresna bezala postulatu da. Ikerketa honetan, izoztutako giza garun postmortemeko laginetatik nukleo neuronal eta ez-neuronalak FACSen bidez banatzea lortu da. Protokolo honi esker, nerbio sistema zentraleko zelula mota bakoitzean espezifikoki ematen diren erregulazio mekanismoak aztertzeari atea ireki zaio.

Hitz gakoak: zelula banaketa teknikak, fluoreszentzia bidez aktibatutako zelulen banaketa (FACS), giza garun postmortema

Abstract

Cell separation techniques are usually performed for the diagnosis and prognosis of different diseases. In research, these techniques could be useful for understanding specific cellular mechanisms. Because of its advantages, fluorescence activating cell sorting (FACS) has been proposed to study the ethiopathology of neurodegenerative and psychiatric diseases. In this work, neuronal and non-neuronal nuclei from frozen human postmortem brain tissue samples have been separated by FACS. This protocol has opened the door to study the regulatory mechanisms that are specifically performed by each cell type in the central nervous system.

Key words: cell separation techniques, fluorescence activating cell sorting (FACS), human postmortem brain

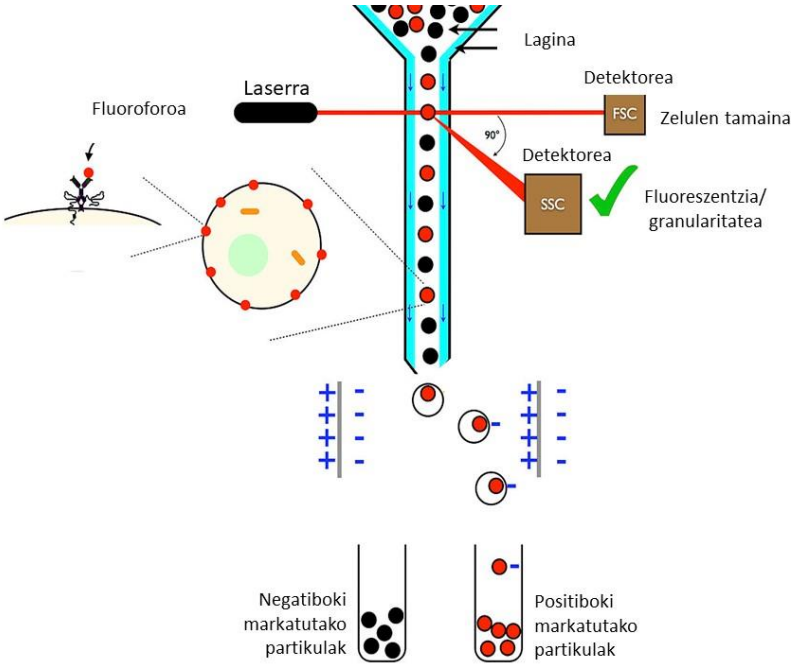
1. Sarrera

Zelulen banaketarako metodologiek biologia zelularrean, immunologian, zelula amen eta minbiziaren inguruko ikerkuntzan berebiziko garrantzia dute. Beraiei esker, minbizia eta giza immunoeskasiaren birusaren (GIB) pronostikoa, hezur-muin transplante autologoak eta mikroorganismo patogenikoen isolamendu eta detekzioa ahalbidetzen da. Zelula populazio ezberdinak banatzen hasi zirenean, zelulen dentsitatea, tamaina eta formaren arabera banatzen ziren. Horretarako teknika ohikoenak mikroiragazketak, ultrairagazketak eta ultrazentrifugazioak ziren, baina hauek espezifikotasun baxua eskaintzen zuten. Azken hamarkadetan, zelulen banaketetarako teknologien inguruan aurrerakuntza handiak egin dira, eta hain oparo ez diren edota bereziak diren populazioak eraginkortasun eta purutasun gehiagorekin sailkatzea lortu da. Zelula bereziak karakterizatzeak gaixotasunen diagnostikoan eta pronostikoan ez ezik zelula horien barnean ematen diren erregulazio mekanismoak ulertzen ere laguntzen du. Hau da, zelula normal bat nola bihurtzen den patogeniko azal dezake. Gainera, gaixotasunen patogenia ondo ulertzeko, prozesu zelularrak zelularen maila ezberdinetan (nukleoan, zitoplasman, etab) ikertu behar dira (Bayer & Jungbauer, 2007).

Prozesu biokimiko edo zelularrak ikertzeko erabiltzen diren teknikak banatutako zelula populazioetan modu arrakastatsuan aplikatu ahal izateko, banaketa prozesua espezifikoa izateaz gain, zelulen integritatea babestu behar du. Banaketa prozesuaren ostean esperimentu mota bakoitza burutzeko behar den zelula kopurua ere faktore garrantzitsu bat da. Horrekin batera, zenbat denbora behar den zelula kopuru hori banatzeko ere kontuan hartu behar da. Denbora optimizatzeko eta kaltea murrizteko,

banaketa tekniken bidez prozesatuko diren laginen purutasuna ere egokia izan behar da. Horretarako, banaketa prozesua hasi baino lehen, laginen prozesamendua eraginkorra izatea garrantzitsua da (Valihrach, Androvic, & Kubista, 2018).

Banaketa teknikei dagokionez, irizpide fisikoetan oinarritzen diren teknikak eta afinitatean oinarritzen diren teknikak daude. Afinitateaz baliatzen diren tekniketan, antigeno ezberdinen kontrako antigorputzak erabiltzen dituzte intereseko populazioa detektatzeko. Azken multzo honen barruan sartzen den eta gorabidean dagoen teknika bat, fluoreszentzia bidez aktibatutako zelula banaketa (FACS) da. FACS teknika fluxu zitometrian oinarritzen da. Fluxu zitometrian lagin heterogeneo batetik zelulak beraien morfologia tamaina eta granularitateagatik ezberdintzen dira, hau da, zitometroak partikula bakoitzaren ezaugarriak ezagutzen ditu eta deskripzio bat ematen du. Horrez gain, partikulak fluoroforoekin markatuta badaude, igortzen duten fluoreszentziaren intentsitatearen arabera ere sailkatzen ditu. FACS teknikan, zelularen ezaugarri fisikoen eta igortzen duten fluoreszentziaren arabera zelulak analizatzeaz gain, ere banatzen dira (Bayer & Jungbauer, 2007) (1. irudia) FACSen bidez zelulak sailkatu ahal izateko, fluxu zitometrian bezala, zelulak suspentsio batean egon behar dira. Horrek FACS odol laginen analisirako teknika ezin hobea bihurtzen du. Gainera, FACSaren bidez zelula kopuru altua banatzen da, zelulen integritatea mantentzen delarik (Herzenberg et al., 2002).



1. irudia. Fluoreszentzia bidez aktibatutako zelulen banaketa (FACS) teknika eta tresnak. Suspentsio batean dagoen lagina zitometrotik pasatzean, detektoreek laginaren partikula bakoitza bere granularitateagatik (SSC) eta tamainagatik (FSC) ezberdintzen dute. Azkenik, laginetan gehitutako fluoroforoaren seinalearen arabera sailkatzen dira ("Cell sorting - Wikipedia", Creative Commons lizentziapean argitaratutakoaren aldaketa).

Gaur egun, FACSak asaldura hematologikoen sailkapenean eta diagnostikoan gero eta gehiago erabiltzen ari da, baita mentuen kalitatearen ebaluazioan. Izan ere, zelula mota ezberdinak beraien morfologiagatik erraz ezberdindu daitezke eta ondorioz, banaketa prozesua errazago eta eraginkorragoa da. Behin zelula mota bakoitza morfologiagatik sailkatuta, egoera patologiko batean espresatzen diren gainazaleko proteinetan oinarrituta banaketa egin daiteke (Bayer & Jungbauer, 2007). Azken urteetan, FACS teknika arlo ezberdinetan erabilia izan da, hala nola, onkologian, immunologian, transplanteetan, eta genetikan. FACSaren erabilera ezberdin hauek, beste arloetara ere zabaldu dira, honen adibide bat neurobiologia delarik (Bayer & Jungbauer, 2007; Herzenberg et al., 2002; Martin, Xu, Porretta, & Nichols, 2017).

Nerbio sistema zentrala (NSZ) beraien artean konektatuta dauden zelula populazio heterogeneoaz osatuta dago. Zelula populazio hauek beraien morfologia, aktibitate fisiologiko eta beraien nortasun molekularragatik ezberdintzen dira. Nagusiki, NSZko zelulak bi multzo nagusitan banatzen dira: zelula neuronal eta zelula glialen artean (Miller & Gauthier, 2007). Neurona garunaren unitate basikoa da, eta

bere funtzio nagusia mezularia izatea da. Informazio transmititzeko nerbio bulkadak eta seinale kimikoak erabiltzen dituzte. Neurona bat hiru atalez osatuta dago: axoia, dendritak eta gorputza edo soma. Neuronen nukleoan, beste zeluletan bezala, material genetikoa dago. Soman dendritak hedatzen dira eta beste neuronek bidalitako mezuak jasotzeko arduradunak dira. Axoiak zelulatik mezuak transmititzen ditu. Horrela, mezua garunaren area ezberdinetara bidaliko da edo garunetik beste NSZko aldeetara helduko da (Purves et al., 2008).

Zelula glialak ez dira neuronak bezala, neuronak baino txikiagoak dira eta ez dute dendritarik ezta axoirik. Zelula glialen artean, beraien morfologia eta funtzioagatik astrozitoak, mikroglia eta oligodendrozitoak bereizten dira. Astrozitoen presentzia NSZ osotik hedatzen da, hau da, ez dago alderik astrozitorik gabe. Astrozitoek ez dute mezulari funtzioa baina sinapsi neuronalentzako ezinbestekoak diren faktoreak kontrolatzen dituzte, esaterako, sinapsietan eragin dezaketen hazkuntza-faktoreak askatuz (Sofroniew & Vinters, 2010). Oligodendrozitoak ere NSZera mugatzen diren zelulak dira. Mota honetako zelulek mielinizazio prozesuan parte hartzen dute eta neuronen axoientzat beharrezkoak diren faktoreak eskaintzen dituzte (Tiane et al., 2019). Mikroglia gliaren %10-20 osatzen duten tamaina txikiko zelula glialak dira, eta beraien jatorria zelula-ama hematopoietikoetatik dator (Hammond, Robinton, & Stevens, 2018). Hori dela eta, makrofagoekin ezaugarri asko partekatzen dituzte. Mikrogliak garunaren garapena erregulatzen du. Fagozitosiaren bitartez, mikrogliak sinapsietan parte hartzen duten elementuak, garun hondakinak, bizirik edo hilda dauden zelulak, axoiak, etab. suntsitzen ditu. Mikrogliak ere mielinizazio eta neurogenesia bezalako prozesuak eragiten ditu, eta zelulen heriotzan eta biziraupenean parte hartzen du (Lenz & Nelson, 2018).

Zelula mota ezberdin hauen funtzio eta gaixotasunen arteko erlazioa ezagutzea ikerketa gai nagusia izan da. Baina, gehienetan ikerketa horiek neuronetan zentratu dira, zelula glialak neuronen sostengu funtzioa soilik zutela pentsatzen zelakoan. Azken urteetan, zientzialariak patogenia heterogeneoa duten gaixotasun psikiatriko eta neuroendekatzaileetan neuronen paperaz gain, beste NSZko zelulen rola ere ikasten hasi dira. Mikrogliaren paper babesgarria zein toxikoa Parkinsonen gaixotasunean, esklerosi anizkoitzean eta Alzheimerren gaixotasunean ikasi da. Gaixotasun neuroendekatzaile hauetan, neuronen inguruan mikroglia pilaketak ikusi dira eta mikrogliak aska ditzakeen faktoreen eragina aztertzen ari da (Mizuno, 2015). Gainera, neuronen eta mikrogliaren arteko elkarrekintzak neuroinflamazioaren oinarri dira, eskizofrenia eta autismo bezalako asalduretan (Liao, Yang, Wang, & Li, 2020; Marques et al., 2019). NSZa konektatuta dauden zelula mota ezberdinez osatuta dago, eta bakoitzaren papera ulertzeko zelula mota bakoitzaren ezaugarriak ezagutzea ezinbestekoa da. Zelula banaketa teknikek neuronen eta zelula glialen arteko elkarrekintza ulertzea erraz dezakete.

Duela 30 urte baino gehiago, zelula barneko markatzaileei esker arratoiaren neurona populazio bat banandu zen (Paden, Berglund, Hapner, & Welsh, 1986). Hala ere, momentu puntual horretatik aurrera fluxu zitometria neurozientziaren arlotik at gelditu izan da (Martin et al., 2017). Izan ere, garun-ehunean zelulak banatzean hainbat zailtasun aurki daitezke. Zelula-zelula arteko loturen gogortasuna dela eta, banaketa prozesua zelulei kalterik egin gabe burutzea zaila da. Nahiz eta zelulak banatzea lortu, zelulak FACS prozedurara bizirauteko posibilitate baxuak daude. Bestalde, populazio neuronalak beste tekniken bidez ere identifikatu daitezke, adibidez, immunohistokimikaren bitartez. Gainera, immunohistokimikan erabil daitezkeen markatzaile zelular espezifiko ugari eskura daude (Okada et al., 2011).

Geneen adierazpena eta erlazionatuta dauden mekanismo epigenetikoak ulertzeko erabiltzen diren teknikak, interpretaziorako zailak diren emaitzak aurkezten dituzte. Izan ere, teknika gehienak ehunen homogeneizatuetan burutzen dira, non zelula mota ezberdintzen ez den. Baina, NSZko zelulen nukleotan markatzaile espezifikoak bereiz datezke eta hauei esker, zientzialari batzuek zelula mota ezberdinetako nukleoak banatzea lortu dute (Dincer et al., 2015; Halene et al., 2016).

2. Helburuak

Neuropsikofarmakologiako ikerkuntza taldeak, giza garun postmortemeko lagin sorta kudeatzen du. Giza garun postmortemeko laginak Auzitegiko Euskal Medikuntzako Institutuan burutzen diren autopsien bitartez lortzen dira. Heriotza-mekanismoa istripua, hilketa eta suizidioa izaten da gehienetan.

Hau dela eta, garun sorta honetan asaldura psikiatrikoak zeuzkaten pazienteenak daude. Taldean, gaixotasun psikiatriko ezberdinen etiopatogenia eta mekanismo farmakologikoak ikasten dira. Gaixotasun psikiatrikoetan gerta daitezkeen asaldurak eta tratamendu psikofarmakologikoen modulazioa ulertzeko, zelula barnean ematen diren mekanismo erregulatzaileak eta geneen adierazpena ezagutu behar da. Zelula neuronalen eta ez-neuronalak ezberdintzeak garun-gaixotasunen inguruko etiopatogenia ulertzen lagunduko luke. Tamalez, arestian azaldu den bezala NSZko zelulen banaketa eta isolatzea teknikoki zaila da. Beraz, NSZko zelula neuronal eta ez-neuronalen mekanismoak ulertzeko nukleo zelularren banaketa burutu da.

Proiektu honen helburu nagusia giza garun postmortemeko nukleo neuronalen eta ez-neuronalen banaketa eta karakterizaziorako protokolo bat diseinatzea da. Helburu nagusia hori izanda, hurrengo bigarren mailako helburuak definitu dira:

1) Izoztutako (-80ºC-tan) garun laginetatik nukleoak banatzea, eta purifikatzea laginaren eduki nuklearra kaltetu baino lehen.
2) Markatzaileen bitartez, isolatutako nukleo neuronalak modu eraginkorrean eta espezifikoan markatzea.
3) FACS teknikaren bitartez, isolatutako nukleoei egindako markajeari esker, nukleo neuronalak eta ez-neuronalak banatzea. Banatze prozesu honetan, ahalik eta nukleo kopuru gehien lortzea, nukleoen ezaugarriak kaltetzen ez direlarik.

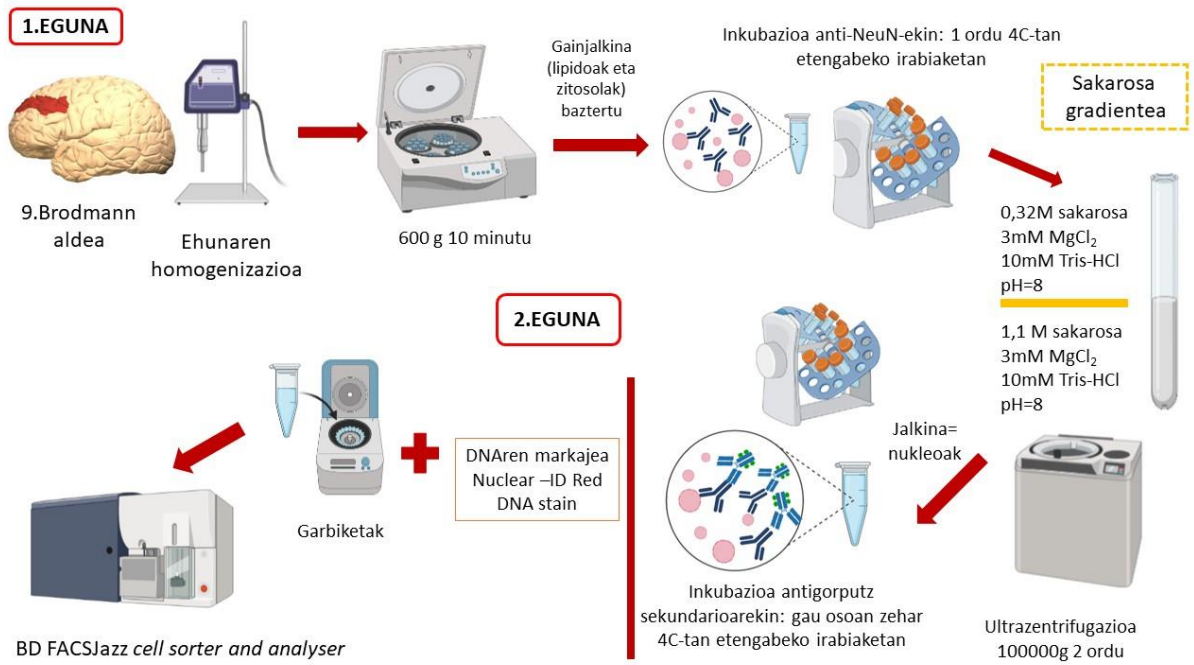
3. Ikerketaren muina

Ikerketa honetarako, giza garun postmortemaren kortex prefrontala aukeratu zen. Garuneko alde hau prozesu kognitiboetan paper garrantzitsua jokatzeaz gain, kortex prefrontalaren desoreka hainbat gaixotasun psikiatriko eta neurologikoetan behatu da, hala nola, antsietatean, depresioan, eskizofrenian eta Parkinsonen gaixotasunean (Xu, Chen, Li, Xing, & Lu, 2019).

Garun postmortemeko laginetatik nukleoak isolatzeko, laborategian ohituraz erabiltzen den metodoa jarraitzen da. Kortex prefrontalaren alde bat disekzionatu ondoren, protokoloaren lehenengo pausua laginak homogenizatzea da eta osagai lipidikoak zein zitosolak zentrifugazio azkar batez kentzea da. Ondoren, mielina zorroak kentzeko eta nukleoak isolatzeko sakarosa gradiente batekin eta ultrazentrifugazio baten bidez, nukleoak hauspeatzen dira. Prozesu honetan nukleoak purifikatzen dira, hala ere, nukleoak ez diren zelula osagaien arrastoak geldi daitezke. Horiek FACSean ezberdindu ahal izateko eta nukleoak ikusten ari garela baieztatzeko, DNAri lotzen den markatzaile bat gehitzen da, zehazki, Nuclear –ID Red DNA stain (#52406, Enzo Life Sciences) (2. Irudia).

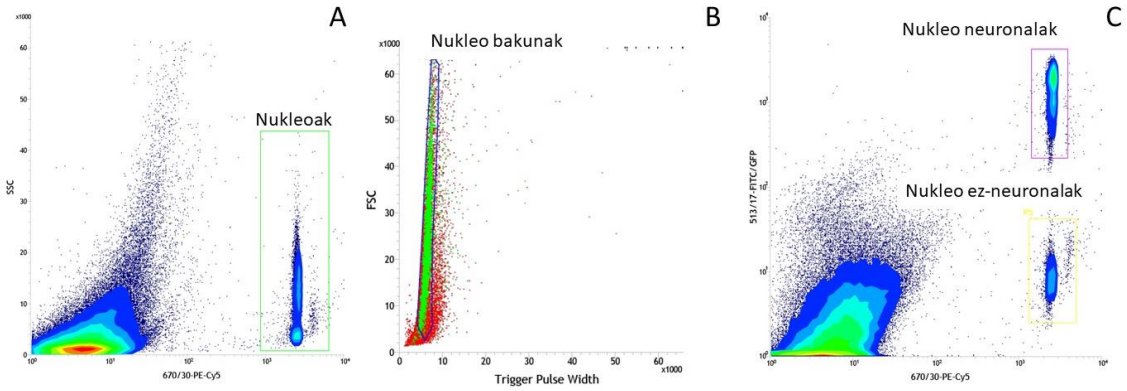
Nukleo ez-neuronalak neuronaletatik ezberdintzeko, zelula barneko markatzaile espezifiko baten kontrako antigorputz bat gehitzea ezinbestekoa da. Kasu honetan, NeuN markatzailea aukeratu zen. NeuN ugaztunen NSZko neurona gehienen nukleoan eta zitoplasman agertzen den proteina da (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015). Immunohistokimika esperimentuen bidez, NeuN proteina bakarrik nerbio sistemako zeluletan agertzen zela ondorioztatu zen. Gainera, NeuN ez da inoiz zelula glialetan detektatu. Proteina hau enbriogenesian sortzen da eta neurona helduetan espresatzen da. NeuN-ari itsasten diren antigorputzek neurona mota gehienak identifikatzen dituzte eta lotura hori, batez ere, markaje nuklearrarekin erlazionatzen da (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015). Metodologia ezberdinetarako, NeuN ezagutzen duten antigorputz primario ezberdinak daude, protokolo honetarako, anti-NeuN, A60 klona (#MAB377, Merck Millipore) erabili zen eta antigorputz sekundario bezala, primarioari lotzen den Alexa Fluor 488 (#R37114, Invitrogen). Bi antigorputz hauek lotura-leku ez-espezifikoak blokeatzen dituen soluzioan (%1 ahuntz-jatorriko seruma, 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl eta 2 mM $MgCl_2$) gehitzen dira.

Nukleo neuronalen analisia Achucarroko FACSean (BD FACSJazz *cell sorter and analyser*) burutzen da. Lehen aipatu denez, FACSaren bidez laginak analizatu ahal izateko, suspentsio batean egon behar dira, horretarako, nukleoen egitura mantentzen zuen eta zitometroarekin bateragarria zen disoluzio bat aukeratu zen. Disoluzio hau, kaltzio, magnesio, eta sodio gatz ezberdinez osatuta dago. Azkenengo pausu bezala, nukleoen suspentsioa diluitzen eta iragazten da.



2. irudia. Nukleo neuronalak eta ez-neuronalak banatzeko metodologia.

3. irudian azaltzen den bezala, nukleoak banatu aurretik, intereseko populazioak aukeratzen dira (laukien barnean). Karakterizaziorako lehenengo pausua nukleo populazioa zehaztea da, eta horretarako, DNAri lotzen den markatzailearen seinalea aztertzen da (3. irudia, A). Partikulek laserra zeharkatzen dutenean, iragazi arren, agregatu daitezke eta bakarka laserretik pasatu ordez, beste partikulekin batera pasatzea. Fenomeno horri *doublets* edo bikote deritzogu. Hori dela eta, aukeratutako nukleoen populaziotik bikoteen seinalea baztertzen da (3. irudia, B). Azkenik, nukleo neuronalak eta ez-neuronalak sailkatzeko (3. irudia, C), NeuN markatzailearen seinalea, nukleoei lotzen den markatzailearen aurrean irudikatzen da. NeuN seinalea positiboa bada, nukleo neuronalak direla ondorioztatuko da. NeuN seinale negatiboa izanda, nukleo horiek ez-neuronalak direla determinatuko da. Karakterizazio honetan nukleo populazio bakoitzeko (nukleo neuronalak eta ez-neuronalak) 600.000 inguruko nukleo kopurua lortu da.



3. irudia. Nukleo neuronal eta ez-neuronalen karakterizazioa eta sailkapena FACSen bidez. A: Garun-ehuna prozesatu ondoren lortzen den nukleoen seinalea. Y ardatzean nukleoen konplexutasuna (SSC) eta x ardatzean, DNAri lotzen den markatzailearen fluoreszentzia seinalea (PE-Cy5) irudikatzen dira. B: A grafikoan aukeratutako nukleo populazioaren nukleo bakunen aukeraketa, nukleoen tamaina (y ardatza, FSC) eta seinalearen intentsitatea kontuan izanda. C: B grafikoan aukeratutako nukleo bakunen fluoreszentzia seinalea. X ardatzean DNAri lotzen den markatzailearen seinalea irudikatzen da eta y ardatzean, NeuN-i lotutako fluoroforoaren seinalea.

4. Ondorioak

Lan honen bitartez, giza garun postmortemeko laginetan nukleoak isolatzeko eta nukleo neuronalak ez-neuronaletatik banatzeko protokolo bat diseinatu da. Alde batetik, izoztutako giza garun postmortemeko laginetatik nukleoak isolatzea lortu da. Nukleo puruak lortu dira, eta nukleoekiko eta neuronekiko

espezifikoak diren markatzaileetara lotu dira. Bestalde, FACS teknikaren bidez bi populazioak (neuronala eta ez-neuronala) modu eraginkor batean banatzea lortu da, beste teknika batzuk burutu ahal izateko nahikoa den nukleo kopurua berreskuratuz. Hurrengo esperimentuetan, geneen adierazpena aztertzen duten qPCR (PCR kuantitatiboa) eta DNA eta RNA sekuentziazio teknikak burutu nahi dira. Metodologia horiei esker, neuronetan espezifikoki ematen diren prozesuak eta mekanismoak ikasi ahal izango dira. Nukleoen banaketa esperimentuak, ikerketa taldeak kudeatzen duen asaldura psikiatrikoen kohorteetan burutzea planeatzen da, gaixotasun hauen etiopatogenia ezagutzen laguntzeko asmoz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Banatutako nukleo neuronal eta ez-neuronaletan hainbat teknika ezberdin burutu daitezke.Interesgarrienak epigenetikarekin erlazionatuta daude, kromatina neuronal eta ez-neuronala ikertuz geneen adierazpena modulatzen duten mekanismoetan sakontzeko.

Nahiz eta FACS teknikaren bidez, nukleo populazioak modu arrakastatsuan banatu, banaketa prozesu honek etorkizunean burutu nahi diren tekniken eraginkortasunean eragin dezake. Adibidez, banaketa prozesua iraun duen denbora, banaketa osteko kontserbazioa eta nukleo kopurua beste tekniken optimizaziorako faktore mugatzaileak izan daitezke. Faktore horiek beste teknikekin bateragarriak izateko, banaketa prozesuaren baldintzak optimizatu behar dira. Horretarako, banatutako nukleoei beste tekniken bitartez zenbat etekin atera ahal zaien aztertu beharko da. Hortaz, etorkizuneko esperimentuak banaketa prozesuaren optimizazioan eta tekniken eraginkortasuna hobetzean zentratuko dira.

6. Erreferentziak

Bayer, K., & Jungbauer, A. (2007). Advances in biochemical engineering science. In *Journal of Biotechnology*, 132, 97-98

Cell sorting - Wikipedia. (n.d.). Retrieved March 8, 2021, from https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_sorting

Dincer, A., Gavin, D. P., Xu, K., Zhang, B., Dudley, J. T., Schadt, E. E., & Akbarian, S. (2015). Deciphering H3K4me3 broad domains associated with gene-regulatory networks and conserved epigenomic landscapes in the human brain. *Translational Psychiatry*, 5, 1-14

Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae*, 7, 42–47.

Halene, T. B., Kozlenkov, A., Jiang, Y., Mitchell, A. C., Javidfar, B., Dincer, A., … Akbarian, S. (2016). NeuN+ neuronal nuclei in non-human primate prefrontal cortex and subcortical white matter after clozapine exposure. *Schizophrenia Research*, 170, 235–244.

Hammond, T. R., Robinton, D., & Stevens, B. (2018). Microglia and the Brain: Complementary Partners in Development and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34, 523–544.

Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (2002). The history and future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and flow cytometry: A view from Stanford. *Clinical Chemistry*, 48, 1819–1827.

Lenz, K. M., & Nelson, L. H. (2018). Microglia and beyond: Innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. *Frontiers in Immunology*, 9, 68

Liao, X., Yang, J., Wang, H., & Li, Y. (2020). Microglia mediated neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 130, 167–176.

Marques, T. R., Ashok, A. H., Pillinger, T., Veronese, M., Turkheimer, F. E., Dazzan, P., … Howes, O. D. (2019). Neuroinflammation in schizophrenia: meta-analysis of in vivo microglial imaging studies. *Psychological Medicine*, 49, 2186–2196.

Martin, D., Xu, J., Porretta, C., & Nichols, C. D. (2017). Neurocytometry: Flow Cytometric Sorting of Specific Neuronal Populations from Human and Rodent Brain. *ACS Chemical Neuroscience*, 8, 356–367.

Miller, F. D., & Gauthier, A. S. (2007). Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron*, 54, 357–369.

Mizuno, T. (2015). Neuron-microglia interactions in neuroinflammation. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 6, 225–231.

Okada, S., Saiwai, H., Kumamaru, H., Kubota, K., Harada, A., Yamaguchi, M., … Ohkawa, Y. (2011). Flow cytometric sorting of neuronal and glial nuclei from central nervous system tissue. *Journal of Cellular Physiology*, 226, 552–558.

Paden, C. M., Berglund, D. L., Hapner, S. J., & Welsh, C. J. (1986). A flow cytometric method for intracellular labeling and purification of rare neuronal populations: Isolation of fixed neurophysin neurons. *Brain Research*, 376, 310–319.

Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., McNamara, J., & White, L. (2001). *Neuroscience. 2nd edition.* Sinahuer associates. Sunderland (MA).

Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119, 7–35.

Tiane, A., Schepers, M., Rombaut, B., Hupperts, R., Prickaerts, J., Hellings, N., … Vanmierlo, T. (2019). From OPC to Oligodendrocyte: An Epigenetic Journey. *Cells*, 8, 1–19.

Valihrach, L., Androvic, P., & Kubista, M. (2018). Platforms for single-cell collection and analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 22–24.

Xu, P., Chen, A., Li, Y., Xing, X., & Lu, H. (2019). Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiological Genomics*, 51, 432-442

7. Eskerrak eta oharrak

Esperimentu hauek UPV/EHUko doktoratu aurreko laguntza, Eusko Jaurlaritzaren (IT1211-2019) eta Espainiako MINECO (RTI 2018-094414-A-I00) proiektuen diru-laguntza jaso dute.

Haur eta nerabeen elikadura emozionala bultzatzen duten guraso eta haurren ezaugarriak: berrikuspen sistematikoa

Galdos, J. eta Pereda-Pereda, E.
Psikologia Klinikoa eta Osasunaren Psikologia eta Ikerketa Metodologia Saila, Psikologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)
eva.pereda@ehu.eus

Laburpena

Berrikuspen sistematiko hau haur eta nerabeen elikadura jokaera osasuntsuak zein osasungaitzak bultzatzen dituzten gurasoen elikatze estiloak eta adingabeen ezaugarriak azaltzeko asmoz burutu zen. Honetarako, PRISMA prozeduran oinarrituta 27 artikulu berrikusi ziren. Emaitzen arabera, adingabeen elikadura emozionala hauen tenperamentu eta auto-erregulazioaren eta gurasoen elikatze estilo eta jokaera batzuen araberakoa da. Nerabezaroan, elikadura emozionala bultzatzen duten aldagai berriak agertzen dira, auto-onarpena eta gorputz-irudia. Ondorioz, garrantzitsua da haurtzaro goiztiarretik elikagaiekiko harreman osasuntsua ezartzea elikagaien eta emozioen arteko harreman desegokiak dakartzan ondorio abertsiboak ekiditeko.

Hitz-gakoak: elikadura emozionala, erregulazio emozionala, gurasoen elikatze estiloak eta gurasoen elikatze jokaerak.

Abstract

This systematic review aimed to provide information about parents' feeding styles that promote healthy and unhealthy eating behaviors among children and adolescents, as well as the characteristics of the latter. Twenty-seven *articles were reviewed based on PRISMA procedure. According to the results, children and adolescents' emotional eating is closely related to their temperament and self-regulation, as well as to certain parental feeding styles and behaviors. During adolescence, self-compassion and body image emerge, which lead to greater emotional eating. Consequently, it is important to establish from early childhood a healthy relationship with food to avoid the aversive consequences derived from an inadequate relationship between food and emotions.*

Keywords: emotional eating, emotional regulation, parenting feeding styles, and parenting feeding behaviors.

1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egun elikadura emozionala emozio desatseginei erantzunez organismoak behar duena baino gehiago jateko joera moduan ezagutzen da (van Strien et al., 2016). Hala ere, berez gizaki guztiok haurtzaro goiztiarretik hasita bizitza osoan zehar aurrera eramaten dugun ekintza osasuntsu bat da, gure elikadura eta emozioak lotzen diren egoera espezifikoa. Elikadura emozionala kaltegarria bihur daiteke denboran zehar elikagaien eta emozioen arteko harremanean ezartzen ditugun ikaskuntza berrien ondorioz, zehazki, elikagaien hartzea bizitzako egoera abertsiboei aurre egiteko gure baliabide onenean bihurtzen dugunean (Herrero eta Andrades, 2019).

2. Arloko egoera eta helburuak

Ikaskuntza prozesuek jada haurdunaldian garrantzi handia daukate elikagai eta emozioekin osatutako asoziazioetan, izan ere, fetua zaporeak eta amak transmititzen dizkion emozioak lotzeko gai da. Beraz, Manella-ren arabera (2007), amaren elikadurak ere garrantzia izango du, amak kontsumitutako elikagai zein edari desberdinak eta inhalatutako substantziak zaku amniotikoaren edo esnearen bidez haurrarengana helduko direlako (Mennella et al.-ek aipatua, 2016). Geroago, haurraren garapenean zehar ematen diren elikagai eta emozioen arteko asoziazioak baldintzapen klasikoan eta instrumentalean oinarritzen dira (Birch eta Doub, 2014). Elikagai zehatz batzuekiko desira eta beste batzuekiko nazka garatu daitekeelarik, elikadura jokaera osasungaitzak garatzeko arriskua handituz (Rodenburg et al., 2013).

Era berean, gurasoak, haurren eredu nagusiak izatean, hauen mikro-sisteman paper garrantzitsua jokatzen dutela ondoriozta daiteke, adingabeen gehiegizko pisuaren prebalentzian gurasoekin erlazionatutako hainbat ezaugarrik eragingo dutelarik. Honi dagokionez, Pérez-Escamilla et al.-ek (2017) ziotenez, garrantzitsua da elikatzerako orduan helduek haurren sentikortasunari arreta jartzea, eta honi mugak eta errutinak edo arauak ezartzearen garrantzia gehitzen zaio. Comeche-ren eta Vallejo-ren (2012) arabera, etxeko errutina eta arau garbiak haurren auto-erregulazio handiagoarekin lotu dira, oraindik auto-erregulaziorako gaitasunik ez dutenean kanpotik erregulazio bat izatea ahalbidetzen dielako.

Ezaugarri hauek barne hartzen ez dituzten gurasoen elikatze estiloak haurren elikadura jokaera osasungaitzekin erlazionatzen direla pentsa dezakegu, eta alderantziz, ezaugarri hauek barne hartzen dituzten gurasoen elikatze estiloak haurren elikadura jokaera osasuntsuekin.

Ikaskuntza sozialaren teoriaren arabera (Bandura, 1977; Zarychta et al.-ek aipatua, 2019), haur eta nerabeek jokaera, jarrera eta erreakzio emozionalak hauentzat garrantzitsuak diren beste indibiduoen (atxikimendu irudien) jokaera, jarrera, erreakzio emozional eta hauek dakartzaten ondorioen bidez ikasten dituzte. Modu honetan, Frankel et al.-ek (2012) ikusi zutenez, gurasoak ikaskuntza sozialaz baliatuko dira haurrei auto-erregulaziorako estrategiak erakusteko, haurraren gose eta asetasun sentsazioez jabetu eta hauei elikagai mota eta kantitatearen aurreko aukeraketa egokia egiten lagunduz.

Nerabezaroan, gurasoek adingabeen gaineko errutina egituratu eta mugen kontrol gutxiago dutenez, ikaskuntza sozial modelatuak berebiziko garrantzia hartuko du. Honek, nerabearen elikadura jokaerak behatzea, agertu daitezkeen elikadura jokaera osasungaitzekiko arreta jartzea eta nerabearekin komunikatzea barne hartzen ditu (Balantekin et al., 2020).

Azkenik, haurraren tenperamentua bere eta gurasoen arteko harreman ziklikoan eragin garrantzitsua duen faktorea dela ikusi da, haurraren jateko auto-erregulazioan eraginez (Frankel et al., 2012).

2.1. Ikerketaren helburua

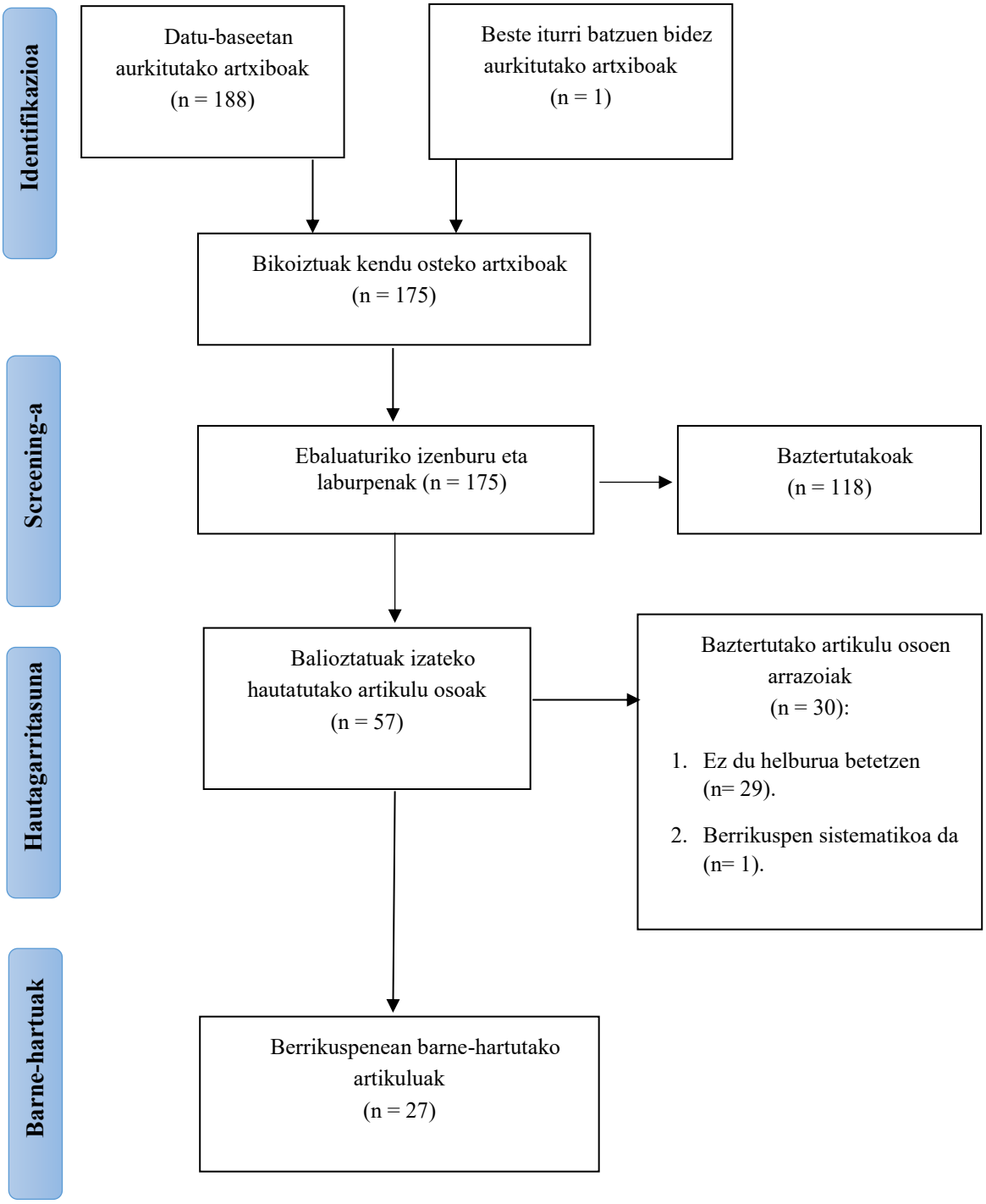
Aurrekoa ikusirik, lan honen helburua, berrikuspen sistematiko baten bidez haur eta nerabeetan elikadura emozionala oinarri izanik, elikadura jokaera osasungaitzak zein osasuntsuak bultzatzen dituzten gurasoen elikatze estiloak eta adingabeen ezaugarriak azaltzea izan zen.

3. Metodologia

Berrikuspen sistematiko honek PRISMA gidak adostutako metodologia jarraitu zuen (Moher et al., 2009). Artikuluen bilaketak Pubmed, Web Of Science, Scopus eta PsycINFO datu-baseetan gauzatu ziren, 2020. urteko urria eta azaroa bitartean. Horrez gain, artikulu bat manualki lortu zen. Bilaketa hauek egiteko hainbat hitz gako erabili ziren, zehazki: “emotional eating, emotions”, “emotional regulation”, “parenting styles” eta “feeding behavior”; eta hauek “AND” edo “OR” eragile boolearrekin konbinatu ziren bilaketa nagusia egiteko orduan. Bilaketa 2011 eta 2020 urte bitartean argitaratutako artikuluetara mugatu zen.

Bilaketa prozesuan 189 artikulu identifikatu ziren, horietako 14 bikoiztuta zeudelarik. Lortutako 175 artikuluen izenburu eta laburpenak irakurri ziren, honako barne-irizpideak jarraituz: (1) ingelesez edo gaztelaniaz idatzita egotea, (2) lagina jaiotzatik 18 urte bitartekoa izatea eta (3) berrikuspen sistematikoak eta meta-analisiak ez izatea. Irizpide hauek kontutan hartuta 118 artikulu baztertu ziren. Berrikuspen sistematiko hau egiteko baliagarriak izan zitezkeen 57 artikulu aukeratu ostean, banaka irakurri ziren eta helburuarekin bat ez zetozen guztiak eta aurretik ezarritako irizpideak betetzen ez zituzten 30 artikulu baztertu ziren. Beraz, berrikuspen sistematiko hau 27 artikuluz osatuta dago. Prozesu guztia fluxu-diagrama batean islatu zen (ikus 1. irudia).

1. irudia. Artikuluak hautatzeko fluxu-diagrama.



4. Emaitzak

4.1. Parte-hartzaileen ezaugarriak

Aztertutako ikerketa gehienetan lagina 100 pertsonatik 600 pertsona artekoa izan zen, hala ere, lauk 100 pertsonatik beherako (Carnell et al., 2014; Farrow et al., 2015; Rhee et al., 2015; Tan eta Holub, 2015) eta hiruk 600 pertsonatik gorako (Ferrer et al., 2017; Hughes eta Shewchuk, 2012; Steinsbekk et al., 2016) laginak izan zituzten.

Artikulu batzuk soilik haurrengan zentratu ziren (10 urte edo gutxiagoko haurrak) eta kasu hauetan lagina guraso-haur diadez osatuta egon zen, neurketa guztiak gurasoekin egin zirelarik (Berge et al., 2020; Braden et al., 2014; Carnell et al., 2014; Cross et al., 2014; Farrow et al.,

2015; Frankel et al., 2014, 2018; Hankey et al., 2016; Hughes et al., 2011; Hughes eta Shewchuk, 2012; Jansen et al., 2019; Kidwell et al., 2018; Powell et al., 2017; Powell et al., 2011; Rodgers et al., 2013; Steinsbekk et al., 2016; Tan eta Holub, 2015; Tate et al., 2016; Topham et al., 2011; Zhu et al., 2014). Beste azterlan batzuk, berriz, nerabeengan zentratu ziren, kasu hauetan nerabeak beraiek (Farrow, 2012; Vandewalle et al., 2014; Zhu et al., 2014), gurasoek (Rhee et al., 2015) edo bai guraso eta baita nerabeak ere (Ferrer et al., 2017; Goldstein et al., 2017; Gouveia et al., 2018) izan zirelarik galdetegiak bete zituztenak.

Azterlan guztietan parte hartu zuten guraso edo zaintzaile gehienak emakumezkoak izan ziren (Braden et al., 2014; Cross et al., 2014; Farrow et al., 2015; Ferrer et al., 2017; Frankel et al., 2014, 2018; Goldstein et al., 2017; Gouveia et al., 2018; Hankey et al., 2016; Hughes et al., 2011; Hughes eta Shewchuk, 2012; Jansen et al., 2019; Kidwell et al., 2018; Powell et al., 2017; Powell et al., 2011; Rhee et al., 2015; Rodgers et al., 2013; Steinsbekk et al., 2016; Tan eta Holub, 2015; Tate et al., 2016; Topham et al., 2011; Zhou et al., 2020) baina haurren sexua parekatua izan zen ikerketa guztietan lautan izan ezik, zeintzuetan neska gehiago zeuden mutilak baino (Farrow, 2012; Goldstein et al., 2017; Gouveia et al., 2018; Rhee et al., 2015). Arraza eta jatorriaren inguruko datuak askotarikoak izan ziren, gehienak Amerikako Estatu Batuetan (AEB) burutu zirelarik (Berge et al., 2020; Braden et al., 2014; Cross et al., 2014; Ferrer et al., 2017; Frankel et al., 2014, 2018; Goldstein et al., 2017; Hankey et al., 2016; Hughes et al., 2011; Hughes eta Shewchuk, 2012; Kidwell et al., 2018; Rhee et al., 2015; Tan eta Holub, 2015; Tate et al., 2016; Topham et al., 2011; Zhou et al., 2020).

4.2. Emaitzak haurrengan

Haurrengan zentratu ziren artikuluen emaitzak aztertzean, hauen elikadura jokaeretan eragina zuten ezaugarriak bere tenperamentua eta gurasoen elikatze estilo eta jokaerak zirela esan daiteke (Powell et al., 2011).

Haurren auto-erregulaziorako gaitasuna eta elikadura emozionala

Haurraren auto-erregulaziorako gaitasun baxuak gurasoen elikatze emozionalaren eta haurraren elikadura emozionalaren bitartekari moduan jokatzen duela ikusi zen, gurasoen partetik elikatze emozional/instrumentala jasotzen zuten eta auto-erregulaziorako gaitasun baxua zuten haurrengan elikadura emozionala handiagoa izango litzatekeelarik (Powell et al., 2017; Tan eta Holub, 2015).

Gurasoen elikatze jokaerek haurraren elikadura jokaeran zuten eragina

Elikatze instrumental/emozionalak eta jateko konbentzitzeko saiakera handiagoek haurraren elikagaiekiko sentikortasun handiagoa (Berge et al., 2020; Carnell et al., 2014; Steinsbekk et al., 2016) eta gain elikadura emozionalerako joera zekartzaten (Rodgers et al., 2013; Steinsbekk et al., 2016). Bestalde, Rodgers et al.-en (2013) arabera, gurasoen partetik jasotako modelakuntza negatiboki korrelazionatuta zegoen haurren elikadura emozional eta elikagaiekiko gerturapenarekin.

Haurraren tenperamentua eta gurasoen elikatze jokaerak

Elikagaiekiko gerturapena eta errefusa haurren tenperamentutik eratorritako bi elikadura jokaera izanik, haurraren elikagaiekiko gerturapena gurasoen murriztutako elikatzearekin erlazionatu zen eta haurraren elikagaiekiko errefusa, berriz, gurasoen jateko presioarekin edo kontrolezko elikatzearekin (Rodgers et al., 2013; Zhou et al., 2020). Gainera, elikadura emozional altuko haurrengan gainpisurako arriskua handiagoa zen tenperamentu zaileko haurrengan errazekoengan baino (Tate et al., 2016).

Haurraren tenperamentu zaila gurasoen emozio negatiboekin, elikatze jokaeretarako arazoekin eta elikatze emozional/instrumentalarekin lotu zen, baita gurasoek beren elikatze jokaerarako eraginkortasunaren pertzepzio baxuagoarekin (Hughes eta Shewchuk, 2012) eta haurraren elikadura selektiboarekin ere (Kidwell et al., 2018). Haurraren afektu positiboa, berriz, gurasoen elikatze jokaera eraginkorrarekin lotu zen (Hughes eta Shewchuk, 2012).

4.3. Emaitzak nerabeengan

Nerabeen elikadura emozionalaren aldagai aurresaleak

Nerabeen kasuan, elikadura emozionala hauen aurre egite estrategia desegokien eta afektibitate negatiboaren ondorio izan zen (Chen et al., 2019; Goldstein et al., 2017; Zhu et al., 2014). Izan ere, Farrow-ren (2012) aburuz, honek nerabea oldarkorragoa izatera eta ondorioz elikadura emozional handiagoa izatera eramango luke.

4.4. Haurren eta nerabeen elikadura emozionalaren arteko ezberdintasunak

Elikadura emozionalari dagokionez, Gouveia et al.-ek (2018) nerabezaroan agertzen diren baina haurtzaroan ematen ez diren ezaugarri batzuk zeudela aurkitu zuten, auto-onarpena eta gorputz-irudia adibidez.

Ikerketen arabera, sexuen arteko desberdintasunak zeuden norbere buruaren onarpenari eta gorputz-irudiari dagokienez; gurasoen arreta handiko heziketa-estiloaren eta nerabeen auto-onarpenaren arteko harremana soilik neskengan baitzen esanguratsua eta nerabeen auto-onarpen eta beren gorputzarekiko lotsaren arteko harremana bi sexuetan esanguratsua zen arren indartsuagoa zen neskengan (Gouveia et al., 2018). Azkenik, elikadura emozionala neskengan mutilengan baino ohikoagoa dela ikusi zen (Zhu et al., 2014).

5. Ondorioak

Berrikuspen sistematiko honen helburua haur eta nerabeetan elikadura emozionala oinarri izanik, elikadura jokaera osasungaitzak zein osasuntsuak bultzatzen dituzten gurasoen elikatze estiloak eta adingabeen ezaugarriak azaltzea zen. Autore batzuen arabera, badirudi eragin zikliko bat dagoela gurasoen elikatze jokaera/estiloen eta adingabearen elikadura jokaeren artean (Berge et al., 2020; Frankel et al., 2012; Powell et al., 2011).

Gurasoen elikatze jokaerei dagokienez, murriztutako elikatze jokaerak, jateko presioak eta elikatze instrumental/emozionalak haurraren elikagaiekiko gertutasuna edo errefusa, gain elikatzeko joera, elikadura emozionala eta ondorioz GMI altuagoa dakartza (Rodgers et al., 2013; Steinsbekk et al., 2016). Ondorioz, haurrak kanpoko elikadura jarriko du martxan barneko asetze erantzunei kasu egin gabe (Berge et al., 2020; Rodenburg et al., 2013; Zhou et al., 2020) eta honek guztiak haurraren elikadura jokaera disfuntzionala ekar lezake etorkizun batean (Carnell et al., 2014; Rodgers et al., 2013; Steinsbekk et al., 2016). Bestalde, Balantekin et al.-ek (2020) eta Frankel et al.-ek (2012) esandakoarekin bat etorriz, modelakuntzaren bidez haurrei elikaduraren inguruko ikaskuntza osasuntsuak transmititzen zaizkie eta auto-erregulaziorako estrategia egokiak eskuratzen laguntzen zaizkie, gose eta asetasun sentsazioez jabetuz (Carnell et al., 2014; Rodgers et al., 2013).

Gurasoen elikatze estiloari erreparatuz, estilo permisiboa jasaten duten haurrek kontrol baxuagoa jasotzen dute, asetasun erantzun baxuagoa eta elikagaiekin gozatzeko joera handiagoa aurkeztuz. Ondorioz, haur hauek auto-erregulaziorako zailtasun gehiago eta beraz, obesitatea pairatzeko arrisku handiagoa izango dute (Frankel et al., 2014; Hughes et al., 2011; Topham et al., 2011). Era berean, elikatze estilo autoritarioko familiengan, haurren elikaduraren gaineko kontrol handia ematen da, esaterako, jateko presioa edo murriztutako elikaduraren bidez (Shloim et al., 2015). Hau dela eta, haurrek beren gose eta asetze sentsazioak identifikatzeko zailtasunak izango dituzte eta honek auto-erregulazio okerrago batera eramango dituzte (Frankel et al., 2012). Aitzitik, gurasoen elikadura estilo demokratikoa jatorduen praktika egituratuagoekin, elikadura jokaera osasuntsuekin lotutako modelakuntza gehiagorekin eta haurren elikadura jokaera osasuntsuekin lotu izan da.

Beraz, elikatzerako orduko gutxiegizko (estilo permisiboa) nahiz gehiegizko kontrolak (estilo autoritarioa) haurraren elikadura jokaera osasungaitzak ekarriko dituela ikusi zen, bestalde, erdi mailako kontrolak (estilo demokratikoa) haurraren elikadura osasuntsuak sustatuko dituela (Frankel et al., 2014; Hughes et al., 2011; Topham et al., 2011).

Haurraren tenperamentuaren bi ezaugarri, zehazki, haurraren kontrolatzeko saiakerak (bere jokaeren auto-erregulaziorako balioko diona) eta segurtasuna (haurraren gaitasun prosozialekin lotzen dena) haurraren positibotasun eta gaitasun sozialekin lotu dira eta gurasoentzat haur hauen

jokaera erregulatzea errazagoa izateaz gain, gurasoen afektibitate positiboa, zaintzarako gogoa eta beren elikatze jokaeren eraginkortasunaren pertzepzioa gehituko dute. Bestalde, gurasoen afektu negatiboak elikatze arazoekin lotuta daude, zeina elikatze jokaeren eraginkortasunaren pertzepzio baxuagoarekin ere lotzen den (Hughes eta Shewchuk, 2012).

Nerabezaroan adingabeek duten aurre egite estrategia desegokien eta auto-erregulaziorako gaitasun baxuaren ondorioz ematen da elikadura emozionala, kasu hauetan nerabeen egoera abertsiboei aurre egiteko elikadura emozionala estrategia onenetariko bat izango baita (Chen et al., 2019; Goldstein et al., 2017; Zhu et al., 2014).

Aurretik egindako ikerketekin bat etorriz, modelakuntzak nerabeen elikadura emozionala gutxitzen duela ondorioztatu da (Farrow, 2012). Honez gain, Gouveia et al.-ek (2018) diotenez, nesken kasuan gurasoen partetik jasotako arreta handiko heziketa estiloak nerabeen elikadura emozional baxuagoa dakar, nerabeen auto-onarpenak bitartekari moduan jokatzen duenean; izan ere, auto-onarpen handiagoak norbere gorputzaren onarpen handiagoa ekarriko du.

6. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Elikadura emozionalak gizakion bizitzan zehar duen eragina ikusita, ikuspegi osasuntsu batetik etorkizunean elikagaien eta emozioen arteko harreman desegokiak garatzea ekiditeko egokiena prebentzioa izango litzatekeela uste da. Elikadurarekin lotutako arazoak ezarri aurretik, hau da, haurtzaro goiztiarretik, gurasoen eta haurren jatorduetako elkarrekintzak aztertuz. Honek haurraren eta gurasoen elikadura elkarrekintza hauetan desegokiak diren pautak identifikatu eta gurasoei etorkizuneko elikatze jokaeretan arazoak garatzeko arriskua prebenitzeko aholkuak ematea ahalbideratuko baitu (Powell et al., 2011).

Jada elikadurarekin lotutako arazoak ematen diren kasuetan, esku-hartzearen helburua gurasoen elikatze instrumental/emozionala murriztea izango litzateke. Honetarako, beharrezkoa izango litzateke gurasoen elikatze instrumental/emozionalaren eta haurraren elikagaiekiko harreman desegokiaren arteko bi noranzkoko harremana apurtzea (Berge et al., 2020). Ondoren, elikatze jokaera osasuntsuak ezarriko lirateke, besteak beste, mugak, errutinak edo arauak ezarriz, haurrak elikagaien aurrean duen jarrerekiko sentikortasuna garatuz (arreta handiko guraso estiloa) edo ikaskuntza sozialaz baliatuz haurrei auto-erregulaziorako estrategiak garatzen eta beren barne sentsazioez jabetzen erakusteko (Balantekin et al., 2020; DiSantis et al., 2011; Frankel et al., 2012).

Azkenik, nerabezaroan, esku-hartzea arreta handiko guraso-estiloa bultzatzera eta nerabeen aurre egite estrategia egokitzaileak ezartzera bideratu beharko litzateke (Gouveia et al., 2018; Vandewalle et al., 2014; Zhu et al., 2014), nerabe neska edo mutilen auto-onarpenerako gaitasuna garatzea ahalbideratu dezakeelako, eta honek era berean elikadura emozionala gutxitu eta beren gorputzaren irudiarekiko tolerantzia handitzea ekarri dezakeelako (Gouveia et al., 2018).

7. Erreferentziak

Balantekin, K. N., Anzman-Frasca, S., Francis, L. A., Ventura, A. K., Fisher, J. O. eta Johnson, S. L. (2020), Positive parenting approaches and their association with child eating and weight: A narrative review from infancy to adolescence, *Pediatric Obesity*, *15*, e12722. https://doi.org/10.1111/ijpo.12722

Berge, J. M., Miller, J., Veblen-Mortenson, S., Kunin-Batson, A., Sherwood, N. E. eta French, S. A. (2020), A bidirectional analysis of feeding practices and eating behaviors in parent/child dyads from low-income and minority households, *The Journal of Pediatrics*, *221*, 93-98.e20. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2020.02.001

Birch, L. L. eta Doub, A. E. (2014), Learning to eat: Birth to age 2 y, *American Journal of Clinical Nutrition*, *99*(3), 723–728. https://doi.org/10.3945/ajcn.113.069047

Braden, A., Rhee, K., Peterson, C. B., Rydell, S. A., Zucker, N. eta Boutelle, K. (2014), Associations between child emotional eating and general parenting style, feeding practices, and parent psychopathology, *Appetite*, *80*, 35–40. https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.04.017

Carnell, S., Benson, L., Driggin, E. eta Kolbe, L. (2014), Parent feeding behavior and child appetite: Associations depend on feeding style, *International Journal of Eating Disorders*, *47*(7), 705–709. https://doi.org/10.1002/eat.22324

Chen, Y., Haines, J., Charlton, B. M. eta VanderWeele, T. J. (2019), Positive parenting improves multiple aspects of health and well-being in young adulthood, *Nature Human Behaviour*, *3*(7), 684–691. https://doi.org/10.1038/s41562-019-0602-x

Comeche, M. I. eta Vallejo, M. A. (2012): *Manual de terapia de conducta en la infancia,* Dykinson, Madrid.

Cross, M. B., Hallett, A. M., Ledoux, T. A., O'Connor, D. P. eta Hughes, S. O. (2014), Effects of children's self-regulation of eating on parental feeding practices and child weight, *Appetite*, *81*, 76–83. https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.06.014

DiSantis, K. I., Hodges, E. A., Johnson, S. L. eta Fisher, J. O. (2011), The role of responsive feeding in overweight during infancy and toddlerhood: a systematic review, *International Journal of Obesity*, *35*(4), 480–492. https://doi.org/10.1117/12.2549369.Hyperspectral

Farrow, C. V. (2012), Do parental feeding practices moderate the relationships between impulsivity and eating in children? *Eating Behaviors*, *13*(2), 150–153. https://doi.org/10.1016/j.eatbeh.2011.11.015

Farrow, C. V., Haycraft, E. eta Blissett, J. M. (2015), Teaching our children when to eat: how parental feeding practices inform the development of emotional eating—a longitudinal experimental design, *The American Journal of Clinical Nutrition*, *101*(5), 908–913. https://doi.org/10.3945/ajcn.114.103713

Ferrer, R. A., Green, P. A., Oh, A. Y., Hennessy, E. eta Dwyer, L. A. (2017), Emotion suppression, emotional eating, and eating behavior among parent–adolescent dyads, *Emotion*, *17*(7), 1052–1065. https://doi.org/10.1037/emo0000295

Frankel, L. A., Hughes, S. O., O'Connor, T. M., Power, T. G., Fisher, J. O. eta Hazen, N. L. (2012), Parental influences on children's self-regulation of energy intake: Insights from developmental literature on emotion regulation, *Journal of Obesity*, 327259. https://doi.org/10.1155/2012/327259

Frankel, L. A., O'Connor, T. M., Chen, T. A., Nicklas, T., Power, T. G. eta Hughes, S. O. (2014), Parents' perceptions of preschool children's ability to regulate eating. Feeding style differences, *Appetite*, *76*, 166–174. https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.01.077

Frankel, L. A., Powell, E. eta Jansen, E. (2018), The relationship between structure-related food parenting practices and children's heightened levels of self-regulation in eating, *Childhood Obesity*, *14*(2), 81–88. https://doi.org/10.1089/chi.2017.0164

Goldstein, M., Tan, C. C. eta Chow, C. M. (2017), Maternal emotional feeding practices and adolescent daughters' emotional eating: Mediating roles of avoidant and preoccupied coping, *Appetite*, *116*, 339–344. https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.05.021

Gouveia, M. J., Canavarro, M. C. eta Moreira, H. (2018), Is mindful parenting associated with adolescents' emotional eating? The mediating role of adolescents' self-compassion and body shame, *Frontiers in Psychology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.02004

Hankey, M., Williams, N. A. eta Dev, D. (2016), Uninvolved maternal feeding style moderates the association of emotional overeating to preschoolers' Body Mass Index z-scores, *Journal of Nutrition Education and Behavior*, *48*(8), 530–537. https://doi.org/10.1016/j.jneb.2016.06.006

Herrero, G. eta Andrades, C. (2019), *Psiconutrición. Aprende a tener una relación saludable con la comida* (3. ed.), Arcopress, S.L., Kordoba

Hughes, S. O., Power, T. G., Papaioannou, M. A., Cross, M. B., Nicklas, T. A., Hall, S. K. eta Shewchuk, R. M. (2011), Emotional climate, feeding practices, and feeding styles: An observational analysis of the dinner meal in Head Start families, *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, *8*, 1–11. https://doi.org/10.1186/1479-5868-8-60

Hughes, S. O. eta Shewchuk, R. M. (2012), Child temperament, parent emotions, and perceptions of the child's feeding experience, *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, *9*(1), 64. https://doi.org/10.1186/1479-5868-9-64

Jansen, P. W., Derks, I. P. M., Batenburg, A. eta Jaddoe, W. V. (2019), Using food to soothe in infancy is prospectively associated with childhood BMI in a population-based cohort, *The Journal of Nutrition*, *149*(5), 788–794.

Kidwell, K. M., Kozikowski, C., Roth, T., Lundahl, A. eta Nelson, T. D. (2018), Concurrent and longitudinal associations among temperament, parental feeding styles, and selective eating in a preschool sample, *Journal of Pediatric Psychology*, *43*(5), 572–583. https://doi.org/10.1093/jpepsy/jsx148

Mennella, J. A., Reiter, A. R. eta Daniels, L. M. (2016), Vegetable and fruit acceptance during infancy: Impact of ontogeny, genetics, and early experiences, *Advances in Nutrition*, *7*(1), 211S-219S. https://doi.org/10.3945/an.115.008649

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J. eta Altman, D. G. (2009), Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement, *Annals of Internal Medicine*, *151*(4), 264–269. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097

Pérez-Escamilla, R., Segura-Pérez, S. eta Lott, M. (2017), *Feeding guidelines for infants and young toddlers: A responsive parenting approach*, Robert Wood Johnson Foundation, Minneapolis. [https://healthyeatingresearch.org/wp-content/uploads/2017/02/her_feeding_guidelines_report_021416-1.pdf]

Powell, E. M., Frankel, L. A. eta Hernandez, D. C. (2017), The mediating role of child self-regulation of eating in the relationship between parental use of food as a reward and child emotional overeating, *Appetite*, *113*, 78–83. https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.02.017

Powell, F. C., Farrow, C. V. eta Meyer, C. (2011), Food avoidance in children. The influence of maternal feeding practices and behaviours, *Appetite*, *57*(3), 683–692. https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.08.011

Rhee, K. E., Boutelle, K. N., Jelalian, E., Barnes, R., Dickstein, S. eta Wing, R. R. (2015), Firm maternal parenting

associated with decreased risk of excessive snacking in overweight children, *Eating and Weight Disorders*, *20*(2), 195–203. https://doi.org/10.1007/s40519-014-0164-x

Rodenburg, G., Kremers, S. P. J., Oenema, A. eta Van De Mheen, D. (2013), Associations of parental feeding styles with child snacking behaviour and weight in the context of general parenting, *Public Health Nutrition*, *17*(5), 960–969. https://doi.org/10.1017/S1368980013000712

Rodgers, R. F., Paxton, S. J., Massey, R., Campbell, K. J., Wertheim, E. H., Skouteris, H. eta Gibbons, K. (2013), Maternal feeding practices predict weight gain and obesogenic eating behaviors in young children: A prospective study, *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, *10*(24), 1–10. https://doi.org/10.1186/1479-5868-10-24

Shloim, N., Edelson, L. R., Martin, N. eta Hetherington, M. M. (2015), Parenting styles, feeding styles, feeding practices, and weight status in 4-12 year-old children: A systematic review of the literature, *Frontiers in Psychology*, *6*, 1849. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01849

Steinsbekk, S., Belsky, J. eta Wichstrøm, L. (2016), Parental feeding and child eating: An investigation of reciprocal effects, *Child Development*, *87*(5), 1538–1549. https://doi.org/10.1111/cdev.12546

Tan, C. C. eta Holub, S. C. (2015), Emotion regulation feeding practices link parents' emotional eating to children's emotional eating: A moderated mediation study, *Journal of Pediatric Psychology*, *40*(7), 657–663. https://doi.org/10.1093/jpepsy/jsv015

Tate, A. D., Trofholz, A., Rudasill, K. M., Neumark-Sztainer, D. eta Berge, J. M. (2016), Does child temperament modify the overweight risk associated with parent feeding behaviors and child eating behaviors?: An exploratory study, *Appetite*, *101*, 178–183. https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.02.026

Topham, G. L., Hubbs-Tait, L., Rutledge, J. M., Page, M. C., Kennedy, T. S., Shriver, L. H. eta Harrist, A. W. (2011), Parenting styles, parental response to child emotion, and family emotional responsiveness are related to child emotional eating, *Appetite*, *56*(2), 261–264. https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.01.007

van Strien, T., Konttinen, H., Homberg, J. R., Engels, R. C. M. E. eta Winkens, L. H. H. (2016), Emotional eating as a mediator between depression and weight gain, *Appetite*, *100*, 216–224. https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.02.034

Vandewalle, J., Moens, E. eta Braet, C. (2014), Comprehending emotional eating in obese youngsters: The role of parental rejection and emotion regulation, *International Journal of Obesity*, *38*(4), 525–530. https://doi.org/10.1038/ijo.2013.233

Zarychta, K., Kulis, E., Gan, Y., Chan, C. K. Y., Horodyska, K. eta Luszczynska, A. (2019), Why are you eating, mom? Maternal emotional, restrained, and external eating explaining children's eating styles, *Appetite*, *141*, 104335. https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.104335

Zhou, Z., Liew, J., Yeh, Y. C. eta Perez, M. (2020), Appetitive traits and weight in children: Evidence for parents' controlling feeding practices as mediating mechanisms, *The Journal of Genetic Psychology*, *181*(1), 1–13. https://doi.org/10.1080/00221325.2019.1682506

Zhu, H., Luo, X., Cai, T., Li, Z. eta Liu, W. (2014), Self-control and parental control mediate the relationship between negative emotions and emotional eating among adolescents, *Appetite*, *82*, 202–207. https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.06.106

8. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Psikologia Graduaren amaierako lanetik eratorria da.

SLUG genearen erregulazioa eta epitelio-mesenkima trantsizioa E2F faktoreen eraginpean daude minbiziaren testuinguruan

Eriz, Ainhoa[1], Mentxaka, Gartze[1], Iglesias-Ara, Ainhoa[1], Mitxelena, Jone[1,2], Zubiaga, Ana M[a1]

[1]Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU; [2]IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao

ainhoaerizm@gmail.com

Laburpena

Minbizia pairatzen duten gaixoen artean, heriotzaren arrazoi nagusia metastasia da. Metastasiaren prozesuan, epitelio-mesenkima trantsizioak (EMT) ahalbidetzen du minbizi-zelulak jatorrizko ehunetik askatzea eta, ehun sekundarioetara migratuz, tumore berriak bertan sortzea. Lan honetan, ondesteko minbizian gertatzen den EMTan sakondu dugu. E2F1 eta E2F2 transkribapen faktoreek ondesteko minbiziko zeluletan EMTaren inhibizioa eta *SLUG* genearen errepresioa bultzatzen dutela aurkitu dugu. Errepresio hori, neurri batean, *SLUG*en promotorearen aktibitateari eraginez gauzatzen dela frogatu dugu. Badirudi SLUGen erregulazioa SMAD6ren bitartez gertatzen dela, izan ere, SMAD6ren galerak, E2F1/2ren ausentzian, *SLUG*en adierazpena eta bere promotorearen aktibitatea emendatzen ditu.

Hitz gakoak: SLUG, E2F1, E2F2, metastasia, epitelio-mesenkima trantsizioa (EMT), gene adierazpenaren erregulazioa

Abstract

Metastasis is the main cause of death in cancer patients and during its development epithelial-mesenchymal transition (EMT) enables cells to migrate into secondary tissues and create new tumors there. In this work, we describe E2F1 and E2F2 transcription factors as EMT inhibitors in colorectal cancer cells. We present SLUG as a key regulator of this transition, which appears overexpressed upon E2F1/2 loss. E2F1/2 mediated SLUG gene expression regulation involves SLUG promoter activity modulation. Moreover, our results reveal that SMAD6 could play an essential role in SLUG regulation, whose expression is activated in the absence of SMAD6. In fact, downregulation of SMAD6, induced by E2F1/2 silencing, activates SLUG promoter and its expression.

Keywords: SLUG, E2F1, E2F2, metastasis, epithelial-mesenchymal transition (EMT), gene expression regulation

1.Sarrera/Uneko egoera

Tumore primarioaren hedapena gorputzeko leku distaletara, hots, metastasia, minbizia pairatzen duten gaixoen arteko heriotzen arrazoi nagusia da. Hortaz, metastasiaren prebentzioa oinarrizkoa da minbiziari aurre egiteko (Tharp, D. eta Nandana, S., 2019). Osotasun epitelialaren alterazioa ezinbesteko pausoa da kartzinoma primariotik metastasiranzko bidean. Eraldaketa honetan, Epitelio-Mesenkima Trantsizioa (EMT) deritzon transformazio zelularra gertatzen dela proposatu izan da, non zelulak epitelial izatetik mesenkimal izatera pasatzen diren. Zelula epitelialek bereizgarri anitz adierazten dituzte, hauen artean garrantzitsuenak zelula-zelula loturak, zelula-matrize extrazelular loturak eta polaritatea direlarik (Kalluri, R., eta Neilson, E. G., 2003). Prozesu honetan zehar, zelula epitelialek haien polaritatea eta atxikitzeko gaitasuna galdu eta migrazio eta inbasio gaitasuna eskuratzen dute, mesenkimal bihurtuz (Nieto, M. A. *et. al.,* 2016). Epitelio-mesenkima trantsizioa ez da soilik minbizien gaiztotze prozesuarekin erlazionatzen. Izan ere, ebolutiboki kontserbatutako prozesu biologiko hau ezinbestekoa da garapen enbrionariorako eta ehunen homeostasiaren mantenurako, gastrulazioa, gandor neuralaren migrazioa eta zaurien sendaketa bultzatuz (Chen, T. et. *al*., 2017). EMT patologikoan eta EMT fisiologikoan antzeko programa molekularrak aktibatzen dira, baina lehenengo kasuan modu desarautuan. Ondorioz, jatorri epiteliala duten minbizi-zelulek migratzeko ahalmena agertzen dute, zelula amen antzeko ezaugarriak eskuratzen dituzte eta tumoreen aurkako terapiekiko erresistentzia garatzen dute (Guan, X., 2015). EMTak minbizian, eta bereziki metastasian, duen garrantzia kontuan edukita, asko dira prozesu honen erregulazioaren azterketan zentratzen diren ikerkuntza taldeak.

EMT prozesua hainbat mailatan erregulatu daiteke eta bereziki ikertuak izan dira eraldaketa zelular hori transkribapen mailan erregulatzen dituzten faktoreak (Dongre, A. eta Weinberg, R. A., 2018). Faktore hauen artean, ikertuenetako bat SLUG izan da, zeina biomarkatzaile mesenkimal gisa ezagutzen den.

Izan ere, SLUGen adierazpena emendatu egiten da EMT prozesua gertatzen den heinean. SLUGen adierazpenaren eraginez, zelulak alboko zeluletatik askatzen dira eta migratzeko eta inbaditzeko gaitasuna eskuratzen dute (Lund, K. *et. al.,* 2015; Ganesh, K. *et. al.* 2020). Gainera, SLUGen adierazpena hainbat minbiziren pronostiko txarrarekin eta metastasiaren garapenarekin erlazionatu izan da, minbizi horien artean dago ondesteko minbizia (Toiyama, Y. *et. al.* 2013). Honek, minbiziaren pronostiko txarrarekin erlazionatutako metastasiaren garapenean SLUGen adierazpenaren erregulazio mekanismoak ulertzearen garrantzia azpimarratzen du.

EMTaren erregulazioan parte hartzen duten transkribapen faktore ezagunez gain, azken urteetan EMTaren erregulatzaile berri gehiago deskribatu dira. Faktore horien artean, E2F familiako kideak aurkitzen dira, ziklo zelularraren erregulazioaz arduratzeagatik ezagutzen direnak, batik bat. Hala ere, ziklo zelularretik haratago beste funtzio zelular batzuetan ere parte hartu dezaketela ikusi da, horien artean EMTan, eta E2Fak derregulatuta agertzen direnean ehunen homeostasiaren galera edota minbizia eragin dezaketela erakutsi dute lan ugarik (Kent, L. N. eta Leone, G., 2019; Jusino, S. eta Saavedra, H. I., 2019). Izan ere, gure ikerketa taldeak deskribatu izan du E2F1 eta E2F2 transkribapen faktoreak beharrezkoak direla saguen areako zeluletako fenotipo epitelialaren mantenurako eta ezaugarri mesenkimalen inhibiziorako, eta faktore hauek epitelio-mesenkima egoeren arteko orekan zeregin garrantzitsua betetzen dutela (Iglesias-Ara, A. *et. al.,* 2004*,* 2015). Hala ere, E2F1/2ren galeraren ondorioz EMT trantsizio honen aktibazioa baimentzen duten mekanismo molekularrak ez dira oraindik ezagunak.

2. Ikerketaren helburuak

Lan honen helburu nagusia metastasiaren garapenerako funtsezkoa den EMT prozesuan sakontzea da, eta bereziki, E2F faktoreek EMTaren erregulaziorako dituzten mekanismo molekularrak aztertzea.

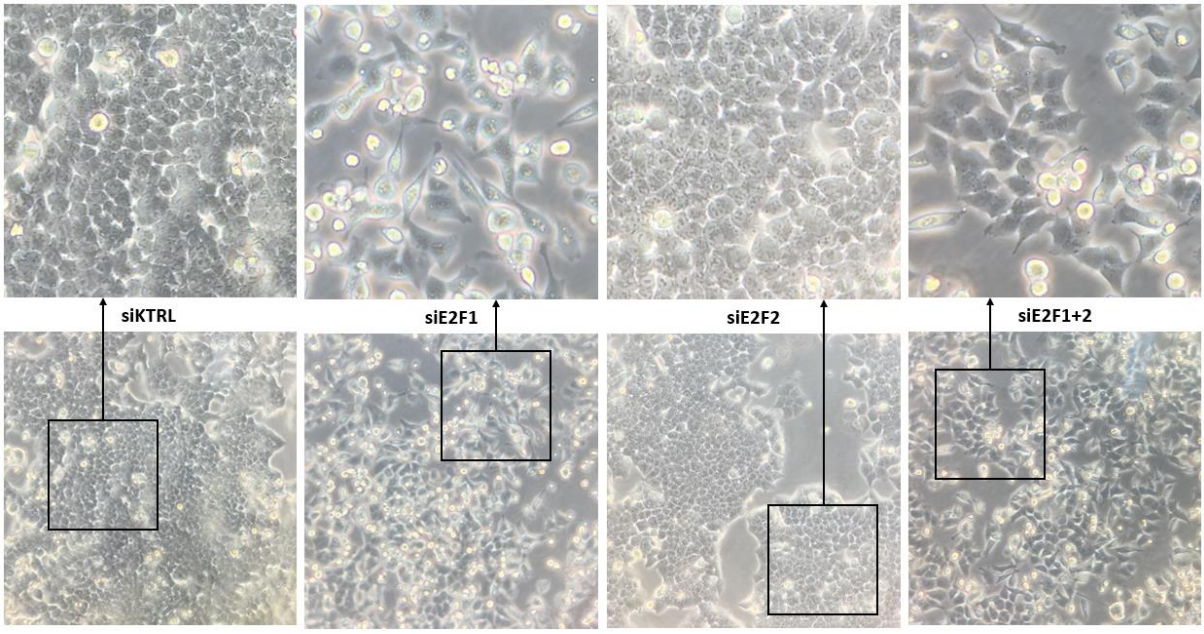
3. Ikerketaren muina

3.1. E2F1 eta E2F2 faktoreen galerak EMTaren fenotipoa eta SLUGen adierazpena induzitzen ditu

E2F1 eta E2F2 faktoreek EMT prozesuan betetzen duten funtzioa definitzeko, ondesteko kartzinoma jatorria duen HCT116 zelula-lerroa erabili zen, zeinak ezaugarri epitelialak dituen eta EMT prozesua aztertzeko oso erabilia izan den (Rajput, A., *et. al.,* 2008). Ondeste-kartzinomako lerro zelular hau erabilita, *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpena burutu zen interferentziazko RNA txikiak erabiliz (siRNA). Saiakerak gene bakoitza modu indibidualean eta bateratuan isilaraziz burutu ziren, bi faktore hauen funtzio amankomunak eta espezifikoak aztertu nahian.

EMT prozesuaren adierazle den ezaugarrietako bat zelula epitelialek duten polaritate apikal-basalaren galera eta zelula mesenkimalek duten forma fusiformearen eskuratzea da. Horrekin batera, zelulek beraien arteko loturak galtzen dituzte, eta sortzen dituzten epitelio geruzak desegiten dira (Kalluri, R., eta Neilson, E. G. 2003). Espero moduan, kontrol negatiboarekin (siKTRL) transfektatutako HCT116 zelulek geruza bat osatzen zutela ikusi zen, eta modu konpaktuan lotuta zeudela behatu zen (1. irudia). *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpen bateratua jasandako zelulek (siE2F1+2) ezaugarri mesenkimalak erakutsi zituzten: zelulak haien artean askeago eta forma fusiformearekin agertu ziren, EMT prozesua jaso dutela iradokiz. Geneen bakarkako isilarazpenari dagokionez, *E2F1* isilarazitako laginetan (siE2F1) zelulek fenotipo mesenkimala erakusten zutela ikusi zen, isilarazpen bikoitzaren antzekoa. *E2F2* isilarazpenaren kasuan (siE2F2), zelulek kontrolarekiko antzekotasuna erakusten zuten (1. irudia).

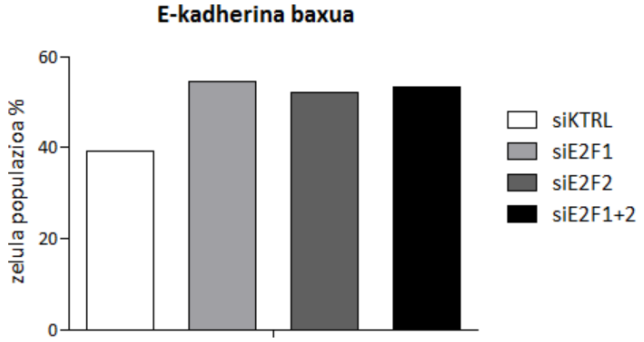
1. irudia. HCT116 ondeste-kartzinoma zelula lerroan *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpenak eragiten du zelulek morfologia mesenkimala eskuratzea. Baldintza bakoitzean HCT116 zelulak siKTRL, siE2F1 edo/eta siE2F2 interferentziazko RNAekin transfektatu ziren 72 orduz eta zelulen irudiak eskuratu ziren mikroskopio optikoa erabiliz.



Zelula epitelialek erakusten duten beste bereizgarrietako bat zelulen arteko loturak dira. Horientzat beharrezkoa den E-kadherinaren adierazpena eta honen mintz plasmatikoko lokalizazioa dira zelula epitelialen markatzailetzat erabili ohi diren ezaugarriak, beste batzuen artean. Hau honela, E2Fen eragina EMT prozesuan aztertzeko, fluxu-zitometria bidez (FACS bidez, ingelesezko *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) zelulen mintz plasmatikoan E-kadherinaren adierazpena aztertu zen *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpen sinplea edo bikoitza burutu ostean (2. irudia). E-kadherinaren maila baxua adierazten duen zelulen populazioan zentratu ginen, zeina EMTa ematekotan emendatu egin beharko litzatekeen, zelulen arteko loturen galeraren adierazle. Isilarazi gabeko laginean (siKTRL) E-kadherinaren maila baxua adierazten zuten zelulen atalasea %39-an ezarri zen, zelula populazioak aurkezten duen E-kadherina tindaketaren erpin maximotik behera ezarriz. *E2F1* isilarazitako laginean (siE2F1), *E2F2* isilarazitakoan (siE2F2) eta bi faktore hauen isilarazpen bikoitzaren kasuan (siE2F1+2) zelula-populazio horren portzentajearen igoera ikusi zen, %54, %52 eta %53-ra, hurrenez hurren. Honek, *E2F1* eta *E2F2* geneen banakako zein isilarazpen bateratuaren ondorioz mintz plasmatikoko E-kadherinaren adierazpena murriztu egiten dela adierazten du (2.irudia).

Emaitza hauen arabera, E2F1 eta E2F2 faktoreen galerak EMTarekin erlazionatutako ezaugarrien eskuratzea eragiten du ondesteko minbiziko zeluletan. Datu hauek aurretik ikerketa taldean eskuratutako emaitzak indartzen dituzte. Izan ere, E2F1/2ren galerak EMTari lotutako migrazio gaitasunaren eskuratzea eragiten duela frogatu da (Mentxaka, G., argitaratu gabeko datuak).

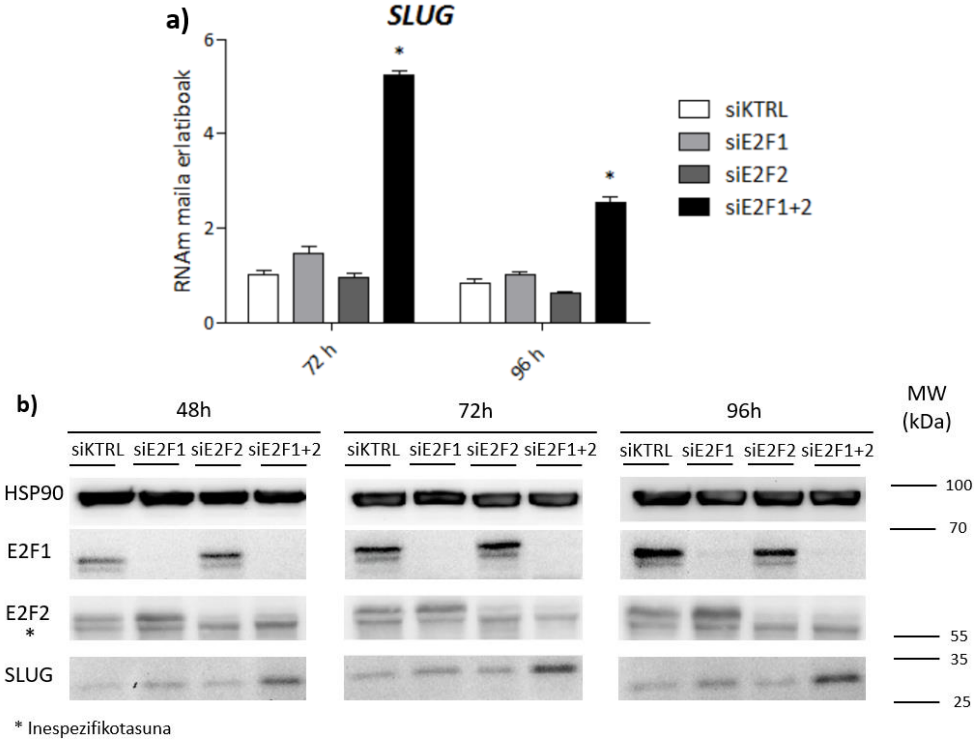
2. irudia. *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpenak E-kadherinaren maila baxua adierazten duten HCT116 zelulen populazioaren emendioa eragiten du. HCT116 zelulak siKTRL, siE2F1 edo/eta siE2F2rekin transfektatu ziren eta mintzeko E-kadherina markatzailearen adierazpena aztertu zen FACS bidez 120 orduren buruan, E-kadherinarekiko espezifikoa den antigorputza erabiliz. Bi errepliken batazbestekoak adierazten dira.



E2f1/E2f2-knockout saguetan egin ditugun analisi transkriptomikoek erakutsi digutenaren arabera, *E2f1/E2f2* geneen gabeziaren ondorioz EMTarekin erlazionatutako hainbat generen adierazpena emendatuta agertzen da, *Slug* genearena barne (Iglesias-Ara, A. *et al*., 2004). Emaitza hau kontutan harturik, lan honetan *SLUG* genearen erregulazioaren ikerketan zentratu gara, E2F1/E2F2 faktoreek minbizi-zeluletako EMTan duten eragina aztertzeko asmoz.

SLUGen erregulazioa aztertzeko ondesteko minbiziko lerro zelularrean, honen adierazpena aztertu genuen RNA mezulari mailan RT-qPCR bidez eta proteina mailan *western* plapaketa bidez, *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpen bakuna eta bikoitza eragindako egoeretan. Saguetan eginiko analisi transkriptomikoan eskuratutako emaitzak baieztatuz, *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpen bikoitza eragiterakoan SLUGen adierazpena emendatuta agertzen zela ikusi genuen RNA mezulari zein proteina mailan. Modu xumeago batean, *E2F1*en isilarazpen bakunak ere SLUGen adierazpenaren igoera eragiten duela ikusi genuen (3.irudia).

3.irudia. HCT116 zeluletan *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpenak SLUGen adierazpenaren emendioa eragiten du. HCT116 zelulak siKTRL, siE2F1, siE2F2 edo bi geneen (siE2F1+2) aurkako siRNAekin transfektatu ziren eta SLUGen adierazpena aztertu zen **a)** RNAm mailan RT-qPCR bidez eta **b)** proteina mailan *western* plapaketa bidez. RNAm mailan *SLUG*en adierazpena *VPS29, OXA1L* eta *EIF2C2* gene endogenoekiko normalizatu zen. Hiru esperimentu independenteren esperimentu adierazgarria aurkezten da, hiru erreplika teknikoren batezbestekoak eta desbideraketa estandarrak adieraziz. Esangarritasuna siKTRL-rekiko (*) *p balioa* ≤ 0,05 bezala ezarri zen. Proteina mailan, isilarazpena modu egokian eman zen aztertzeko E2F1 eta E2F2 proteinen adierazpena ere aztertu zen eta karga kontrol moduan HSP90 proteina erabili zen.



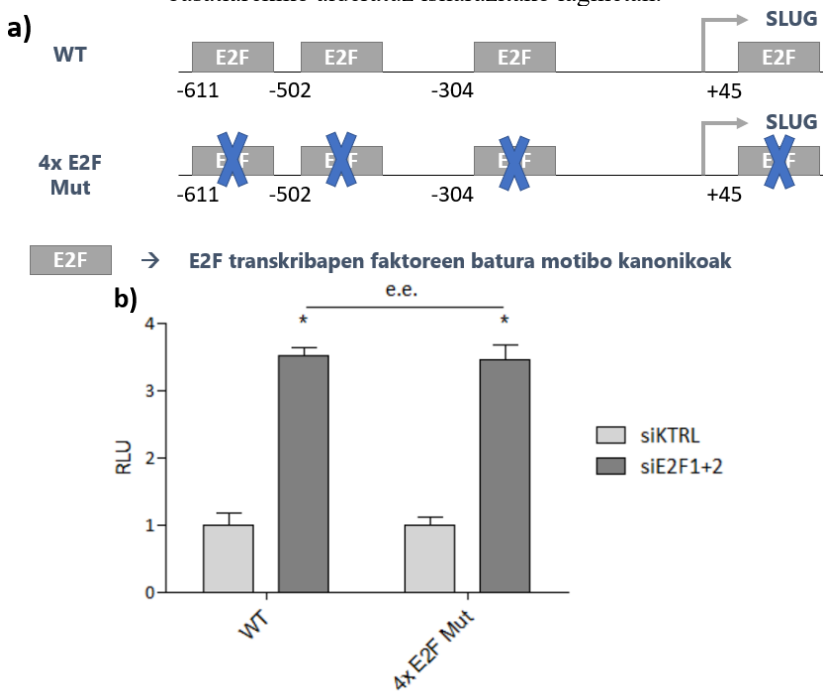
Beraz, gure datuek E2F1 eta E2F2ren ausentzian SLUG markatzaile mesenkimalaren adierazpena emendatu egiten dela erakusten dute, eta iradokitzen dute SLUG izan daitekeela E2F faktoreen gabezian gertatzen den EMTa bultzatu dezakeen aktibatzaile molekularretako bat.

3.2. E2F1 eta E2F2 faktoreen galerak *SLUG*en promotorearen aktibitatea emendatzen du, E2F leku kanonikoekiko modu independentean

E2F1 eta E2F2ren galerak dakarren SLUGen adierazpenaren emendapenak, E2F faktore hauek SLUGen adierazpenaren errepresore gisa dihardutela iradokitzera eraman gintuen. E2F1 eta E2F2k *SLUG*en adierazpenaren inhibizioa bere promotoreari eraginez bideratzen duten aztertu nahian, luziferasa entseguak burutu ziren *SLUG*en promotorea daraman luziferasa bektore erreportari bat erabilita. Erreportari horrek daraman promotorean 4 E2F motibo kanoniko agertzen dira (4a. irudia). Zelulak *SLUG*en bektore erreportariarekin transfektatu ziren, *E2F1* eta *E2F2* isilarazita edo ez. *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpenak (siE2F1+2) *SLUG*en promotorearen aktibitatearen emendioa eragin zuen kontrolarekin alderatuta (siKTRL).

Behatutako transkribapen mailako errepresioa *SLUG*en promotorean dauden lau E2F motibo kanonikoen bitartez (4a. irudia) ematen den aztertzeko, motibo horiek mutatuak dituen bektore erreportari bat erabili zen (4x E2F Mut). Promotore basatiaren antzera, mutatuaren kasuan (4x E2F Mut) ere, *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpenak *SLUG*en promotorearen aktibitatearen igoera eragin zuen, eta mutatuak ez zuen promotore basatiarekiko aldaketa esangarririk aurkeztu (4b.irudia). Datu hauek, E2F1 eta E2F2 faktoreek *SLUG* genearen adierazpenaren inhibitzaile moduan jokatzen dutela erakusten dute, eta neurri batean behintzat, erregulazio hau transkribapen mailan gertatzen dela ondorioztatu daiteke, *SLUG*en promotorearengan eraginez. Hala ere, badirudi E2F1 eta E2F2k bideratutako *SLUG* promotorearen errepresioa ez dagoela aztertutako E2F motibo kanonikoen bidez bideratuta. Baliteke, beraz, SLUGen adierazpenaren erregulazioa beste motibo batzuen bitartez ematea edo E2F1 eta E2F2k beste transkribapen faktore batzuen elkarlana behar izatea erregulazio hori bideratzeko.

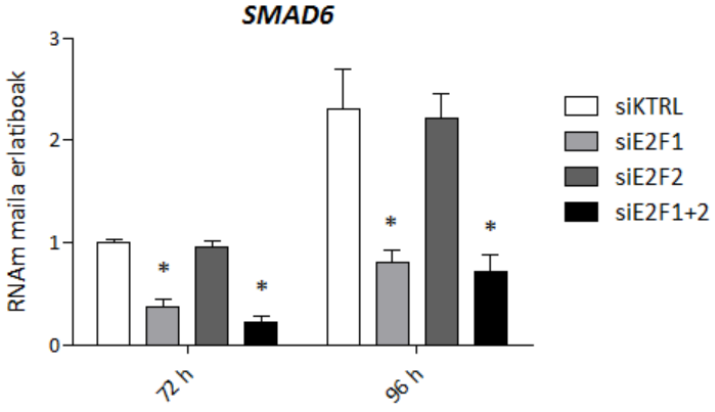
4. irudia. *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpenak HCT116 zeluletan *SLUG*en promotorearen aktibitatearen emendioa eragiten du. a) *SLUG* genearen promotoreak 4 E2F batura gune kanoniko aurkezten ditu, *ConSite eta MoLoTool* erreminta bioinformatikoen bidez identifikatutakoak. Promotore basatiak (WT) motibo kanoniko hauek mantentzen ditu eta 4x E2F Mut promotore mutanteak lau motiboetan mutazioak ditu. **b)** HCT116 zelulak kontrolerako siRNA (siKTRL) edo *E2F1* eta *E2F2* geneen isilarazpena eragiteko siRNAekin (siE2F1+2) transfektatu ziren 24 orduz. Baldintza bakoitzean, zelulak *SLUG*en promotore basatiarekin (WT) edo 4 E2F leku kanonikoak mutatuak dituen promotorearekin (4x E2F Mut) transfektatu ziren. Datuen normalizaziorako lagin guztiak *Renilla* luziferasa adierazten duen plasmidoarekin transfektatu ziren. Lagin bakoitzetik eskuratutako ipurtargi luziferasa balioak *Renilla* balioekiko normalizatu ziren, emaitzak RLU (ingelesezko *Relative Luciferase Units*) bezala adierazi dira. Hiru esperimentu independenteren esperimentu adierazgarria aurkezten da, hiru erreplika teknikoren batezbestekoak eta desbideraketa estandarrak adieraziz. Esangarritasuna siKTRL-rekiko (*) *p balioa* ≤ 0,05 bezala ezarri zen. Aldaketa ez-esangarriak (e.e.) adierazten dira promotore mutatuak basatiarekiko alderatuz isilarazitako laginetan.



3.3. SMAD6k *SLUG*en promotorearen aktibitatea eta bere adierazpena inhibitzen ditu

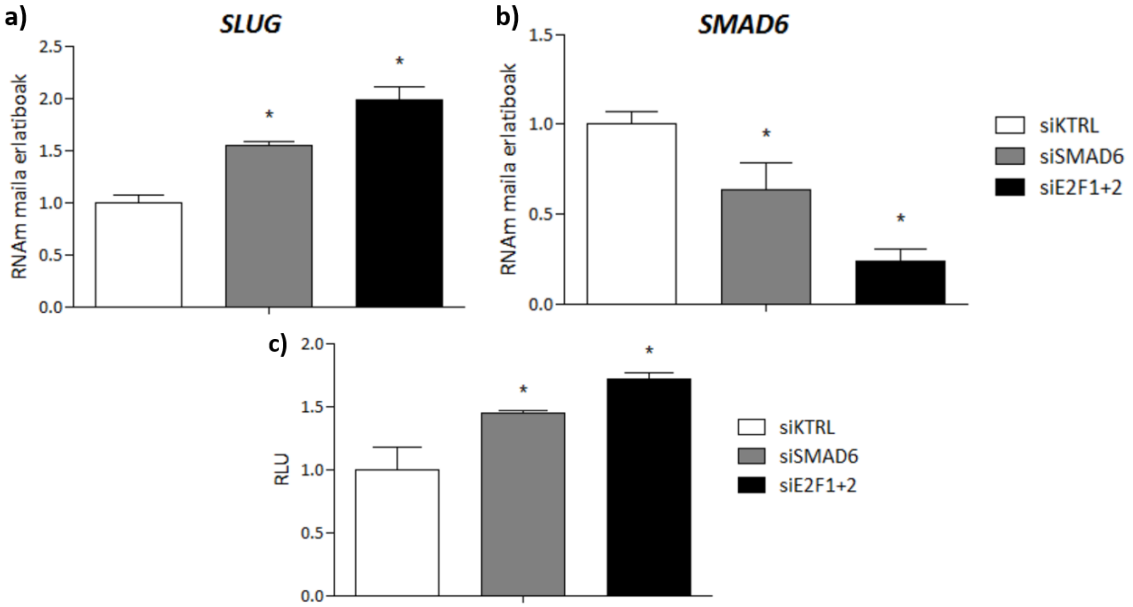
Baliteke E2F1/2k beste transkribapen faktore batzuen kooperazio funtzionala behar izatea SLUGen adierazpena erregulatzeko. Izan ere, E2F familiako kideak sarritan beste transkribapen faktore batzuekin elkar lanean aritzen dira gene ituen adierazpena erregulatzeko, esaterako, SMAD faktoreekin. Hain zuzen ere, SMAD faktoreek EMT prozesuaren erregulazioan parte hartzen dutela deskribatu izan da (Dongre, A., eta Weinberg, R. A. 2018), eta horien artean SMAD6 aurkitu da (Desgrosellier, J. S. *et. al.,* 2005; Wang, H., eta Ji, X., 2020). Aurrekari hauek kontutan harturik, lehendabizi aztertu zen *E2F1* edo/eta *E2F2*ren isilarazpenaren eragina *SMAD6* genearen adierazpenean (5 irudia). HCT116 zeluletan *E2F1*en isilarazpen bakunak (siE2F1), zein faktore honen eta *E2F2*ren isilarazpen bateratuak (siE2F1+2), *SMAD6* genearen adierazpenaren murrizpena eragiten duela ikusi zen.

5. irudia. *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpenak *SMAD6*ren adierazpena murrizten du RNAm mailan. HCT116 zelulak kontrol siRNArekin, *E2F1* edo/eta *E2F2* geneen aurkako siRNAekin transfektatu ziren eta hauen eragina aztertu zen *SMAD6* genearen adierazpenean RT-qPCR bidez. Hiru erreplika teknikoren batezbestekoak eta desbideraketa estandarrak adieraziz, (*) *p balioa* ≤ 0,05 bezala ezarri zen.



Ondoren, SMAD6k SLUG markatzaile mesenkimalaren adierazpenaren erregulazioan parte hartu dezakeen aztertu zen. Horretarako, HCT116 zeluletan *SMAD6* genea isilarazi zen siRNA bidez, eta honen eragina aztertu zen *SLUG*en adierazpenean RNAm mailan (6a. irudia). Modu berean *E2F1* eta *E2F2* faktoreen isilarazpen bateratua erabili zen, kontrol positibo moduan. *SMAD6* genearen RNAm maila erlatiboak ere aztertu ziren isilarazpenaren eraginkortasuna aztertzeko (6b. irudia). *SMAD6* genearen isilarazpenak (siSMAD6) *SLUG*en adierazpenaren emendapena eragin zuela ikusi zen, siE2F1+2 egoeran bezala, nahiz eta SMAD6rekin alderatuz E2F1/2ren efektua handiagoa izan (6a.irudia). 3.irudian erakutsitako efektuarekin alderatuz, kasu honetan *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpenaren eragina xumeago da *SLUG*en adierazpenarengan. Baliteke hau siRNAren esperimentu arteko eraginkortasun aldaketagatik izatea. Jarraian, SMAD6ren efektua *SLUG*en promotorearengan aztertzeko luziferasa entseguak burutu ziren *SLUG*en promotorearen aktibitatea SMAD6ren presentzian zein ausentzian neurtuz (6c.irudia). Nabarmenki, *SMAD6* genearen isilarazpenak *SLUG*en promotorearen aktibitatearen emendioa eragiten zuela ikusi genuen (6c.irudia). Datu hauek iradokitzen dute *E2F1* eta *E2F2*ren isilarazpeneko testuinguruan gertatzen den SLUGen mailaren emendioa neurri batean SMAD6ren bitartekoa izan daitekela. Izan ere, *E2F1* eta *E2F2* geneen deplezioak, *SMAD6*ren adierazpenaren murrizpena eragiten du, *SLUG*en adierazpena emendatzen den bitartean.

6. irudia. *SMAD6* faktorearen isilarazpenak *SLUG*en adierazpenaren eta honen promotorearen aktibitatearen emendioa eragiten du. HCT116 zelulak kontrol negatiborako (siKTRL), *SMAD6* genearen isilarazpenerako (siSMAD6) eta *E2F1* eta *E2F2* faktoreen isilarazpenerako (siE2F1+2) siRNAekin transfektatu ziren 72 orduz. RT-qPCR bidez **a)** *SLUG* eta **b)** *SMAD6* geneen RNAm maila erlatiboak aztertu ziren. **c)** Luziferasa entsegu bidez *SLUG*en promotorearen aktibitatea neurtu zen aipatutako isilarazpen baldintzetan. Grafikoan hiru erreplika teknikoren batezbestekoak eta desbideraketa estandarrak aurkezten dira. (*) *p balioa* ≤ 0,05 bezala ezarri zen.



4. Ondorioak

Lan honetan bildutako emaitzetan oinarrituta, E2F1 eta E2F2 beharrezkoak lirateke egoera epitelialaren mantenurako eta ezaugarri mesenkimalen inhibiziorako ondesteko minbiziko zeluletan. Hori, neurri batean, *SLUG* markatzailearen adierazpena inhibituz burutzen dutela dirudi, zehazki bere promotorearen aktibitatea inhibituz. Erregulazio hori E2F leku kanonikoekiko modu independentean gertatzen da. Are gehiago, E2F1/E2F2ren bitartez induzitzen den SMAD6 faktoreak *SLUG*en adierazpena inhibitzen du bere promotorearen aktibitatearengan eraginez. Horrek iradokitzen du SMAD6-SLUGen arteko elkarlana E2F1 eta E2F2 faktoreen galera testuinguruan EMT eraldaketa bultzatzeko gako garrantzitsua dela.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honek erakusten du E2F1ek eta E2F2k SLUGen adierazpenean ezinbesteko eginkizuna jokatzen dutela. Hau ikusita, eta kontutan hartuta SLUGek minbiziaren gaiztotze prozesuan eta metastasiaren garapenean duen garrantzia, etorkizunean ikertzeko zenbait erronka aurkezten ditu.

Alde batetik, E2F1 eta E2F2k bideratutako SLUGen adierazpenaren erregulazioan sakontzeko, garrantzitsua litzateke aztertzea zeintzuk diren erregulazio hau gertatzeko beharrezkoak diren *SLUG*en promotorearen eskualdeak eta E2F1/2 faktoreek sekuentzia erregulatzaile ez-kanoniko hauei zuzenean lotzen diren ebaztea.

Bestetik, gure datuen arabera E2F1/2ren ausentzian ikusitako SLUGen emendapena neurri batean SMAD6k erregulatu dezakeela ikusita, interesgarria litzateke SMAD6k EMTaren modulazioan daukan zereginean sakontzea, bereziki SLUG markatzaile mesenkimalaren adierazpenaren erregulazioan.

Honela, SLUGen erregulazioari buruz dagoen ezagutzan sakontzea espero da, etorkizunean mekanismo hauek minbiziaren prebentzio edo tratamendurako erabiltzeko ikuspegiarekin.

6. Erreferentziak

Chen, T., You, Y., Jiang, H., & Wang, Z. Z. (2017). Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*, 232(12), 3261–3272.

Desgrosellier, J. S., Mundell, N. A., McDonnell, M. A., Moses, H. L., & Barnett, J. V. (2005). Activin receptor-like kinase 2 and Smad6 regulate epithelial–mesenchymal transformation during cardiac valve formation. *Developmental Biology,* 280(1), 201–210.

Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2018). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 20(2):69-84.

Ganesh, K., Basnet, H., Kaygusuz, Y., Laughney, A. M., He, L., Sharma, R., … Massagué, J. (2020). L1CAM defines the regenerative origin of metastasis-initiating cells in colorectal cancer. *Nature Cancer*, 1(1), 28–45.

Guan X. (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta pharmaceutica Sinica*. B,5(5),402–418.

Iglesias, A., Murga, M., Laresgoiti, U., Skoudy, A., Bernales, I., Fullaondo, A., Moreno, B., Lloreta, J., Field, S. J., Real, F. X., & Zubiaga, A. M. (2004). Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 double-mutant mice. *The Journal of clinical investigation*, 113(10), 1398–1407.

Iglesias-Ara, A., Zenarruzabeitia, O., Buelta, L., Merino, J., & Zubiaga, A. M. (2015). E2F1 and E2F2 prevent replicative stress and subsequent p53-dependent organ involution. *Cell death and differentiation*, 22(10), 1577–1589.

Jusino, S., & Saavedra, H. I. (2019). Role of E2Fs and mitotic regulators controlled by E2Fs in the epithelial to mesenchymal transition. *Experimental Biology and Medicine*, 153537021988136.

Kalluri, R., & Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1776–1784.

Kent, L. N., & Leone, G. (2019). The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 19(6):326-338.

Lund, K., Dembinski, J. L., Solberg, N., Urbanucci, A., Mills, I. G., & Krauss, S. (2015). Slug-dependent upregulation of L1CAM is responsible for the increased invasion potential of pancreatic cancer cells following long-term 5-FU treatment. *PloS one*, 10(4), e0123684.

Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45.

Rajput, A., Dominguez San Martin, I., Rose, R., Beko, A., LeVea, C., Sharratt, E., … Wang, J. (2008). Characterization of HCT116 Human Colon Cancer Cells in an Orthotopic Model. *Journal of Surgical Research*, 147(2), 276–281.

Tharp, D., & Nandana, S. (2019). How Prostate Cancer Cells Use Strategy Instead of Brute Force to Achieve Metastasis. *Cancers*, 11(12), 1928.

Toiyama, Y., Yasuda, H., Saigusa, S., Tanaka, K., Inoue, Y., Goel, A., & Kusunoki, M. (2013). Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 34(11), 2548–2557.

Wang, H., & Ji, X. (2020). SMAD6, positively regulated by the DNM3OS-miR-134-5p axis, confers promoting effects to cell proliferation, migration and EMT process in retinoblastoma. *Cancer cell international*, *20*, 23.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa honen emaitzak Ainhoa Eriz Micieces-en Master Amaierako Lanaren eta Gartze Mentxakaren doktoretza tesiaren ondorio dira. Gartze Mentxakak Hezkuntza, Kultura eta Kirol Ministerioaren doktoretza aurreko laguntza jaso du (FPU13/04388). Ana Maria Zubiagak Espainiako Jaurlaritzako (Ministerio de Ciencia e Innovación RTI2018-097497-B-I00), Eusko Jaurlaritzako (Hezkuntza Saila. Erref.:IT1257-19) eta UPV/EHU-ko (UFI11/20) diru laguntzak jaso ditu.

Ingurumen zaratak eraginik al du 11 urteko umeen loaren kalitatean?

Arregi Otxotorena,A.[1,2], Lertxundi, N.[1,2], García-Baquero, G.[2,3], Vegas, O.[1,2] eta Lertxundi, A.[2,3,4]

[1]Psikologiako Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). Donostia- San Sebastián, Gipuzkoa

[2]Biodonostia, Epidemiología ambiental y neuropsicología infantil taldea. 200014 Donostia-San Sebastián, Gipuzkoa

[3]Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Carlos III Osasun Institutua, Madrid, Espainia.

[4]Prebentzio-medikuntza eta Osasun Publikoko departamentua, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). Bizkaia, Espainia

ane.arregi@ehu.eus

Laburpena

Ingurumen zaratak helduen osasunean, eta batez ere, loaren kalitatean modu kaltegarrian eragin dezake. Hala ere, umeen osasunean duen eragina ez da hain ikertua izan. Umeek, haien garapen fasean zehar jasotzen dute esposizio hau eta garai horretan funtsezko funtzioa betetzen du loak. Hori dela eta, ikerketa honetan, Gipuzkoako INMA kohorteko 11 urteko umeek jasaten duten ingurumen zaratarekiko esposizioa deskribatzea, eta hark loaren kalitatean duen eragina aztertzea izan da helburu nagusia. Ikerketa honetan ikusi da umeek ingurumeneko zaratarekiko esposizio altua jasaten badute ere, ez duela eraginik aktigrafo bidez zein galdetegien bitartez neurturiko loaren kalitatean.

Hitz gakoak: Ingurumen zarata, loaren kalitatea, aktigrafoa, umea, osasuna.

Abstract

Environmental noise exposition is known to negatively affect health and sleep quality in adults. However, the effect of this exposition in children has not been studied so far. Children are exposed to this noise during their growth and development phase, which makes them a vulnerable group. In this study, we aim to measure and describe environmental noise exposure on 11 year old children belonging to the Gipzukoa cohort in INMA project. We observed that even if environmental noise exposure levels are close to the threshold at which negative effects on human health can be observed, it seems no to affect sleep quality measured by actigraph and questionaries filled by parents.

Keywords: Environmental noise, sleep quality, actigraph, children, health.

1. Sarrera eta motibazioa (Formatu orokorra eta bibliografia)

Auto zirkulazioa, trenen trafikoa edo aireko garraioaren ondorioz sorturiko soinua, aktibitate industrialaren ondorioz sorturikoa edo hiri-eremuan giza aktibitatearen ondorioz sortu daitezkeen beste hainbat soinu ingurumen zarata kontsideratzen dira (De Vos eta Van Beek, 2011).

Gaur egungo bizimoduak, zarata etengabe presente dagoen faktore bilakatu du eta esaterako, Europar Batasunean 100 milioi pertsona baina gehiago bizi dira L_{den} 55dB (goiz-arratsalde-gauean zeharreko zarata adierazlea) baino zarata altuagoaren eraginpean. Hain zuzen ere, L_{den} 55dB eta L_{night} (gauean zeharreko zarata adierazlea) 50dB balioak, zarata-maila altuegiak kontsideratuak dira eta hauek baino maila altuagoekiko esposizioak giza osasunean kalteak eragin ditzaketela ikusi da (European Topic Centre on Air Pollution and Climate Change Mitigation, 2017).

Esan bezala, ingurumen-zarata maila altuaren esposizioak osasunean kalteak eragin ditzake. Besteak beste, ikusi da, entzumenean, sistema kardiobaskularrean, eta osasun-mentalean (haserrea, gogo-aldartearen aldaketak, estresa, arreta galtzea, agresibitatea…eraginez) zein fisikoan (buruko minak, gosearen galdera, jateko antsietatea, nekea…) eragin dezakeela,

ikasketa eta kognizio zailtasunak ekar ditzakeela eta loaren asaldurak sor ditzakeela (Gupta et al., 2018; Münzel et al., 2018; Stansfeld et al., 2000).

Helduen osasunean duen eragina zabal ikertua izan bada ere, umeen osasunean duen eragina ez da horrenbeste ikertu (van Kamp eta Davies, 2013). Talde hau ingurumen zaratarekiko talde zaurgarria kontsideratzen da, izan ere, haien garapen eta hazkuntza fasean jasaten dute esposizioa (Stansfeld et al., 2000). Gainera, fase honetan zehar loak berebiziko garrantzia du, garapen fisiko, kognitibo eta sozialean betetzen duen funtzioa dela eta (Lucas de La Cruz, 2018).

Hau guztia dela eta, Gipuzkoako umeak zein ingurumen zarata mailaren eraginpean dauden deskribatzea eta honek haien osasun-mental zein fisikoan nola eragiten duen jakiteak berebiziko garrantzia du.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak (Azpiatalak eta zerrendak)

Ingurumen-zaratak haurren osasunean duen eragina gutxi ikertua izan da. Hala ere, zenbait efektu dituela ikusi da: zaratak molestia eragiten die umeei eta ongizate-maila baxuagoarekin loturik dago. Gainera, estres-maila handitzen duela eta sistema kardiobaskularrean kalteak sortu ditzakeela ere ikusi da. Horrez gain, eskolako zarata maila altuek, umeen ikasketan eta garapen kognitiboan ere eragiten du (Stansfeld eta Clark, 2015). Helduen loaren kalitatean kalteak eragiten dituela ikusi bada ere, zaratak umeen loaren kalitatean duen eragina ez da horren ikertua izan. Hara ere, badirudi, umearen etxeko fatxadan neurturiko zaratak lotura duela lo hartzeko zailtasunekin (Öhrström et al., 2006; Tiesler et al., 2013).

Loak sekulako garrantzia hartzen du garapen fasean, lo egin bitartean ezinbestekoak diren prozesu psikologiko zein fisiologikoak ematen dira eta: ehunen berriztatzea, hazkuntza, ikasketa eta oroimenaren kontsolidazioa, atsedena, etab. (Lucas de La Cruz, 2018). Gainera, loaren asaldurak denboran luzatzen badira, umeengan nekea, arreta fokuratzeko zailtasunak, haserrea, errendimendu akademiko baxua edo gogo-aldarte aldaketak bezalako kalteak ekar ditzake (Carter eta Wrede, 2017; Stansfeld eta Clark, 2015), baita erregulazio-hormonal zein - metabolikoan kalteak ere (Halperin, 2014).

Loaren kalitatea neurtzeko metodo objektiboak zein subjektiboak daude. Metodo objektiboen artean aktigrafoaren bidezko neurketa dago, eta galdetegiak, loaren egunerokoak eta eskalak metodo subjektiboak dira. Aktigrafoaren eta galdetegien bidezko neurketa konbinatua metodo egokiena dela zehaztu da (Kushida et al., 2001). Aktigrafoa azelerometroa barne duen erloju bat da eta azelerometroari esker pertsonaren mugimendua neurtzen duen. Lo gauden bitartean mugimendua ezerezera murrizten denaren gertaeran oinarritzen da, eta horren bidez lo-aldi eta esna-aldi patroiak eratzen ditu. Honi esker, loaren kantitatearen eta kalitatearen inguruko datuak eskura ditzakegu (Sadeh et al., 1995)

2.1. Ikerketaren hellburuak

Ingurumen-zaratak haurren osasunean kalteak eragin ditzakeela eta talde zaurgarria dela kontuan harturik (Stansfeld et al., 2000), ingurumen-zaratarekiko esposizioak Gipuzkoako haurren osasunean duen eragina zehazteko garrantzia azpimarratu nahi da. Hori honela, ikerketa honen helburuak ondorengoak dira:

1) Gipuzkoako 11 urteko haurrek jasaten duten ingurumen-zarata mailak deskribatzea.
2) Ingurumen zarataren esposizioak 11 urteko haurren loaren kalitatean duen eragina aztertzea.

2.2 Metodologia

Ikerketa hau INMA proiektuaren (Infancia y Medio Ambiente; Haurtzaroa eta Ingurumena) Gipuzkoako kohortean lorturiko emaitzetan oinarritzen da, 11 urteko jarraipen fasean. Proiektu

honen helburu orokorra, ingurumeneko kutsatzaileekiko esposizioaren deskripzioa eta esposizio honek emakume haurdunen zein haurren osasun eta garapenean duen eragina aztertzea da (Guxens et al., 2012). INMA proiektuak hainbat kohorte ditu Espainia mailan eta ikerketa honetan, Gipuzkoako kohorteko 136 umek parte hartu dute, haien bizitokiak ondorengo herriak izanik: Azkoitia, Azpeitia, Beasain, Lazkao, Legazpi, Ordizia, Urretxu eta Zumarraga. Industria aktibitate altua duten bailaretan egotea dute amankomunean herri hauek.

Parte-hartzaile bakoitzarentzat, haren etxebizitzako fatxadan jasotako gaueko eta arratsaldeko soinu-presio maila zehaztu da ($L_{evening}$ eta L_{night}). Horrez gain, loaren kalitatea metodo objektiboen (aktigrafoa) zein subjektiboen (gurasoek beteriko galdetegiak) bidez estimatu da. Alde batetik, parte hartzaileei 7 egunez aktigrafoa soinean eramatea eskatu zaie. Honen bidez, loaren kalitatearen erakusle diren 4 aldagai eskuratu dira: denbora ohean (ordu), lo-denbora (ordu), lo hartu arteko denbora (ordu) eta loaren efizientzia (lo denbora ohean igarotako denboraz zatitzean kalkulatua, ehunekotan). Era berean, gurasoei zenbait galdetegi betearazi zaizkie. Haietan, besteak beste, umeen lo ohituren inguruko galdera batzuk erantzutea eskatu zaie. Bertan, umeak ohera sartzen ziren ordua, zenbat denbora igarotzen zuten argia itzali eta lo hartu arte eta esnatzen zireneko orduaren inguruan galdetzen zaie. Modu honetan, gurasoek estimaturiko loaren kalitatearen erakusle diren aldagaiak estimatu dira: denbora ohean (ordu), lo-denbora (ordu), lo hartu arteko denbora (ordu) eta loaren efizientzia (ehunekotan).

3. Ikerketaren muina (Taulak, irudiak, formulak...)

3.1. Emaitzak

1. Taulak adierazten duen bezala, Gipuzkoako umeek jasaten duten arratsaldeko ingurumen-zarata maila (batezbestekoa 53,4dB; SD= 6,6) zein gaueko ingurumen zarata maila (batezbestekoa 46,4 dB; SD=6,3) oso altua da. Zehazki, ikerketan parte hartu duteen umeen %27, Munduko Osasun Erakundeak (MOE) kaltegarri identifikatzen duen egunean zeharreko 55dB-ko mailaren gainetik dago. Are gehiago, %22,3 gauean zeharreko 50dB-ko langatik gora geratzen da.

Datuek adierazten duten moduan, gurasoek beteriko galdetegien bitartez estimaturiko loaren kalitatea, aktigrafoz neurturiko loaren kalitatea baina hobea da, kasu guztietan datu objektiboa datu subjektiboa baina txikiagoa izanik modu esanguratsuan (**2. eta 3. Taulak)**.

Ez dugu ikusi ez arratsaldeko ez gaueko ingurumen zaraten eta loaren kalitatearen arteko loturarik (**1-4 Irudiak)**.

3.2. Taulak

1. taula. Arratsaldez eta gauez neurturiko ingurumen zarataren estatistiko deskribatzaileak

	n	Batez bestekoa	Desbid. estandarra	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
Arratsaldeko ingurumen zarata (dB)	125	53,4	6,6	29,4	50,4	52,4	56,3	80,1
Gaueko ingurumen zarata (dB)	125	46,4	6,3	24,2	42,8	45,8	49,4	67,4

2. taula. Loaren kalitatearen estatistika deskribatzaileak, aktigrafoz neurturiko lau aldagaiez estimaturik

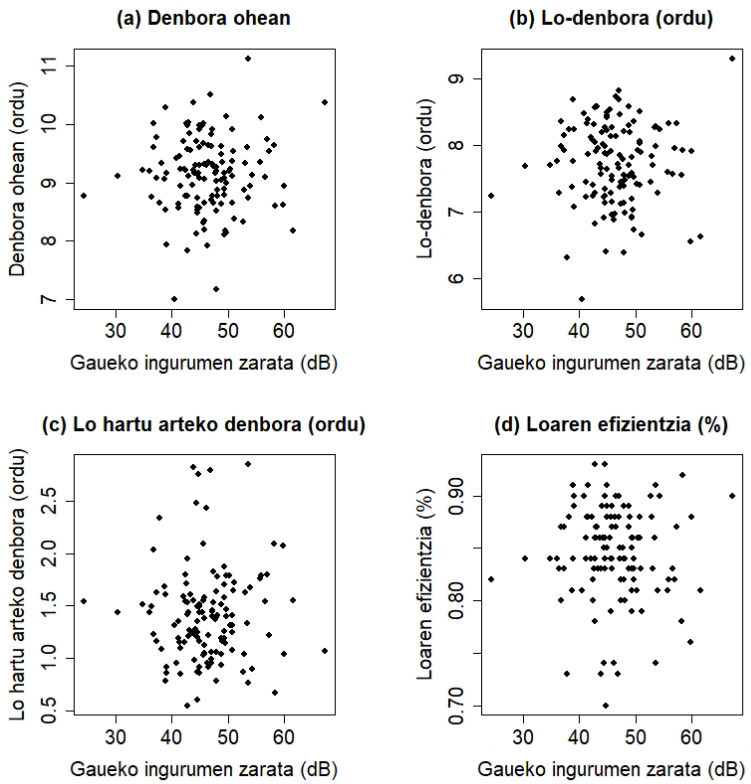
	n	Batez bestekoa	Desbid. estandarra	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
Denbora ohean (ordu)	136	9,1	0,6	7,0	8,7	9,2	9,5	11,1
Lo-denbora (ordu)	136	7,7	0,6	5,7	7,4	7,8	8,2	9,3
Lo hartu arteko denbora (ordu)	136	1,4	0,4	0,6	1,1	1,4	1,6	2,9
Loaren efizientzia (%)	136	84,7	4,4	70,0	83,0	85,0	88,0	93,0

3. taula. Loaren kalitatearen estatistika deskribatzaileak, gurasoek beteriko galdetegi bidez estimaturiko lau aldagaiez adierazita

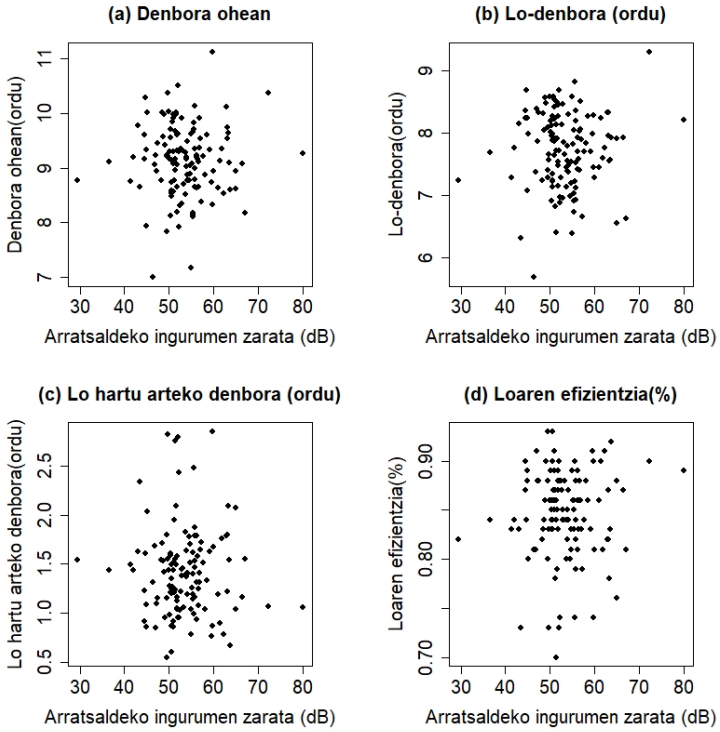
	n	Batez bestekoa	Desbid. estandarra	Min	Mediana	Max	InterQR
Denbora ohean (ordu)	134	10,23	0,4	9,29	10,22	11,46	0,5
Lo-denbora (ordu)	135	9,4	0,43	8,27	9,45	10,39	0,59
Lo hartu arteko denbora (ordu)	133	0,85	0,36	0,15	0,84	1,79	0,47
Loaren efizientzia (%)	133	92,0	3	83,0	92,0	98,0	4

3.3. Irudiak eta grafikoak

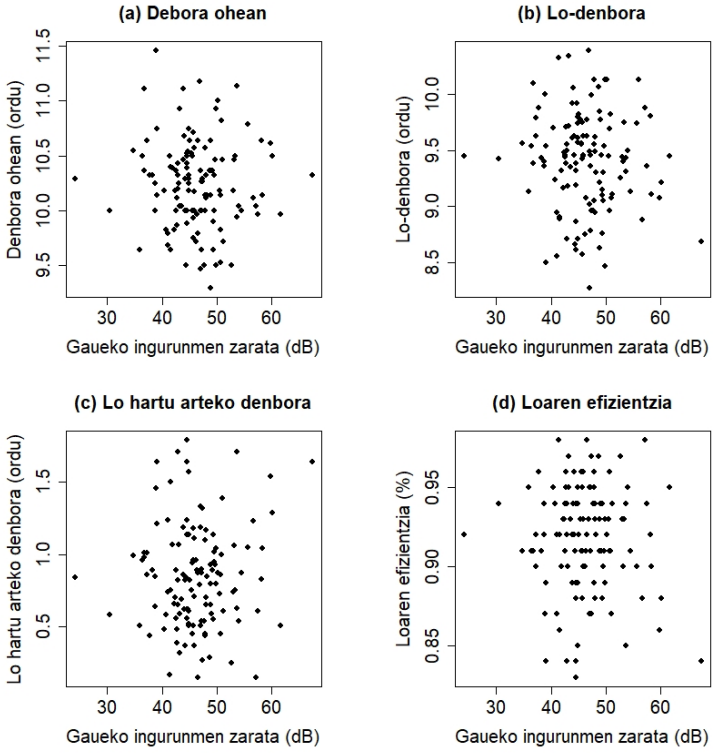
1. irudia. Gaueko ingurumen zarata eta loaren kalitatea, aktigrafoz neurturik



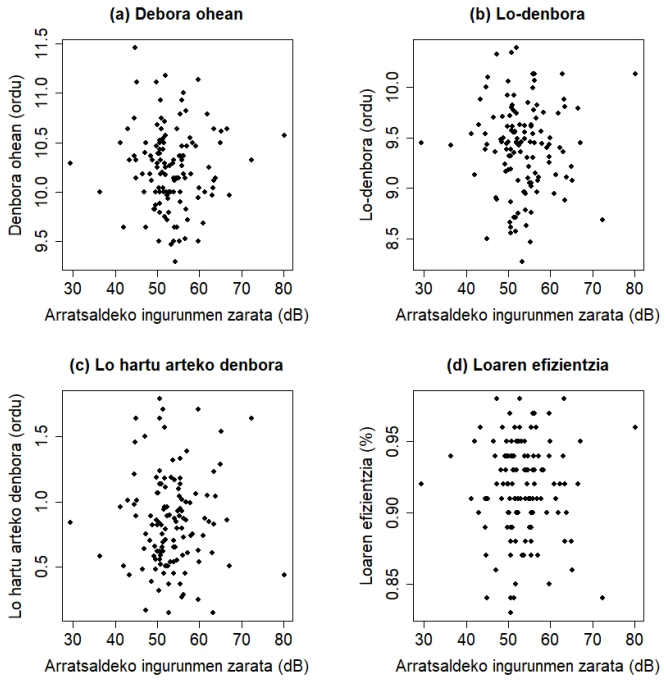
2. irudia. Arratsaldeko ingurumen zarata eta loaren kalitatea, aktigrafoz neurturik



3. irudia. Gaueko ingurumen zarata eta loaren kalitatea, gurasoek beteriko galdetegien bidez estimaturik



4. irudia. Arratsaldeko ingurumen zarata eta loaren kalitatea, , gurasoek beteriko galdetegien bidez estimaturik



4. Ondorioak

Ikerketa honen emaitzek Gipuzkoako umeek jasaten duten ingurumen zaratarekiko esposizioa oso altua dela adierazi digute, proportzio altu batek osasunarentzat kaltegarri izan daitekeen zarata esposizioa jasaten baitute. Datu hau oso garrantzitsua da, kontuan izanik, ordu horiek lo egiteko eta atsedenerako tarteak direla.

Bestalde, gurasoek beteriko galdetegien bidez estimaturiko loaren kalitatea hobea da aktigrafoz neurturiko loaren kalitatea baino. Honek esan nahi duena da, umeek gurasoek pentsatzen dutena baina okerrago egiten dutela lo.

Gainera, ez dugu ikusi ingurumen zaratak eraginik duela umeen loaren kalitatean, ez aktigrafoz neurturikoan, ezta gurasoek beteriko galdetegiez estimaturiko loaren kalitatean ere. Hau da, badirudi zarata altua izan arren ez duela umeen loan eragin zuzenik. Zenbait ikerketaren arabera, zaratak umeen loaren kalitatean eragin zuzenik ez badu ere, zenbait mekanismo fisiologiko altera dezake, odol-presioa besteak beste (van Kamp et al., 2015). Hala ere, beste zenbait ikerketek gauean zehar neurturiko trafiko zarataren eta umeen loaren kalitatearen eta kantitatearen arteko lotura aurkitu dute (Stansfeld eta Clark, 2015; Tiesler et al., 2013; Weyde et al., 2017).

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Azterturiko laginak jasaten duen ingurumen zarataren maila altua ikusirik, hark umeen osasunean eta loaren kalitatean duen eragina aztertzea ezinbestekoa da. Lehenik, eragin hau hobeto ulertzeko, lagin handiago baten onura azpimarragarria da. Modu honetan, lagin handiago batek datu esanguratsuagoak eskainiko liguke. Gainera, zaratak loan duen eraginaz gain, beste faktore batzuk ere aztertzea ezinbestekoa da: garapen kognitiboa, sistema kardiobaskularra edo

estres-maila. Eragin hori modu zuzenagoan aztertzeko erantzun biologikoak eta markatzaile biologikoak aztertzea interesgarria litzake.

6. Erreferentziak

Carter, J. C., & Wrede, J. E. (2017). Overview of Sleep and Sleep Disorders in Infancy and Childhood. Pediatric Annals, 46(4), e133-e138. https://doi.org/10.3928/19382359-20170316-02

De Vos, P., & Van Beek, A. (2011). Environmental Noise. Encyclopedia of Environmental Health, 476-488.

European Topic Centre on Air Pollution and Climate Change Mitigation. (2017). Noise in Europe 2017: Updated assessment (p. 50). https://www.eionet.europa.eu/etcs/etc-atni/products/etc-atni-reports/etcacm_tp_2016_13_noiseineurope2017

Gupta, A., Gupta, A., Jain, K., & Gupta, S. (2018). Noise Pollution and Impact on Children Health. The Indian Journal of Pediatrics, 85(4), 300-306. https://doi.org/10.1007/s12098-017-2579-7

Guxens, M., Ballester, F., Espada, M., Fernández, M. F., Grimalt, J. O., Ibarluzea, J., Olea, N., Rebagliato, M., Tardón, A., Torrent, M., Vioque, J., Vrijheid, M., & Sunyer, J. (2012). Cohort Profile: The INMA—INfancia y Medio Ambiente—(Environment and Childhood) Project. International Journal of Epidemiology, 41(4), 930-940. https://doi.org/10.1093/ije/dyr054

Halperin, D. (2014). Environmental noise and sleep disturbances: A threat to health? Sleep Science, 7(4), 209-212. https://doi.org/10.1016/j.slsci.2014.11.003

Lucas de La Cruz, L. (2018). Impacto de un programa de actividad física en el sueño de niños en edad escolar y factores relacionados. Centro de estudios socio-sanitarios, Universidad de Castilla-La Mancha.

Münzel, T., Schmidt, F. P., Steven, S., Herzog, J., Daiber, A., & Sørensen, M. (2018). Environmental Noise and the Cardiovascular System. Journal of the American College of Cardiology, 71(6), 688-697. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.12.015

Öhrström, E., Hadzibajramovic, E., Holmes, M., & Svensson, H. (2006). Effects of road traffic noise on sleep: Studies on children and adults. Journal of Environmental Psychology, 26(2), 116-126. https://doi.org/10.1016/j.jenvp.2006.06.004

Sadeh, A., Hauri, P. J., Kripke, D. F., eta Lavie, P. (1995). The Role of Actigraphy in the Evaluation of Sleep Disorders. Sleep, 18(4), 288-302. https://doi.org/10.1093/sleep/18.4.288

Stansfeld, S., & Clark, C. (2015). Health Effects of Noise Exposure in Children. Current Environmental Health Reports, 2(2), 171-178. https://doi.org/10.1007/s40572-015-0044-1

Stansfeld, S., Haines, M., & Brown, B. (2000). Noise and Health in the Urban Environment. Reviews on Environmental Health, 15(1-2). https://doi.org/10.1515/REVEH.2000.15.1-2.43

Tiesler, C. M. T., Birk, M., Thiering, E., Kohlböck, G., Koletzko, S., Bauer, C.-P., Berdel, D., von Berg, A., Babisch, W., & Heinrich, J. (2013). Exposure to road traffic noise and children's behavioural problems and sleep disturbance: Results from the GINIplus and LISAplus studies. Environmental Research, 123, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.01.009

van Kamp, I., & Davies, H. (2013). Noise and health in vulnerable groups: A review. Noise and Health, 15(64), 153. https://doi.org/10.4103/1463-1741.112361

van Kamp, I., Waye, K. P., eta Gidlöf-Gunnarsson, A. (2015). The effects of noise disturbed sleep in children on cognitive development and long term health. Child eta Noise, 19.

Weyde, K. V., Krog, N. H., Oftedal, B., Evandt, J., Magnus, P., Øverland, S., ... eta Aasvang, G. M. (2017). Nocturnal road traffic noise exposure and children's sleep duration and sleep problems. International journal of environmental research and public health, 14(5), 491.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi ditut INMA proiektuaren parte diren ikerlari zein parte-hartzaile guztiei, proiektu hau posible egiteagatik. Baita ere eskerrak, Euskal Herriko Unibertsitateko Ingurumen Epidemiologia eta Haurren Neuropsikologia taldeko kideei ere, etengabeko sostengua eta laguntza eskaintzearren. Eskerrak ere Eusko Jaurlaritzari, lan hau posible izateko behar beharrezkoa den diru laguntza ematearren ere.

Hiriko gune berdeak eta osasunean duten eragina

Anabitarte, A.[1,2]

[1]Prebentzio Medikuntza eta Osasun Publikoa saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, [2] Biodonostia Osasun Ikerketa Institutoa

asier.anabitarte@ehu.eus

Laburpena

Geroz eta hiritarragoa den mundu batean bizi gara, Nazio Batuen Erakundearen arabera, 2018. urtean munduko biztanleriaren %55a hirietan bizi zen eta 2050. urtean %68a izatea espero da. Hortaz, hiriak garrantzi handi hartzen du biztanleriaren bizitzan eta bizimoduan. Hiriek bizimodu ez-osasuntsuak bultzatzen dituzte eta osasunerako kaltegarriak diren kutsatzaile asko aurki daitezke bertan. Hiriko gune berdeak, ordea, gune osasuntsuak dira hainbat bideren bitartez. Lan honetan, hiriko gune berdeetara esposizioa edukitzeak emakume haurdunen eta haurren osasunean eduki dezakeen eragina aztertu da, bi artikulu ezberdinen bitartez.

Hitz gakoak: hiriko gune berdeak, osasun fisikoa, osasun mentala, gune naturalak

Abstract

We live in an increasingly urban world, according to the United Nations in 2018, 55% of the world's population lived in cities and it is expected to be 68% by 2050. The city is therefore becoming an increasingly important part of people's lives and livelihoods. Cities promote unhealthy lifestyles and many pollutants harmful to health can be found there. However, the green areas of the city are healthy areas through different ways. This paper analyses the impact of exposure to urban green spaces on pregnant women and children health through two different papers.

Keywords: urban green spaces, physical health, mental health, natural spaces

1. Sarrera eta motibazioa

Landa exodoa martxan zegoen prozesu bat zen. Industrializazioak, ordea, hiritartze prozesua azkartu egin zuen, herrietan bizi ziren biztanleak hirietara migratuz. Haien helburua lan bat lortzea zen, bizitza duinago bat lortzeko asmoz (Delgado Viñas, 2019). Esan bezala, herrietako jendea hirietara mugitzen hasi zen. Honek hirien hazkundea ekarri zuen, prozesu hau industrializazioarekin azkartu eta gaur egun arte gertatu dela esan daiteke, modu azeleratu edo desazeleratuago batean. Izan ere, 1950. urtean munduko biztanleriaren %30a, soilik, hirietan bizi bazen, gaur egun %55a pasata %65era iristeko aurreikuspena dago (United Nations, 2018).

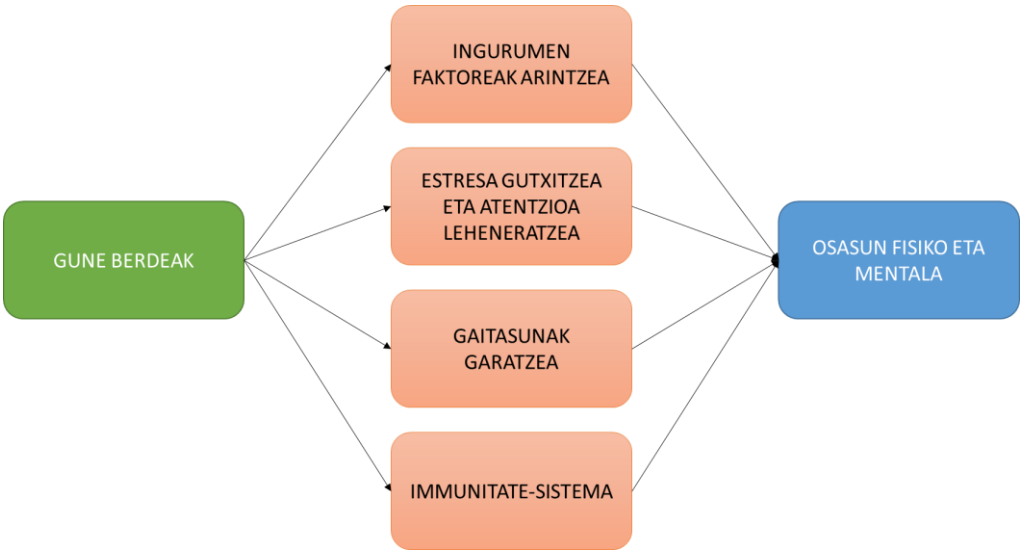
Hiriko bizitza autoen agintepean dagoela esan daiteke, oinezkoak alde batera geratu dira autoak kaleen zati nagusienak menperatuz. Hirietako mugikortasuna autoaren ikuspegitik dago diseinatua. Honek hiriko bizimodua ez-osasuntsua izatera eraman du (Fariña-Tojo, 2019), batez ere, autoek espazio publikoa okupatzeaz gain, hiritarren osasunerako kaltegarriak diren ingurumen kutsatzaileen sortzaile nagusietako bat direlako, aire kutsadura eta zarata (Vardoulakis et al., 2016). Autoentzako sorturiko hirian ere ez dago ariketa fisikoa egiteko ia espaziorik eta jakina da, ariketa ez egitea edo bizitza sedentarioa edukitzea kaltegarriak direla osasunerako (U.S. Department of Health and Human Services, 2002).

Hiriko gune berdeek osasunean eragin positiboa dutela ez da ezagutza berri bat, XIX. mendean, adibidez, hiri-parkeen eta aisia mugimenduaren argudio nagusietako bat izan zen, espazio hauek onuragarriak zirela osasunerako (Stormann, 1991). Hala ere, nahiz eta gune berdeak osasunean positiboki eragiten dutela jakin, azken urteetara arte ez da ikertu nola eragiten duten gune berdeek positiboki osasunean (WHO Regional Office for Europe, 2016).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gune berdeek osasunean lau ibilbideren bitartez dute eragin positiboa osasunean, modelo teorikoaren arabera, nahiz eta hiru diren ikertuenak (Hartig et al., 2014; Markevych et al., 2017; Nieuwenhuijsen eta Khreis, 2019).

1. irudia. Gune berdeek osasunean eragiteko dituzten bideak



Gune berdeek ingurumen faktore estresagarriak gutxitzeko ahalmena dute, aire kutsadura eta zarata gutxituz eta beroaldiak eta hezetasuna erregulatuz (David Suzuki Foundation, 2015). Gune berdeek ere estres-mailak gutxitu eta atentzioa leheneratzen dute, *Stress Reduction Theory (SRT)* eta *Attention Restorative Theory*ek *(ART)* diotenaren arabera, hurrenez hurren (Kaplan eta Kaplan, 1989; Ulrich, 1993). Gainera, ariketa fisikoa egitera bultzatzen dute, hau garatzeko espazio seguru eta osasuntsuak eraikiz, autorik eta kutsadurarik gabeko espazio zabalak eskainiz, eta giza kohesioa ere sustatzen dute (Almanza et al., 2012; Kuo et al., 1998). Azkenik, gune berdeek sistema immunologikoa indartzen dute (Ruokolainen et al., 2015; Von Hertzen et al., 2015).

Nire tesiaren helburua gune berdeek osasunean duten eragina aztertzea da, zehazki, emakume haurdunen esposizioa neurtuz haurdunaldian zehar jaioberrien jaiotza osasunean nola eragin dezaken eta haurren esposizioa neurtuz zein eragin eduki dezaken haien atentzioan. Horretarako hiru ikerketa egin dira, gaur egun, oraindik, bi dira aurkezteko moduan daudenak, ordea.

3. Ikerketaren muina

Esan bezala, nire tesian landutako bi ikerketa azalduko ditut. Bata, argitaratua dago jada, besteak, hainbat saiakera egin ditu aldizkari ezberdinetan.

Argitaratua dagoen artikulua *International Journal of Environmental Research and Public Health* aldizkarian argitaratu zen, *Testing the Multiple Pathways of Residential Greenness to Pregnancy Outcomes Model in a Sample of Pregnant Women in the Metropolitan Area of Donostia-San Sebastián* izenburuarekin (Anabitarte et al., 2020). Bertan, gune berdeek jaioberrien pisuan, jaiotza goiztiarrean, jaiotze-pisu baxuan, adin gestazionalerako txikia (AGT) izatean eta adin gestazionalerako handia (AGH) izatean eragina duten aztertu zen, modelo teorikoaren hiru bide nagusienak aztertuz. Horretarako, parte hartzeko onespena eman zuten emakume haurdunei galdeketa bat betearazteaz gain, azelerometro bat utzi zitzaien, aste batean zehar erabil zezaten. Honela denbora epe horretan egindako ariketa fisikoa eta honen intentsitatea jaso ahal izan genuen. Partaide bakoitzaren NO_2aren esposizioa Europa mailako ikerketa batean garatu zen lur erabileren erregresio modelo bat eta Eusko Jaurlaritzaren Aire Kalitatearen sareko estazioen datuak erabiliz kalkulatu genuen (Beelen et al., 2013). GHQari

(General Health Questionnaire) esker, haurdunen osasun psikologikoa neurtu genuen. Honela, karakterizatu genituen hiru bide nagusiak.

Galdeketarekin batera etxeko helbidea eskatu zitzaien. Partaideak geolokalizatuz gune berdeak karakterizatzeko hainbat aldagai sor daitezke GISari (Geografia Informaziorako Sistema) esker. Honela, NDVI (Normalized Difference Vegetation Index)(Weier eta Herring, 2000) indizea kalkulatu zen partaidearen etxebizitzatik 100, 300 eta 500 metroko eragin-eremuetan, indize honek eragin-eremu bakoitzaren berdetasuna kalkulatzen du. MOEk (Munduko Osasun Erakundea) gomendatu bezala, partaideek etxebizitzatik 300 metrotara 5000m^2 baino handiagoa den gune berde bat zuten kalkulatu zen, baita honetara zegoen distantzia euklidearra (WHO Regional Office for Europe, 2016).

Behin aldagai guztiak sortuta, bitartekaritza analisi bat egin zen gune berdeak eta jaioberriaren osasun emaitzen arteko erlazioa egiaztatzeko. Emaitzak ez ziren esperotakoak izan, ez zen gune berdeen eta jaioberrien neurketa ezberdinen arteko harremanik ikusi, aitzitik, etxebizitzatik 300 metrotara gune berde bat edukitzeak jaiotze pisua jaisten zuela ikusi zen, behintzat, 300 metrotara gune berde bat edukitzeak babes-efektu bat zeukan AGH izatearekin, nahiz eta efektu hau oso esanguratsua ez izan.

Bigarren artikulua argitaratzeke dago, *Does a brief exposure to green space in the school the best option to improve the attention in the children?* izenburuarekin (Anabitarte A, in preparation). Artikulu honen helburua gune berdeek 7 urteko haurren atentzioan duten eragina aztertzea da, gune berdeek osasunean duten eragina atentzioaren leheneratzearen bidea aztertuz. Ikerketa hau Zarauzko 3 eskoletan eta Donostiako eskola batean egin zen. 7 urteko haurrak gelara iritsi eta atentzioa neurtzeko ANT (Attention Network Test) froga egin zuten. Behin amaituta, taldea bitan banatu zen zoriz eta talde bat gune berde batera bidaltzen zen bitartean, beste taldea gune gris edo eraikitako gune batera bidaltzen zen. Bertan hamaiketakoa jan eta aisia jarduera bat egiten zuten. Ondoren bi taldeak batera gelara itzuli eta froga egin zuten berriro. Hipotesia gune berdean egon zirenek bigarren aldiz froga hobeto egingo zutela zen. Izan ere, gune berdean atentzioa leheneratzea lortuko zuten. Emaitzek, ordea, ez zuten hipotesia baieztatu eta ez zen ikusi hobekuntza esanguratsurik gune berdera joan zen taldean, beste taldearekin alderatuz.

4. Ondorioak

Nire tesian, orain arteko ikerketetan behintzat, emaitza esanguratsurik aurkitu ez badut ere, literatura zientifikoan hainbat dira gune berde eta osasunaren arteko harremana aztertu eta baieztatu dutenak (Fong et al., 2018; James et al., 2015; Twohig-Bennett eta Jones, 2018). Aipatu behar da gune berdeen babes-efektu bat ikusi dela AGHrekiko, baina hau oso esanguratsua ez izateaz gain, jaiotze pisuaren jaitsiera ematen delako gerta daiteke, hortaz, ez esan onuragarria izan daitekeenik. Garrantzitsua da honelako ikerketak egiten jarraitzea gune berdeek osasunean nola eragiten duten hobeto ulertu ahal izateko, etorkizunean antzeko ikerketak metodologia garatuagoekin erreplikatzeko. Nola eragiten duten ulertzeaz gain, ezagutza hau erabaki tekniko eta politikoak hartzen dituzten langileengana iristaraztea funtsezkoa da, gerora hartu beharreko erabakietan kontuan hartu ahal izateko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunari dagokionez, etorkizun hurbilean tesia osatzen duen hirugarren artikulua amaitzea litzateke. Hirugarren artikuluan INMA (Infancia y Medioambiente) proiektuan parte hartzen duten haurrak izango dira ikerketako partaideak. INMA estatu mailako proiektu bat da, 7 kohorte (Ribera dÉbre, Menorca, Granada, Sabadell, Valentzia, Asturias eta Gipuzkoa) egonkorrez osatutakoa. Proiektua emakume haurdunek, Gipuzkoako laginean 2006-2008an, lehen ekografia egin behar zuten momentuan hasi zen, ea parte hartu nahi zuten galdetuz. Gaur egun, emakume horien seme-alabek 14 urte dituzte eta 2 urtetik behin gutxi gorabehera jarraipen fase bat egiten zaie, galdeketak, lagin biologikoak, test neuropsikologikoak,

ingurumeneko laginak, eta abar jasoaz. Honela, haurrari eta gurasoei buruzko informazio ugari biltzen da, ondoren osasun aldagai ezberdinekin alderatzeko. Nire hirugarren artikuluan, 4, 7 eta 11 urteetako jarraipenetan egindako atentzio testak eta adin horietan zuten gune berdeen esposizioa aztertuko ditut. Ikerketa hau Asturiaseko eta Gipuzkoako kohorteetako haurrekin egingo dut, fase bakoitzeko gune berdeetara duten esposizioak atentzioan nola eragin dezakeen aztertuz. 2017. urtean Dadvand-ek (2017) antzeko ikerketa bat egin zuen, 4 eta 7 urteko faseetan, baina kasu honetan, INMA proiektuko Sabadell eta Valentziako kohorteak erabili zituen. Beraz, interesgarria izan daiteke protokolo eta une berak erabili dituzten bi ikerketak alderatzea. Izan ere, Sabadell eta Valentziako guneak klima mediterraneoa dute eta landaredia ez da Asturias edo Gipuzkoan aurkitu daitekeen berdina, hauek klima atlantikoa baitute.

Ikergaiari dagokionez, gune berdeak karakterizatzeko ditugun baliabideak berritze bidean doaz, badira teknologia berriak erabiltzen ari diren ikerketak, etorkizuneko bidea irekiz. Hala nola, jada nahikoa ohikoak diren GNSSen (Global Navigation Satellite System), GPS (Global Positioning System) bezala ezaguturikoak, erabilera, esaterako, edota LiDAR (Light Detection and Ranging) teknologia. Azken hau oraindik ez da ia erabili, baina teknologia honi esker gune berdeak kalkulatzeko edo karakterizatzeko modua guztiz aldatuko da, izan ere, bi dimentsiotan kalkulatutakoa hiru dimentsiotan kalkulatzeko aukera ematen du teknologia honek. Gainera, gizakion prismatik izango da. Hortaz, errealagoa izango da ikerketako partaideen gune berdetara duten esposizioaren karakterizazioa. Bere garaian GIS teknologiak bultzada handia eman zion ingurumen epidemiologiari, izan ere, esposizioak espazialki karakterizatzeko aukera emateaz gain geoinformazioa ere barneratu zuen datu baseetan, analisiak beste maila batera eramanez (Nieuwenhuijsen, 2016; Nuckols et al., 2004). *Urban exposome* terminoa ere nahikoa berria da eta hiriek osasunean duten eragina aztertzen dituzten etorkizuneko ikerketetan maiz ikusiko da. Hirietan osasunarentzat kaltegarriak izan daitezken faktore guztiak, ezagunak ditugunak behintzat, biltzen ditu *urban exposome* kontzeptuak. Datozen urteetan, ikerketetan esposizio aldagai bat osasun arazo batekin alderatzeaz gain, arrisku faktore guztiek osasun arazo batean eduki dezaketen eragina aztertuko da. Jada ari dira batzuk horretan (Nieuwenhuijsen, 2016).

6. Erreferentziak

Almanza, E., Jerrett, M., Dunton, G., Seto, E., & Ann Pentz, M. (2012). A study of community design, greenness, and physical activity in children using satellite, GPS and accelerometer data. *Health and Place*, *18*(1), 46–54. https://doi.org/10.1016/j.healthplace.2011.09.003

Anabitarte, A., Subiza-Pérez, M., Ibarluzea, J., Azkona, K., García-Baquero, G., Miralles-Guasch, C., Irazusta, J., Whitworth, K. W., Vich, G., & Lertxundi, A. (2020). Testing the Multiple Pathways of Residential Greenness to Pregnancy Outcomes Model in a Sample of Pregnant Women in the Metropolitan Area of Donostia-San Sebastián. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(12), 4520. https://doi.org/10.3390/ijerph17124520

Beelen, R., Hoek, G., Vienneau, D., Eeftens, M., Dimakopoulou, K., Pedeli, X., Tsai, M. Y., Künzli, N., Schikowski, T., Marcon, A., Eriksen, K. T., Raaschou-Nielsen, O., Stephanou, E., Patelarou, E., Lanki, T., Yli-Tuomi, T., Declercq, C., Falq, G., Stempfelet, M., … de Hoogh, K. (2013). Development of NO2 and NOx land use regression models for estimating air pollution exposure in 36 study areas in Europe - The ESCAPE project. *Atmospheric Environment*, *72*(2), 10–23. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.02.037

Dadvand, P., Tischer, C., Estarlich, M., Llop, S., Dalmau-Bueno, A., López-Vicente, M., Valentín, A., de Keijzer, C., Fernández-Somoano, A., Lertxundi, N., Rodriguez-Dehli, C., Gascon, M., Guxens, M., Zugna, D., Basagaña, X., Nieuwenhuijsen, M. J., Ibarluzea, J., Ballester, F., & Sunyer, J. (2017). Lifelong Residential Exposure to Green Space and Attention: A Population-based Prospective Study. *Environmental Health Perspectives*, *125*(9), 097016. https://doi.org/10.1289/EHP694

David Suzuki Foundation. (2015). *The impact of green space on heat and air pollution in urban communities: a meta-narrative systematic review*.

Delgado Viñas, C. (2019). Depopulation processes in European Rural Areas: A case study of Cantabria (Spain). *European Countryside*, *11*(3), 341–369. https://doi.org/10.2478/euco-2019-0021

Fariña-Tojo, J. (2019). La Agenda Urbana Española: hacia una ciudad más saludable. *Ciudad y Territorio. Estudios Territoriales (CyTET)*, *56*, 753–764. https://recyt.fecyt.es/index.php/CyTET/article/view/77734/48006

Fong, K., Hart, J. E., & James, P. (2018). *A review of a epidemiologic studies on greenness and health: Updated Literature Through 2017*. *5*(1), 77–87. https://doi.org/10.1007/s40572-018-0179-y.A

Hartig, T., Mitchell, R., de Vries, S., & Frumkin, H. (2014). Nature and Health. *Annual Review of Public Health*, *35*(1), 207–228. https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-032013-182443

James, P., Banay, R. F., Hart, J. E., & Laden, F. (2015). A Review of the Health Benefits of Greenness. *Current Epidemiology Reports*, *2*(2), 131–142. https://doi.org/10.1007/s40471-015-0043-7

Kaplan, R., & Kaplan, S. (1989). *The experience of nature : a psychological perspective*. Cambridge University Press. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=7l80AAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PR7&ots=TpMZOIt53l&sig=yYAH3o9twbG1-h8jy4Oih5Pk0zM&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Kuo, F. E., Sullivan, W. C., Coley, R. L., & Brunson, L. (1998). Fertile Ground for Community: Inner-City Neighborhood Common Spaces. *American Journal of Community Psychology*, *26*(6), 823–851. https://doi.org/10.1023/A:1022294028903

Markevych, I., Schoierer, J., Hartig, T., Chudnovsky, A., Hystad, P., Dzhambov, A. M., de Vries, S., Triguero-Mas, M., Brauer, M., Nieuwenhuijsen, M. J., Lupp, G., Richardson, E. A., Astell-Burt, T., Dimitrova, D., Feng, X., Sadeh, M., Standl, M., Heinrich, J., & Fuertes, E. (2017). Exploring pathways linking greenspace to health: Theoretical and methodological guidance. *Environmental Research*, *158*, 301–317. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.06.028

Nieuwenhuijsen, M. (2016). Urban and transport planning, environmental exposures and health-new concepts, methods and tools to improve health in cities. *Environmental Health*, *15*(S1), S38. https://doi.org/10.1186/s12940-016-0108-1

Nieuwenhuijsen, M., & Khreis, H. (2019). *Integrating Human Health into Urban and Transport Planning*.

Nuckols, J. R., Ward, M. H., & Jarup, L. (2004). Using geographic information systems for exposure assessment in environmental epidemiology studies. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 112, Issue 9, pp. 1007–1015). Public Health Services, US Dept of Health and Human Services. https://doi.org/10.1289/ehp.6738

Ruokolainen, L., Von Hertzen, L., Fyhrquist, N., Laatikainen, T., Lehtomäki, J., Auvinen, P., Karvonen, A. M., Hyvärinen, A., Tillmann, V., Niemelä, O., Knip, M., Haahtela, T., Pekkanen, J., & Hanski, I. (2015). Green areas around homes reduce atopic sensitization in children. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *70*(2), 195–202. https://doi.org/10.1111/all.12545

Stormann, W. F. (1991). The ideology of the american urban parks and recreation movement: Past and future. *Leisure Sciences*, *13*(2), 137–151. https://doi.org/10.1080/01490409109513132

Twohig-Bennett, C., & Jones, A. (2018). The health benefits of the great outdoors: A systematic review and meta-analysis of greenspace exposure and health outcomes. *Environmental Research*, *166*, 628–637. https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2018.06.030

U.S. Department of Health and Human Services. (2002). *Physical activity fundamental to preventing disease*.

Ulrich, R. S. (1993). Biophilia, biophobia, and natural landscapes. *The Biophilia Hypothesis*, *April*, 73–137. https://doi.org/citeulike-article-id:7372161

United Nations. (2018). *World Urbanization Prospects: The 2018 Revision*. https://population.un.org/wup/Publications/Files/WUP2018-KeyFacts.pdf

Vardoulakis, S., Dear, K., & Wilkinson, P. (2016). Challenges and Opportunities for Urban Environmental Health and Sustainability: The HEALTHY-POLIS initiative. In *Environmental Health: A Global Access Science Source* (Vol. 15, Issue S1, p. S30). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12940-016-0096-1

Von Hertzen, L., Beutler, B., Bienenstock, J., Blaser, M., Cani, P. D., Eriksson, J., Färkkilä, M., Haahtela, T., Hanski, I., Jenmalm, M. C., Kere, J., Knip, M., Kontula, K., Koskenvuo, M., Ling, C., Mandrup-Poulsen, T., Von Mutius, E., Mäkelä, M. J., Paunio, T., … De Vos, W. M. (2015). Helsinki alert of biodiversity and health. In *Annals of Medicine* (Vol. 47, Issue 3, pp. 218–225). Informa Healthcare. https://doi.org/10.3109/07853890.2015.1010226

Weier, J., & Herring, D. (2000, August 30). *Measuring Vegetation (NDVI & EVI)*. NASA Earth Observatory. https://earthobservatory.nasa.gov/Features/MeasuringVegetation/

WHO Regional Office for Europe. (2016). *Urban green spaces and health* (M. B. and M. M. Andrey I. Egorov, Pierpaolo Mudu (ed.)). http://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/urban-health/publications/2016/urban-green-spaces-and-health-a-review-of-evidence-2016

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiet aipatutako bi ikerketetan parte hartu dutenei, Donostialdeko emakume haurdunei eta Zarautz eta Donostiako eskoletako haurrei. Haiek gabe ikerketa hauek ezingo liratekeelako aurrera eraman.

Eskerrik asko ere Aitana Lertxundi eta Jesús Ibarluzeari, nire tesi-zuzendari izateagatik eta irakatsitako guztiagatik.

Bestetik, eskerrak eman nahi dizkiot Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza, Hizkuntza politika eta Kultura sailari, doktore tesia egiteko jasotako diru-laguntzagatik.

RNA zirkular berrien bilaketak atzeranzko moztu-itsastearen kontserbazio altua frogatu du ardian

[1]Varela-Martínez, E., [1]Bilbao-Arribas, M., [2]Corsi, G., [2]Anthon, Ch.,
[1]Abendaño, N., [2]Gorodkin, J. eta [1]Jugo, B.M.

[1]Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU
[2]Department of Veterinary and Animal Sciences, Center for Non-Coding RNA in Technology and Health, University of Copenhagen, Denmark
martin.bilbao@ehu.eus, begonamarina.jugo@ehu.eus

Laburpena

RNA zirkularrak (circRNAk) modu kobalentean itxitako RNA ez-kodetzaile zirkularrak dira. Duten egitura dela eta, circRNAk gaixotasunen biomarkatzaile gisa erabiltzeko aproposak dira. Molekula mota hauek garrantzi zientifikoa badute ere, animalia ez-ereduetan ikerketa garatu gabe dago oraindik. Lan honetan bi ehun desberdinen RNA-seq datuak aztertu dira ardiaren circRNAk identifikatzeko. Garun azalean eta odol-zelula mononuklearretan 2510 eta 3403 circRNA detektatu dira, horietatik 1379 guztiz berriak. Harrigarria da detektatu diren circRNA molekulen moztu-itsasteen %63a gizakiarekiko guztiz homologoak direla. Gainera, gizakian ikusi den bezala, emaitzek CDR1-AS circRNA ardiaren garunean dituen funtzioak babesten dituzte.

Hitz gakoak: RNA zirkularrak, ardia, RNA-seq, transkriptomika

Abstract

Circular RNAs (circRNAs) are covalently closed circular non-coding RNAs. Due to their structure, circRNAs are good candidates for disease biomarkers. Despite the scientific relevance of these molecules, the study of circRNAs in non-model organisms is still in its infancy. Here, we analyse RNA-seq data to identify circRNAs from two sheep tissues: peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and parietal lobe cortex. Out of 2510 and 3403 circRNAs detected in parietal lobe cortex and in PBMCs, a total of 1379 novel circRNAs were discovered. Remarkably, around 63% of all detected circRNAs were found to be completely homologous to a circRNA annotated in human. Besides, our results support the miRNA sponge function of CDR1-AS in sheep brain, as reported in human.

Keywords: Circular RNAs, sheep, RNA-seq, transcriptomics

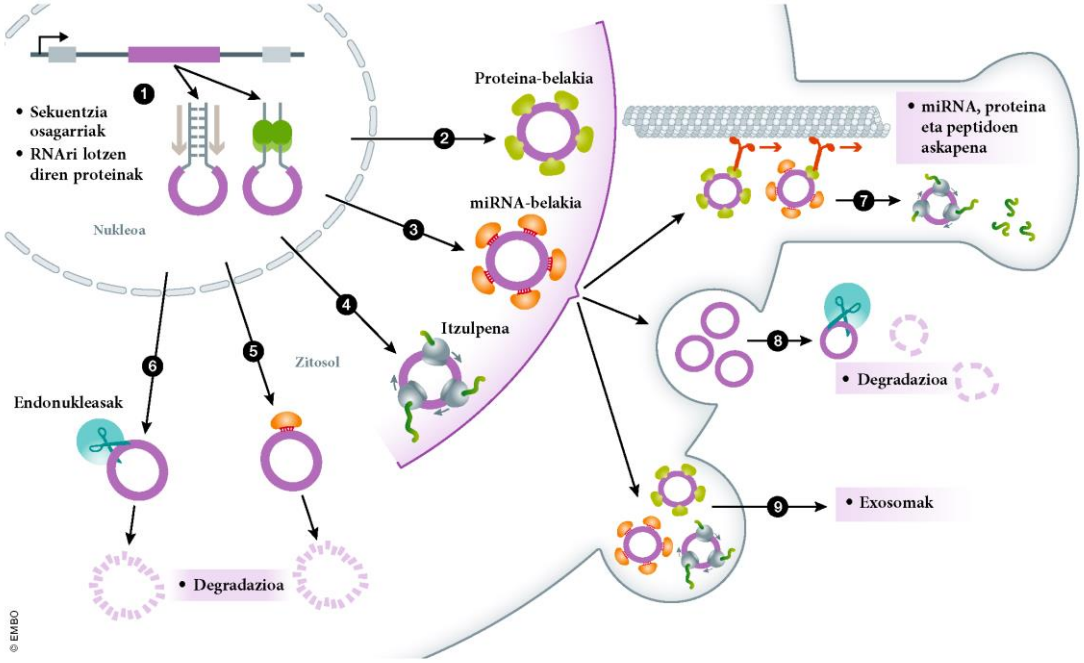
1. Sarrera eta motibazioa

RNA zirkularrak (circRNAk) modu kobalentean itxitako RNA zirkular ez-kodetzaile klase berri bat da, moztu-itsaste alternatiboaren ondorioz RNA lineal baten exon bat ur-gora dagoen beste exon batekin lotzean sortutakoa, *backsplicing* edo atzeranzko moztu-itsaste deituriko prozesuaren bitartez (1. Irudia) (Guo et al., 2014). Egitura zirkularraren ondorioz, circRNAk RNA linealak baino egonkorragoak dira, RNAasa R-rekiko erresistenteagoak dira eta erdibizitza luzeagoa dute (Bonizzato et al., 2016), gaixotasunen biomarkatzaile gisa erabiltzeko aproposagoak diren ezaugarriak. Duela urte asko aurkitu baziren ere, urte luzez uste izan zen circRNAk moztu-itsaste akatsetatik eratorriko ugaritasun baxuko azpiproduktuak zirela. Azkenaldian ekoizpen altuko sekuentziazio metodoek izan duten hedapena handiari esker, frogatu da molekula hauek pentsatu baino arruntagoak direla eta horietako batzuk bidezidor biologiko garrantzitsuetan parte hartzen dutela (Sekar & Liang, 2019; Wang et al., 2019).

Zirkularizazioaren mekanismo zehatza ez da guztiz ezagutzen, baina hainbat faktore erlazionatu dira horrekin: Ikusi da RNA zirkularren biogenesia RNA polimerasa II-ren elongazio tasarekin korrelazio positiboa izaten duela (Ebbesen et al., 2017). Gainera, atzeranzko moztu-itsastea eragiten duten exonen muturretan sekuentzia osagarriak egoteak exonen muturrak espazioan gertu kokatzea eragiten du, moztu-itsaste kanonikoan parte hartzen duen

makineriaren funtzionamendua ahalbidetuz (Chioccarelli et al., 2020). Hortaz gain, RNAri lotzen diren proteina batzuk RNA zirkularren biogenesia sustatzeko gai dira ere (Chioccarelli et al., 2020). Funtzio biologikoari dagokionez, RNA klase honek hainbat mekanismoren bitartez eragina izango luke zelularen barnean, esaterako, sortzen den genearen RNA mezulariaren adierazpena doituz edo beste molekula mota batzuekin lotuz (Patop et al., 2019). Bigarren mekanismo hau azkenaldian garrantzia hartu du, ikusi baita circRNA batzuek lotura-gune asko dituztela mikroRNA (miRNA) izeneko RNA molekula txikientzat. MikroRNAk beste RNA mezularien adierazpena kontrolatu dezakete, eta frogatu da circRNA batzuk gai direla miRNA molekula asko bahituz hauen eragina indargabetzeko edo ahultzeko. Mekanismo hau darabilten circRNAk miRNA-belaki (miRNA sponge) modura ezagutzen dira. RNA zirkularren inguruko ikerketa oraindik hasiberria denez, eragin mekanismo gehiago deskribatzea espero daiteke, izan mikropeptidoen kodetzea edo zelulen arteko komunikazio-seinale bezala aritzea (Patop et al., 2019).

1. irudia. RNA zirkularren biogenesia eta balizko elkarrekintzak (Patop et al.-etik moldatua (2019)). 1) Biogenesia. 2) Proteinen bahiketa. 3) miRNA-en bahiketa. 4) Peptidoen sorrera. 5) miRNA bidezko degradazioa. 6) Endonukleasa bidezko degradazioa. 7) Molekulen garraioa zelularen gune zehatz batera. 8) Askapena zelula-kanpoko gunera eta degradazioa. 9) Exosomen bidezko zelulen arteko komunikazioa.



Aurkikuntza berriek circRNAen adierazpena gaixotasun askorekin lotu dute, eta diagnostikorako eta tratamendurako eremu berri bat ireki dute. Frogatuta dago hauen maila handitu egiten dela garunean adinean aurrera egin ahala, eta gauza bera gertatzen da adinari lotutako gaixotasun neurologikoetan, hala nola Alzheimer eta Parkinson gaixotasunetan (Akhter, 2018). Gaixotasun baskular aterosklerotikoa, osteoartritisa eta diabetesa bezalako gaixotasunetan eragina izateaz gain, hainbat minbizi motatan RNA zirkularren adierazpena aldatuta dagoela frogatu da (Zhang et al., 2018). Berrikiago, circRNA asko modu anormalean adierazten direla ikusi da eta rol garrantzitsuak betetzen ahal dituztela gaixotasun autoimmuneen garapenean, hala nola artritis erreumatoidean, lupus eritematoso sistemikoan edo esklerosian (Xia et al., 2019). Beraz, circRNAk, biomarkatzaile potentzial gisa ez ezik, sistema immunearen doitzaile gisa ere funtzionatzen ahalko lukete, terapiarako aukerak eskainiz.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gure ikerketa taldeak etxe-abereen RNA ez-kodetzaileen karakterizazioan egiten du lan, batez ere txertoen eta patogenoen aurkako erantzun immunearen baitan. Jadanik mikroRNAk eta RNA ez-kodetzaile luzeak (lncRNAk) aztertu ditugu eta orain RNA zirkularretan arreta jarri dugu. RNA-seq datuetatik circRNAk identifikatzeko metodologia bioinformatikoak badira, baina gutxitan aplikatu dira eredu ez diren espezieetan. Gizakian aldiz, analisi informatiko horiez gain, zeinbait circRNAren karakterizazio funtzionala ere burutu da. Etxe-abereen hainbat ehunetatik lortutako RNA-seq liburutegiak genoma osoko gene-adierazpena aztertzeko erabili izan dira behia, txerria, zaldia edo ardia bezalako etxe-abereetan batez ere. Ardian ikerketa gutxi batzuek soilik ikertu dituzte RNA mota hauek abeltzaintzarako ekonomikoki garrantzitsuak diren ehunak erabiliz. Ikerketa hauek muskuluaren garapenaren, ugalketaren kontrolaren edo ilajearen kalitatearen ikuspuntutik burutu izan dira. Hortaz, lan honetan lehen aldiz identifikatu dira ardiaren RNA zirkularrak immunitate sistemako eta nerbio-sistemako ehunetan.

Datuak gure taldearen RNA-seq eta miRNA-seq esperimentuetan lortutakoak dira, txertoen laguntzaile modura erabilitako aluminio hidroxidoak txertaketaren osteko erantzun immunean duen eragina ezagutzeko egitasmoan. Oraingoz sekuentziatu diren ehunak odol-zelula mononuklearrak (*PBMC, peripheral blood mononuclear cells*) (Varela-Martínez et al., 2018) eta entzefaloa (Varela-Martínez et al., 2020) izan dira. Aurrekari hauek kontuan izanda, analisi honen bitartez lortu nahi den helburua bikoitza da: Batetik, ardiaren RNA zirkularren identifikazioa egitea RNA-seq datuetatik, azterketa deskriptiboa eta ebolutiboa eginez. Bestetik, lan honek circRNAk mikroRNAekin lotu eta hauen funtzionamendua aldatzeko gai diren aztertzea du helburu.

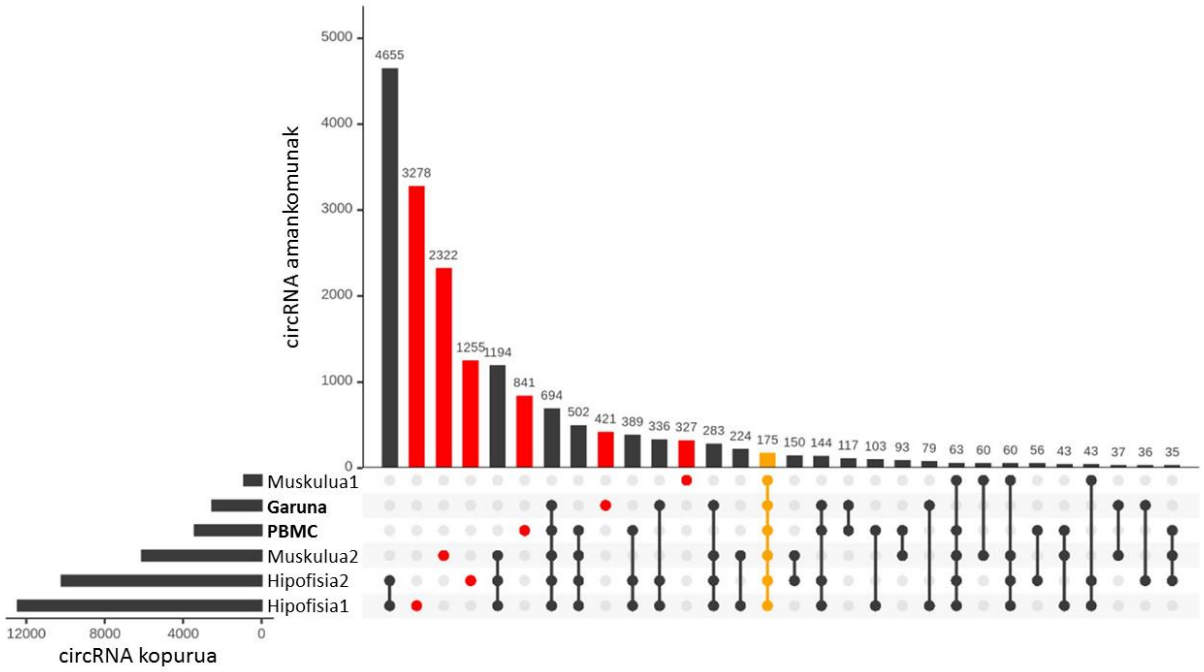
3. Ikerketaren muina

3.1. RNA zirkularren karakterizazioa

RNA zirkularrak identifikatzeko estrategia RNA-seq datuetan atzeranzko moztu-itsasteak bilatzean datza, hau da kontrako norabidean kokatzen diren bi exonez osatutako lotuneak dituzten irakurketak bilatzea. Horretarako, irakurketen kalitate kontrola Trimmomatic tresnarekin egin ondoren, sekuentzia guztiak ardiaren genomaren aurka mapatu ziren HISAT2 eta STAR programekin. Mapatzen ez zuten irakurketak erabiliz, atzeranzko moztu-itsasteak bilatzeko antzeko oinarria duten (Zeng et al., 2017) bi tresna bioinformatiko hautatu ziren, Segemehl (Hoffmann et al., 2014) eta DCC (Cheng et al., 2016). Garun ehunean 12475 eta 60375 circRNA aurkitu zituzten Segemehl eta DCC tresnek, hurrenez hurren. *PBMC* laginetan berriz, 19611 eta 63138 circRNA aurkitu zituzten. RNA zirkular guztiak iragazi egin ziren fidagarrienak soilik mantentzeko hurrengo arauak erabiliz: 2 irakurketako adierazpena izatea gutxienez, hiru lagin desberdinetan aurkitzea eta tresna biek identifikatzea. Honek circRNA kopurua murriztu zuen 2510era garunean eta 3403ra odol zeluletan. Bi ehunetan iragazkiak pasa zituzten circRNA amankomun kopurua 1236ekoa izan zen.

Bi ehunetan identifikatutako circRNA gehienak gene ezagunetatik datoz eta bi edo hiru exonez osatuak daude, lehendik gizakian eta saguan ikusi denarekin bat eginez. Gainera, espero bezala, ardietan circRNAen adierazpena oso hedatua dago bi ehunetan, gizakian ehun horietan bereziki circRNA kantitate handia aurkitu baita. Zenbait circRNAek ehunaren edo garapen-fasearen araberako adierazpen profila dutenez, azterketa honetan antzemandako circRNAak ardian egindako beste ikerketa batzuekin alderatu ziren, hipofisian eta muskulu eskeletikoan egindako bina lan (2. irudia). 175 circRNA bakarrik hauteman ziren ehun guztietan, ehunka circRNA ehun bakarrean bakarrik adierazten ziren bitartean.

2. irudia. Hainbat lanetan identifikatu diren RNA zirkularren adierazpenaren konparaketa (Varela-Martínez et al.-etik moldatua (2021). Ehunen erreferentziak artikuluan daude. Barra horizontalek lan bakoitzean identifikatu diren circRNA kopuru totala adierazten dute eta barra bertikalek lanen arteko circRNA amankomunak.

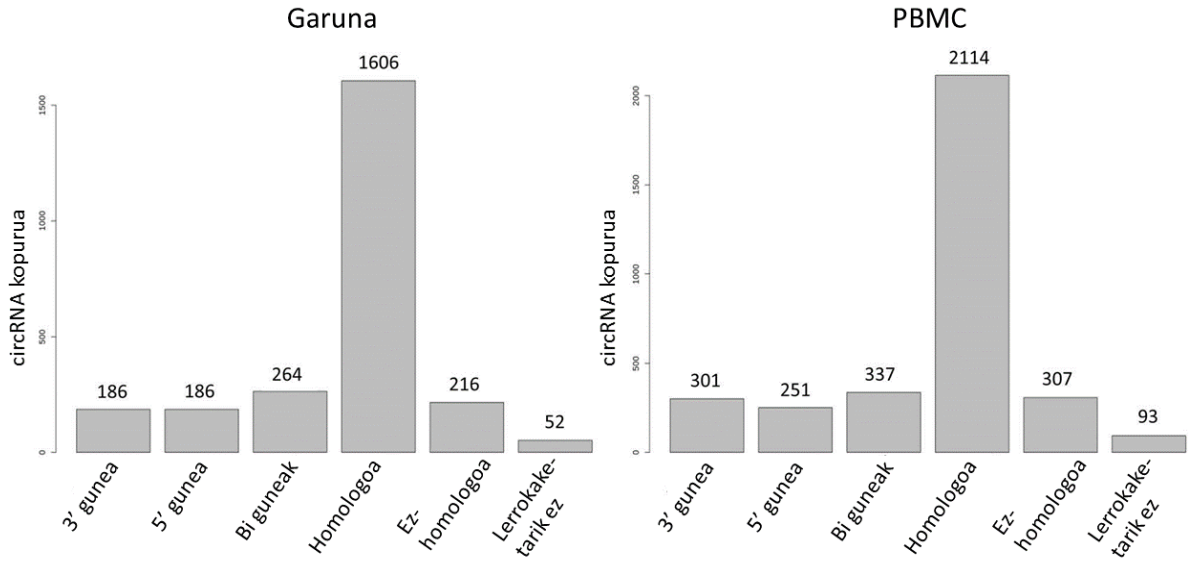


3.2. RNA zirkularrak kontserbatuta daude

Antzemandako circRNAk CIRCpedia datu baseko giza RNA zirkularrekin alderatu ziren. Ardien circRNA koordenatuak gizakien genomara pasa ziren, eta atzeranzko moztu-itsaste loturaren kontserbazio mailaren arabera sailkatu ziren (3. Irudia). CircRNA batek ardian eta gizakian exon beraren muturretako bat (3' edo 5' guneak) erabiltzen badu gune horiek kontserbatuta daudela esan dezakegu, baina circRNA bat guztiz homologoa izateko bi guneak kontserbatuta egon behar dira eta, gainera, lotutako bi exonak homologoak izan behar dira ardiaren eta gizakiaren artean. Sekuentzia mailan bi espezieen artean kontserbaziorik ez dagoenean, lerrokaketarik ez dagoelako, ezin da moztu-itsaste guneen kontserbazioa neurtu.

Analisi honetan identifikatu ziren circRNA ia guztiek zuten, gutxienez, giza circRNA ezagun homologo bat moztu-itsaste guneetako bat erabiltzen zuena. Guztira, 1606 (%63,98) eta 2114 (%62,12) circRNA giza circRNA baten guztiz homologoak ziren garunean eta odol zeluletan, hurrenez hurren. Adierazpen maila altuena zuten bi circRNAk, zeinak HOMER eta ZNF609 geneetatik eratortzen baitira, hainbat espezieetan kontserbatuta daude eta esperimentu funtzionalen bidez minbizi zelulen edo zelula osasunen hazkundean parte hartzen dutela ikusi da.

3. irudia. Ardia eta gizakiaren arteko kontserbazioaren analisia garunean eta *PBMC*etan (Varela-Martínez et al.-etik moldatua (2021). Barra bakoitzak kontserbazio maila bat adierazten du. Ez-homologoak eta lerrokaketarik ez dutenak kontserbaziorik gabeko circRNAk dira.



3.3. RNA zirkularrak miRNA itu gisa

Ardian circRNAk miRNA molekulen funtzionamenduan eragiten ahal duten ikusteko, miRNA lotura-gune klusterrak bilatu ziren, hau da, miRNA molekulen itu asko gertu dituzten sekuentziak. Aurretik giza-genoman miRNAk ituen klusterrak identifikatu izan direnez, gune horiek ardiaren genomarekin konparatu ziren eta circRNA locus batean zeudenak hautatu ziren. Ituak kontserbatuta zeudela konfirmatzeko RIsearch2 tresna erabili zen miRNA ituak ardiaren genoman aurresateko. Garunean eta *PBMC*etan, hurrenez hurren, 3 eta 4 bat-egite aurkitu ziren.

Gure predikzioetan oinarrituta, CDR1-AS circRNAk, hobekien ezagutzen den garuneko RNA zirkularra dena eta CDR1 genetik eratortzen dena (Piwecka et al., 2017), miR-7 eta miR-1224 miRNAk lotzeko gune ugari ditu. Bi miRNA hauek ugaztunen garunean adierazten direla ezaguna da eta CDR1-AS gure garun laginetan soilik adierazten da, maila oso altuan. Gainera, hirugarren miRNA batek, miR-671, CDR1-AS RNA zirkularraren sekuentziarekin osagarritasun oso antzekoa du gizakian eta ardian. Honen ondorioz, circRNA honek ardian gizakian duen funtzio bera betetzen duela aurresan genezake. Izan ere, garunaren funtzionamendu normala mantentzen du, sinapsien transmisioaren doiketan zeregin bat betetzen baitu (Piwecka et al., 2017).

4. Ondorioak

Lan honetan RNA-seq datu-multzo bat erabilita ardien circRNAk identifikatu dira, euren kontserbazioa aztertu da eta miRNA molekulen funtzioa aldatzen ahal duten aztertu da tresna bioinformatikoak erabiliz. Ugaztunen transkriptomak oso konplexuak direla argi geratu da azkenaldian eta mRNA klaseaz haraindi bestelako funtzioak dituzten RNA klaseak garrantzia hartzen ari dira. Ardiaren bi ehun garrantzitsu, garuna eta *PBMC*ak, lehen aldiz analizatu dira circRNAk lortzeko eta ehun zehatzetan adierazten direla ikusteaz gain, kopuru handi bat kontserbatuta dagoela ikusi da. Bestalde, miRNA lotze-guneak ere kontserbatuta aurkitu dira erkatutako bi espezieen artean.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Eskura ditugun RNA-seq sekuentziazio datuak eta datu baseetan eskuragarri dauden datuak erabiliz, analisi konparatiboen bitartez ugaztunen circRNAk kontserbatuta dauden aztertzea

litzateke hurrengo pausua, eta beren adierazpena nolakoa den aztertzea, gizakian ikusi diren circRNAk eta hauen adierazpen maila kontserbatuta dauden ez baitago argi. RNA mota hauen elkarrekintzak miRNA molekulekin espezie batetik bestera modu orokor batean mantentzen ote diren ezezaguna da oraindik ere. Horrela, ugaztunen genomen ezagutza zabaldu eta etxe-abereen osasunerako garrantzitsuak izaten ahal diren markatzaileak aurkituko genituzke.

6. Erreferentziak

Akhter, R. (2018). Circular RNA and Alzheimer's Disease. In J. Xiao (Ed.), *Circular RNAs: Biogenesis and Functions* (pp. 239–243). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1_19

Bonizzato, A., Gaffo, E., Te Kronnie, G., & Bortoluzzi, S. (2016). CircRNAs in hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood Cancer Journal*, *6*(10). https://doi.org/10.1038/bcj.2016.81

Cheng, J., Metge, F., & Dieterich, C. (2016). Specific identification and quantification of circular RNAs from sequencing data. *Bioinformatics*, *32*(7), 1094–1096. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv656

Chioccarelli, T., Pierantoni, R., Manfrevola, F., Porreca, V., Fasano, S., Chianese, R., & Cobellis, G. (2020). Histone Post-Translational Modifications and CircRNAs in Mouse and Human Spermatozoa: Potential Epigenetic Marks to Assess Human Sperm Quality. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(3), 640. https://doi.org/10.3390/jcm9030640

Ebbesen, K. K., Hansen, T. B., & Kjems, J. (2017). Insights into circular RNA biology. *RNA Biology*, *14*(8), 1035–1045. https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1271524

Guo, J. U., Agarwal, V., Guo, H., & Bartel, D. P. (2014). Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biology*, *15*(7), 1–14. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0409-z

Hoffmann, S., Otto, C., Doose, G., Tanzer, A., Langenberger, D., Christ, S., Kunz, M., Holdt, L. M., Teupser, D., Hackermüller, J., & Stadler, P. F. (2014). A multi-split mapping algorithm for circular RNA, splicing, trans-splicing and fusion detection. *Genome Biology*, *15*(2). https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r34

Patop, I. L., Wüst, S., & Kadener, S. (2019). Past, present, and future of circ RNA s . *The EMBO Journal*, *38*(16), 1–13. https://doi.org/10.15252/embj.2018100836

Piwecka, M., Glažar, P., Hernandez-Miranda, L. R., Memczak, S., Wolf, S. A., Rybak-Wolf, A., Filipchyk, A., Klironomos, F., Jara, C. A. C., Fenske, P., Trimbuch, T., Zywitza, V., Plass, M., Schreyer, L., Ayoub, S., Kocks, C., Kühn, R., Rosenmund, C., Birchmeier, C., & Rajewsky, N. (2017). Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science*, *357*(6357). https://doi.org/10.1126/science.aam8526

Sekar, S., & Liang, W. S. (2019). Circular RNA expression and function in the brain. *Non-Coding RNA Research*, *4*(1), 23–29. https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2019.01.001

Varela-Martínez, E., Abendaño, N., Asín, J., Sistiaga-Poveda, M., Pérez, M. M., Reina, R., De Andrés, D., Luján, L., & Jugo, B. M. (2018). Molecular signature of aluminum hydroxide adjuvant in ovine PBMCs by integrated mRNA and microRNA transcriptome sequencing. *Frontiers in Immunology*, *9*(OCT), 2406. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02406

Varela-Martínez, E., Bilbao-Arribas, M., Abendaño, N., Asín, J., Pérez, M., de Andrés, D., Luján, L., & Jugo, B. M. (2020). Whole transcriptome approach to evaluate the effect of aluminium hydroxide in ovine encephalon. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-020-71905-y

Varela-Martínez, E., Corsi, G. I., Anthon, C., Gorodkin, J., & Jugo, B. M. (2021). Novel circRNA discovery in sheep shows evidence of high backsplice junction conservation. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-020-79781-2

Wang, D., Luo, Y., Wang, G., & Yang, Q. (2019). Circular RNA expression profiles and bioinformatics analysis in ovarian endometriosis. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, *7*(7), 1–13. https://doi.org/10.1002/mgg3.756

Xia, X., Tang, X., & Wang, S. (2019). Roles of CircRNAs in autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, *10*(APR), 1–8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00639

Zeng, X., Lin, W., Guo, M., & Zou, Q. (2017). A comprehensive overview and evaluation of circular RNA detection tools. *PLOS Computational Biology*, *13*(6), e1005420. Retrieved from https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005420

Zhang, H. da, Jiang, L. hong, Sun, D. wei, Hou, J. chen, & Ji, Z. ling. (2018). CircRNA: a novel type of biomarker for cancer. *Breast Cancer*, *25*(1), 1–7. https://doi.org/10.1007/s12282-017-0793-9

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau E. Varela-Martínez-en tesiaren barnean Kopenhageko Unibertsitatean eginiko egonaldiaren ondorioa da, Europar Batasuneko CA15112 COST Action programaren baitan. Lana Scientific Reports aldizkarian argitaratu da aurten (Varela-Martínez et al., 2021). Eskerrak lan honetan lagundu duten beste ikertzaileei: G. I. Corsi eta C. Anthon.

Lan hau Nafarroako Agrobioteknologia Institutuarekin eta Zaragozako Unibertsitateko Albaitaritza Fakultatearekin batera izan dugun proiektuari (MINECO: AGL2013-49137-C3) esker burutu da. UPV/EHUko doktorego aurreko kontratua lortu dute E. Varela-Martínez-ek (PIF15/361) eta M. Bilbao-Arribas-ek (PIF17/306).

Endometriosia eta ezaugarri antropometriko eta menstrualak: oinarri genetiko amankomunaren bila

Garitazelaia, A., Bilbao, J.R., Fernandez-Jimenez, N., García-Santisteban, I.

Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) eta Biocruces-Bizkaia Osasun Ikerketa Institutua

agaritazelaia001@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Endometriosia kausa ezezaguneko gaixotasun ginekologiko ohikoenetariko bat da, funtzionalki aktiboa den endometrio-ehuna utero-barrunbetik kanpo haztean agertzen dena. Fenotipo ugarirekin erlazionatu da, hala nola neurri antropometrikoekin eta ezaugarri menstrualekin. Hala ere, azken horiek eta endometriosiak oinarri genetiko bera partekatzen duten ez da oraindik ezagutzen. Genetika amankomun hau aztertzeko, bi lagineko ausazkotze mendeldar (2SMR) analisia burutu genuen, GWAS ikerketetako datu publikoak erabiliz. Gure emaitzen arabera, pisu baxuak eta hilekoaren ziklo laburrek endometriosiarekin harreman genetikoa dute. Are gehiago, badirudi erlazio hau kausala izan litekeela.

Hitz gakoak: Endometriosia, ausazkotze mendeldarra, ezaugarri antropometrikoak, ezaugarri menstrualak

Abstract

Endometriosis, of unknown cause, is one of the most prevalent gynecological diseases, characterized by the presence of functionally active endometrial tissue outside the womb. It has been associated with many phenotypes, such as anthropometric and menstrual traits. However, whether these traits and endometriosis share common genetic roots is still undetermined. To investigate this, we performed a two-sample mendelian randomization (2SMR) analysis, using public data from GWAS studies. Our results showed a genetic link between low weight and shorts menstrual cycles and endometriosis. Furthermore, it seems that this relationship could be causal.

Key words: Endometriosis, mendelian randomization, anthropometric traits, menstrual traits

1. Sarrera eta motibazioa

Endometriosia kausa ezezaguneko gaixotasun ginekologiko ohikoenetariko bat da eta ugaltze-adinean dauden emakumeen %10ak pairatzen du (Shafrir et al, 2018). Gaitz kroniko eta multisistemiko hori funtzionalki aktiboa den endometrio-ehuna utero-barrunbetik kanpo hazten denean azaltzen da (Zondervan et al, 2020). Lekuz kanpoko endometrio-ehun horrek estrogeno bidezko hantura-erantzun kronikoa pizten du eta pelbiseko mina eta antzutasuna eragiten ditu (Leyland et al, 2010; Vercellini et al, 2014). Bi sintoma klasiko horietaz gain, endometriosia pairatzen duten emakumeetan era askotako sintomak ager daitezke, bere aurkezpena konplexu eta heterogeneoa den seinale (Zondervan et al, 2020). Gainera, eritasuna fenotipo ugarirekin erlazionatu da, hala nola neurri antropometrikoekin eta hilekoaren hainbat ezaugarrirekin (Parazzini et al, 2017; Vigano et al, 2012).

Ezaugarri antropometrikoetan sakonduz, zenbait azterketek endometriosia pairatzeko arrisku handiagoa aurkitu dute pisu eta gorputz-masa indize (GMI) baxuagoa duten emakumeengan, baita garaiera altuagoa dutenengan ere. Horietaz gain, gerri-aldaka indizearekin ere lotu izan da, indize baxuagoarekin zehazki (Shah et al, 2013; Farland et al, 2017). Indize horrek gorputzaren gantz antolaketaren adierazle gisa jokatzen du. Horrela, indize baxuagoak gorpuzkera ginekoiderako joera erakusten du (aldaka inguruan gerrian baino gantz pilaketa gehiago). Dena den, esan beharra dago endometriosiak neurri horiekin daukan erlazioaren norakoak ezezagunak direla oraindik.

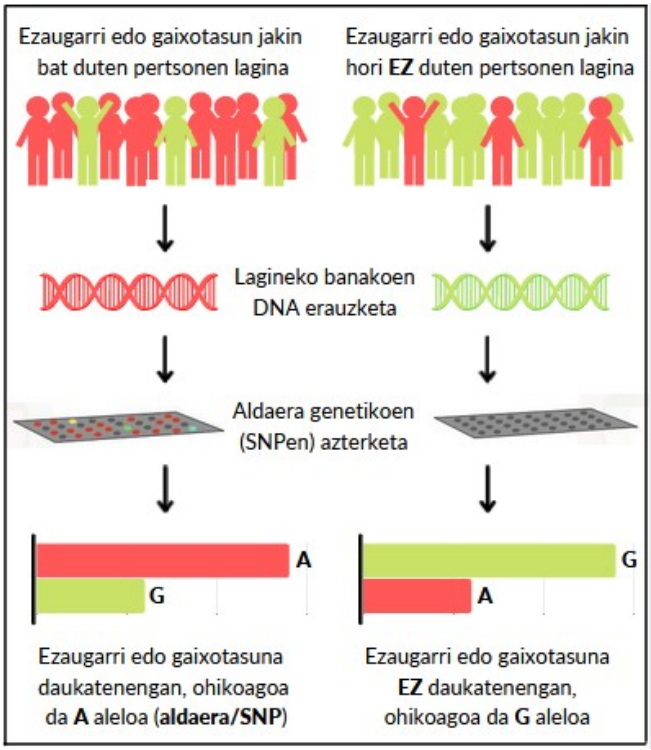
Beste alde batetik, asoziazioa aurkitu da endometriosiaren eta hilekoarekin erlazionatutako ezaugarri ezberdinen artean. Hain zuzen ere, eritasunaren intzidentzia altuagoa ikusi da menarkia (lehen hileko) goiztiarra, hileko arteko ziklo laburragoak eta hilekoaren fluxu eta iraupen handiagoa duten emakumeengan (Nnoaham et al, 2012; Missmer et al, 2004). Horrek guztiak hilekoarekiko esposizio luzeagoak endometriosia pairatzeko arriskua areagotzen duela

iradokitzen du (Giudice, 2010). Menopausiaren adinari dagokionez, aldiz, ikerketa batzuek endometriosia menopausia berantiarrarekin erlazionatzen dute (Giudice, 2010; Coleman eta Overton, 2015) eta beste batzuek menopausia goiztiarrarekin (Ruth et al, 2016; Boneva et al, 2015). Berriro ere, patologia horren eta ezaugarri menstrualen arteko lotura zer-nolakoa den oraindik ez da argitu, ez eta erlazio horiek jatorri genetikoa duten ere.

Endometriosia gaixotasun konplexua da, hots, ingurunearen eta gene askoren parte-hartze txikien eraginpekoa (Boyle et al, 2017). Berarengan genetikaren ekarpena nahiko altua da, %47-51koa hain zuzen (Saha et al, 2015; Treloar et al, 1999); hori dela eta, ikerkuntza ugari egin dira endometriosiarengan eragina duten geneak edota aldaera genetikoak ezagutzeko, gaitzaren oinarria ulertze aldera (Chou et al, 2021). Endometriosia bezala, eritasun honekin erlazionatuta dauden fenotipoak ere ezaugarri konplexuak dira eta baliteke genetikak horiengan ere eragin aldakorra edukitzea.

Ezaugarri eta gaixotasun konplexuak aztertzeko, genoma osoaren asoziazio ikerketak (ingeleseko *Genome-Wide Association Study* edo GWAS) erabiltzen dira. GWASetan gaixotasun edo ezaugarri jakina duten eta ez duten indibiduoen bi talderen DNA laginak analizatzen dira, nukleotido bakarreko polimorfismoen (ingeleseko *Single-Nucleotide Polymorphism* edo SNP) mailan. SNPak DNA sekuentziaren kokapen zehatz batean dauden aldaketak dira. Kokapen bakoitzean egon daitekeen aldaera bakoitzari alelo deritzogu eta GWASaren bi taldeetan aurkitzen diren aleloen maiztasunak konparatuz, ezaugarri edo eritasun konkretua edukitzeko suszeptibilitatearekin erlazionatzen diren SNPak ezagutuko ditugu (Frayling, 2014) (**1. irudia**).

1. irudia. Genoma osoaren asoziazio ikerketek (GWASek) jarraitzen duten prozesua.

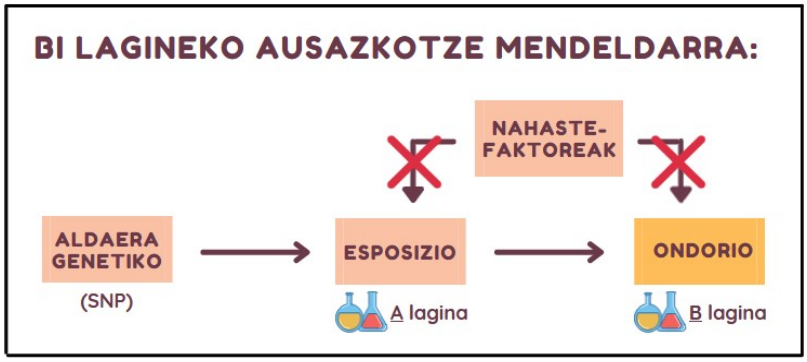


Aurretik aipatu dugun bezala, behaketazko ikerlan epidemiologikoek endometriosia ezaugarri antropometriko eta menstrualekin erlazionatu dute, baina loturaren bat badagoela aurkitzeaz haratago, ezin izan dute bestelako informaziorik eman. Izan ere, azterlan horietan inferentzia kausala oztopa dezaketen nahaste-faktoreak sartzen dira jokoan (Haycock et al, 2016). Arazoa gainditzeko, ikerlariak entsegu klinikoetan erabiltzen den ausazkotzeaz baliatzen dira. Hala ere, entsegu horiek desabantailak ere badituzte, besteak beste, lagin-tamaina oso handien beharra. Horri guztiari irtenbidea ematen, ausazkotze mendeldar (ingeleseko *Mendelian Randomization* edo MR) deituriko metodo estatistikoa daukagu, esposizio eta ondorioaren arteko erlazio kausala aztertuko duena, GWASetan ikertutako aldaera genetikoak (SNPak) bitartekari gisa erabiliz. MRan GWASetatik esposizioarekin erlazioa erakutsi duten SNPak lor daitezke, baita ondorioarekin erlazioa erakutsi dutenak ere. Bi SNP multzo horiek konparatzean,

esposizioarekin zein ondorioarekin harremana duten SNPak identifikatzen baditugu, bi ezaugarriek oinarri genetikoren bat partekatzen duela suposa dezakegu. Genetika zorizkoa denez banakoetan, aurkitutako emaitzak fidagarriak direla ziurta dezakegu, hau da, ez daudela nahaste-faktoreen menpe (Zheng et al, 2017; Davey Smith eta Hemani, 2014). Beste era batera esanda, metodo honekin ausazkotzea guk egin beharrean genetikak berak egingo du.

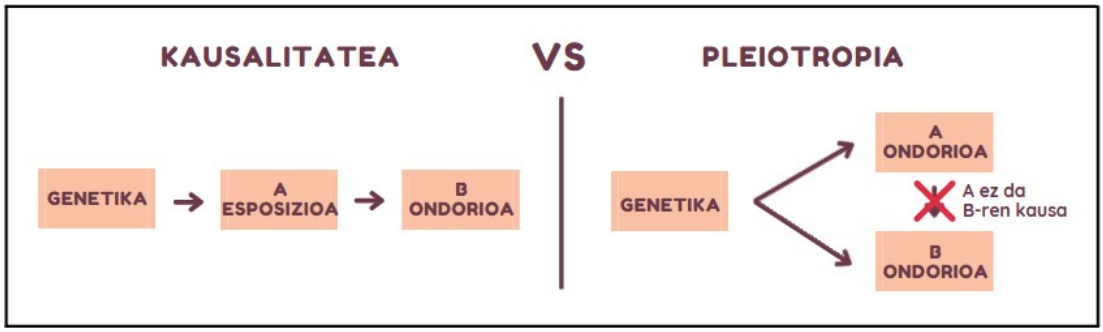
GWASen azken urteotako gorakadari esker, SNPei buruzko datu asko publiko bihurtu dira, ausazkotze mendeldarraren hedapena ahalbidetuta. MR metodoaren baitan hainbat aukera dago. Horietako batek, bi lagineko ausazkotze mendeldarrak (*Two Sample MR* edo 2SMR) hain zuzen, esposizio eta ondorio datuak bi lagin ezberdinetatik hartzen ditu (**2. irudia**). 2SMR analisiaren helburua, bi GWAS independenteren datuak esposizio eta ondorio gisa erabiliz, haien arteko asoziazio kausala aurkitzea izango da.

2. irudia. Bi lagineko ausazkotze mendeldar (2SMR) metodoaren oinarria azaltzen duen eskema.



Batzuetan, ordea, asoziazio horren oinarrian ez da kausalitatea egongo, pleiotropia baizik. Pleiotropia agertzen denean, aldaera genetikoek (SNPek) esposizioari eta ondorioari bide ezberdinetatik eragingo diete, bi hauen artean erlazio kausalik egon gabe (**3. irudia**).

3. irudia. Kausalitate eta pleiotropiaren arteko ezberdintasunak. Bietan genetikak A eta B-rengan eragiten du, baina kausalitatean genetikak B-rengan eragingo du A-ren bitartez (A B-ren kausa da). Pleiotropian, ordea, genetikak A eta B-rengan bide ezberdinetatik eragingo du (A ez da B-ren kausa).



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Esan dugunez, endometriosia ezaugarri konplexu askorekin batera agertzeko joera du; hala ere, ezaugarri horiek guztiek eta endometriosiak oinarri genetikoa partekatzen ote duten ez da oraindik ezagutzen. Hortaz, gure hipotesia da aipaturiko ikerlan epidemiologikoetan endometriosiarekin erlazionatutako neurri antropometriko zein menstrualen eta gaitzaren arteko asoziazioek jatorri genetikoa dutela. Are gehiago, hainbat aldaera genetiko endometriosiarekin erlazionatzen da, aldaerok neurri antropometrikoak eta ezaugarri menstrualak aldarazten dituztelako eta horrek gaitza pairatzeko arriskua emendatzen duelako. Horrenbestez, ausazkotze mendeldarra baliatuz, fenotipo zehatz horien eta endometrosiaren genetika amankomuna aurkitu eta, ahal dela, gertaera horien atzean kausalitatea dagoela inferitzea izango da gure helburua.

3. Ikerketaren muina

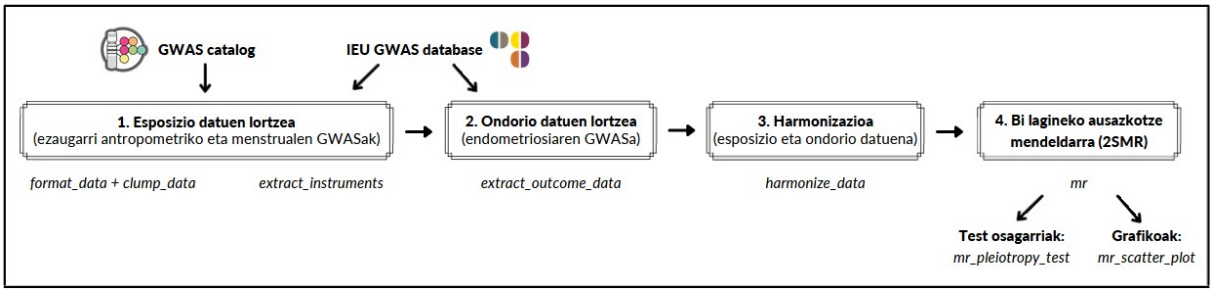
3.1. Materialak eta Metodoak

Lan honen hasierako pausua esposizio bezala erabiliko genituen endometriosiarekin erlazionatutako ezaugarri konplexuak literaturan bilatzea izan zen. Gaitzarekin harreman estuena erakutsi zuten fenotipoak aukeratu genituen, bi multzo nagusitan sailkatuz: ezaugarri antropometrikoak (pisua, garaiera, GMI eta gerri-aldaka indizea) eta hilekoarekin erlazionatutako ezaugarriak (menarkia eta menopausiaren adinak, hileko arteko ziklo-luzera eta hileko-fluxuaren kantitate eta iraupena).

Hurrengo pausua aurkitutako ezaugarri bakoitzaren GWAS bat aukeratzea izan zen, 2SMR analisian erabili ahal izateko. GWASen datuak *IEU GWAS database* eta *GWAS catalog* datu-base publikoetan eskuratu genituen, hurrengo irizpideak oinarri: ahalik eta lagin-tamaina handiena izatea eta europar jatorriko pertsonetan eta emakumeetan soilik egindakoak izatea. Era berean, endometriosiarentzat (ondorioarentzat) *finn-a-N14_ENDOMETRIOSIS* GWASa hautatu genuen, *IEU GWAS database* biltegian.

Behin GWAS guztiak edukita, *RStudio* programa eta *Two-sampleMR* paketea erabiliz, bi lagineko MR analisia (2SMR) burutu genuen, metodoaren pausu bakoitza gauzatzeko komando ezberdinak erabiliz (**4. irudia**). Lehenik eta behin, aukeratutako GWASetatik esposizioarekin asoziazio esanguratsua erakusten duten SNPak eskuratu genituen. Jarraian, SNP esanguratsu horiek ondorio gisa erabilitako *finn-a-N14_ENDOMETRIOSIS* GWASean bilatu genituen. Behin datu guztiak jasota, konbinatu (harmonizatu) genituen eta 2SMR analisia egikaritu genuen, sortutako datu bateratuak analizatzeko. Horrela, esposizioen eta ondorioaren arteko erlazio genetikoak aurkitu genituen eta, hauek kausalak edo pleiotropikoak ziren argitzeko, pleiotropia-test osagarriak exekutatu genituen. Bukatzeko, lortutako emaitzak hobeto ikusteko grafikoak (sakabanatze-diagramak) sortu genituen.

4. irudia. 2SMR analisia burutzeko jarraitutako pausuen eskema, erabilitako komandoekin.



3.2. Emaitzak

Endometriosiarekin erlazionaturiko fenotipo antropometriko eta menstrualek gaixotasunarekin oinarri genetikoa konpartitzen duten aztertzeko, bi lagineko ausazkotze mendeldar (2SMR) analisia burutu genuen. 2SMRean bi lagin ezberdin behar dira, esposizioa eta ondorioa ordezkatzen dituztenak, hain zuzen. Gure kasuan, esposizio datuak ezaugarri konplexuen (antropometriko eta menstrualen) GWASetatik lortu genituen eta ondorio datuak, berriz, endometriosiaren GWAS batetik.

Neurri antropometrikoen eta endometriosiaren loturaren arteko 2SMR analisiari dagokionez, pisua, garaiera, GMI eta gerri-aldaka indizea hartu genituen esposizio moduan. Emaitzen arabera, endometriosiak pisuarekin erlazio genetiko estatistikoki esanguratsua du (**1. taula**). **5. irudi**ko sakabanatze-diagrametan (ingeleseko *scatter-plot*) adierazten denez, pisu baxuagoa izateko joera genetikoak endometriosia garatzeko arrisku handiagoa ematen du.

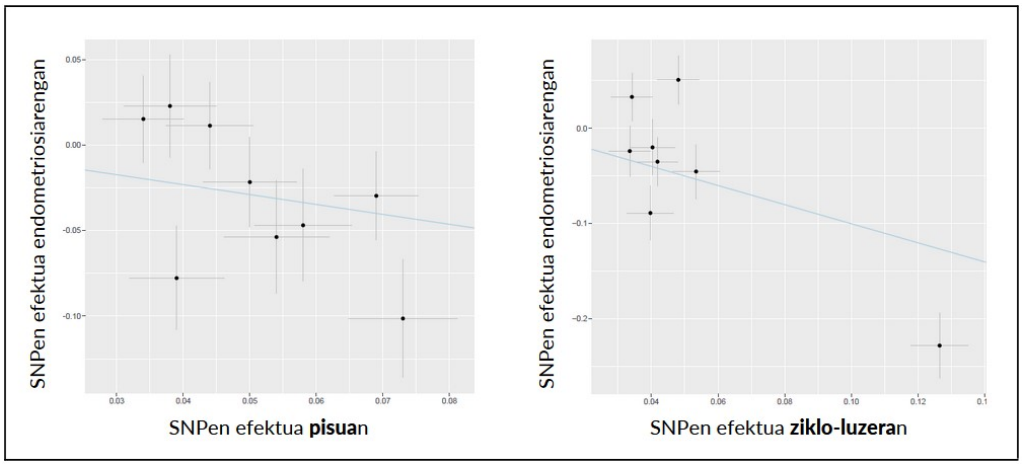
Ezaugarri menstrualei dagokienez, aztertutako ezaugarriak menarkia eta menopausiaren adinak, hilekoaren ziklo-luzera eta hileko-fluxuaren kantitate eta iraupena izan ziren. Kasu honetan, ziklo-luzerak asoziazio genetiko esanguratsua aurkeztu zuen endometriosiarekin (**1. taula**). Hain zuzen ere, analisiak eritasuna jasateko probabilitate altuagoa erakutsi zuen hileko arteko denbora laburrerako joera genetikoa duten emakumeengan (**5. irudia**).

Esan beharra dago hileko-fluxuaren eta endometriosiaren arteko 2SMR analisiak SNP bakarra aurkitu zuela harremana bultzatzen, eta ondorio sendoak ateratzeko ezintasunagatik emaitzok analisitik kanpo utzi ditugu.

1. taula. Ezaugarri antropometriko eta menstrual bakoitza esposizio bezala hartuta lortutako 2SMR analisiaren emaitzak, alderantzizko bariantza haztatua (ingeleseko *Inverse Variance Weighted* edo IVW) metodoa erabiliz. Emaitza esanguratsuak (p<0,05) beltzez markatuta.

Esposizioa	Beta balioa	Errore estandarra	p balioa
Pisua	**-0,579**	**0,239**	**0,015**
Garaiera	-0,025	0,104	0,808
Gorputz-masa indizea	-0,279	0,144	0,053
Gerri-aldaka indizea	-0,108	0,249	0,665
Menarkiaren adina	-0,315	0,169	0,061
Hilekoaren ziklo-luzera	**-1,004**	**0,403**	**0,013**
Menopausiaren adina	-1,883	1,042	0,071

5. irudia. Pisu eta hilekoaren ziklo-luzera ezaugarrien sakabanatze-diagramak. Bi hauek dira endometriosiarekin asoziazio genetiko estatistikoki esanguratsua erakutsi dutenak.



Aurretik azaldutako analisiek ezaugarri ezberdinen eta endometriosiaren arteko erlazio genetikoa dagoen erakuts diezagukete. Harremana kausala edo pleiotropikoa den aztertzeko, pleiotropia analisia gauzatu genuen. Emaitzek GMI eta endometriosiaren artean lotura pleiotropikoa dagoela erakutsi zuten, baina gainerako ezaugarri guztien eta endometriosiaren arteko harreman esanguratsurik ez zen identifikatu. Horien artean garrantzitsuenak pisu eta ziklo luzeraren ezaugarriak izango lirateke (2SMR esanguratsua lortu dutenak) eta bi hauetan pleiotropia analisia esanguratsua ez izateak euren eta endometriosiaren artean erlazio kausalak egon litezkeela iradokitzen du.

3.3. Eztabaida

Azken urte hauetan zehar, endometriosia ohikoak diren fenotipo edo ezaugarri konplexu askorekin batera azaldu ohi dela aditzera eman dute ikerketa epidemiologiko ugarik (Zondervan et al, 2020). Askoz murritzagoak izan dira, ordea, asoziazio horren oinarri genetikoa ikertzen literaturan aurkitutako azterlanak. Esku artean daukagun lan honetan, bi lagineko ausazkotze mendeldar metodoa medio, endometriosiaren eta ohiko ezaugarri horien arteko lotura genetikoa aztertu dugu, lehenengo aldiz, guztiz publikoak diren GWAS azterketen datuak erabilita.

Lehenik eta behin, endometriosiaren eta hainbat neurri antropometrikoren (pisu, garaiera, GMI eta gerri-aldaka indize) arteko harremanari buruz gehiago jakiteko analisiak gauzatu genituen. Horien artean, gaitzaren eta pisuaren arteko erlazio estatistikoki esanguratsua azaldu zaigu. Zehazki, pisu baxuagorako joerak endometriosia garatzeko arriskua handitzen duela erakutsi digute eskuratutako datuek, orain arte literaturako ebidentziak zioen bezalaxe (Farland

et al, 2017). Gainera, bi horien arteko loturaren oinarrian ez da pleiotropiarik aurkitu, hortaz, pisuak endometriosiarengan eragin kausala izan dezakeela ematen du.

Era berean, ezaugarri menstrualen (menarkia eta menopausiaren adinak, hilekoaren ziklo-luzera eta hileko-fluxuaren kantitate eta iraupena) endometriosiarekiko asoziazioa miatu genuen. Oraingoan, gaixotasunak hilekoaren ziklo-luzerarekin lotura esanguratsua duela ikusi dugu, hain zuzen ere, ziklo-luzera laburrarekin lotutako predisposizio genetikoak endometriosia pairatzeko aukera handitzen duela aurkitu dugu, sarreran aipatutako ebidentziak erakutsi moduan (Missmer et al, 2004). Beraz, hein batean behintzat, informazio hau bat dator hilekoarekiko esposizio handiagoak eritasuna azaltzeko aukerak emendatzen dituela defendatzen duen orain arteko teoriarekin (Giudice, 2010). Aipatzekoa da hilekoen arteko iraupenak eta endometriosiak ez dutela harreman pleiotropikorik azaldu, horrenbestez, hilekoarekiko esposizio handiagoa eragiten duen oinarri genetikoa patologiaren kausetako bat izan liteke.

Ikerlan honen abantaila nabarmenetako bat 2SMR analisia publikoak diren datuak erabiliz aurrera eraman dugula izan da. Izan ere, datu publikoak erabiltzeak ezagutza zientifikoa modu efizientean lortzea ahalbidetzen du. Hau esanda, ezin dugu ahaztu muga batzuk ere badituela ikerlan honek. Hasteko, ondorio datuak lortzeko egokiena izan zitekeen GWASa ez zegoen publikoki eskuragarri. Halaber, esposizio datuak lortzeko erabilitako GWASek ere euren mugak izan dituzte. Alde batetik, emakumeetan soilik burututako azterlanen lagin-tamainak ez ziren oso handiak, eta bestetik, europar jatorrikoak ziren guztiak, lortutako emaitzak beste jatorrietako emakumeetara zabaltzea zailduz.

4. Ondorioak

Guztiz publikoak diren datuak eta 2SMR metodoa erabiliz, endometriosiaren eta berarekin erlazionaturiko ohiko ezaugarri konplexuen genetika amankomun posiblea aztertu duen lehen analisi sistematikoa da hau. Lan honi esker, pisu baxua eta hilekoaren ziklo laburrak, genetika tartean dela, endometriosiaren kausa direla ezagutu dugu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lagin-tamaina handiagoko eta beste jatorrietako GWASak publikoki eskuragarri daudenean, horiek erabiliz mota honetako ikerketaren bat berregitea aproposa litzateke, lan honen potentzia estatistiko baxuagatik erantzun gabe geratu diren galderak argitzeko eta lortutako datuak europar jatorria ez duten emakumeetara zabaldu ahal izateko.

Bestalde, egindako 2SMR analisiak lotura genetikoak ezarri ditu endometriosiaren eta hainbat ezaugarriren artean, aldaera genetikoak (SNPak) bitarteko gisa erabiliz. SNP konkretu horiek zeintzuk diren eta erlazio genetiko horretan zer nolako ekarpena duten aztertzea lan honen hurrengo pausua izango litzateke. Horrela, genetikak endometriosiarengan duen ekarpena hobeto ulertu ahalko genuke.

Azkenik, aurkitutako emaitzek (edota emaitza hauek oinarri hartuta etorkizunean lor daitezkeen emaitza berriek) praktika klinikoan eduki lezaketen erabilgarritasuna sakonago aztertzea interesgarria litzateke. Azken finean, lan honekin endometriosia edukitzeko arriskua handitzen duten faktoreak aurkitu ditugu, gaitza daukaten emakumeak identifikatzen lagundu gaitzaketenak. Esaterako, geureganatutako informazioarekin, badakigu pelbiseko minagatik kontsultatzen duten pazienteek pisu baxua edota hileko-ziklo laburrak dituztenean euren jarraipena arreta handiagoz egitea probetxugarria izan litekeela. Honen inguruan ikertzen jarraitzeak endometriosia pairatzen duten emakumeen egunerokotasunean onurak eduki litzake etorkizun hurbilean.

6. Erreferentziak

Boneva, R.S. et al (2015), Early menopause and other gynecologic risk indicators for chronic fatigue syndrome in women, *Menopause*, 22(8), 826-834.

Boyle, E.A. et al (2017), An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic, *Cell*, 169(7), 1177-1186.

Chou, Y.C. et al (2021), Integration of genome-wide association study and expression quantitative trait locus mapping for identification of endometriosis-associated genes, *Scientific Reports*, 11(1), 478.

Coleman, L. eta Overton, C. (2015), GPs have key role in early diagnosis of endometriosis, *The Practitioner*, 259(1780), 13-17.

Davey Smith, G. eta Hemani, G. (2014), Mendelian randomization: genetic anchors for causal inference in epidemiological studies, *Human Molecular Genetics*, 23(1), 89-98.

Farland, L.V. et al (2017), Associations among body size across the life course, adult height and endometriosis, *Human Reproduction*, 32(8), 1732-1742.

Frayling, T.M. (2014), Genome-wide association studies: the good, the bad and the ugly. *Clinical Medicine*, 14(4), 428-431.

Giudice, L.C. (2010), Endometriosis, *New England Journal of Medicine*, 362(25), 2389-2398.

Haycock, P.C. et al (2016), Best (but oft-forgotten) practices: the design, analysis, and interpretation of Mendelian randomization studies, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 103(4), 965-978.

Leyland, N. et al (2010), Endometriosis: Diagnosis and Management, *Journal of Endometriosis*, 2(3), 107-134.

Missmer, S.A. et al (2004), Reproductive History and Endometriosis Among Premenopausal Women, *Obstetrics & Gynecology*, 104(5), 965-974.

Nnoaham, K.E. et al (2012), Is early age at menarche a risk factor for endometriosis? A systematic review and meta-analysis of case-control studies, *Fertility and Sterility*, 98(3), 702-712.

Parazzini, F. et al (2017), Epidemiology of endometriosis and its comorbidities, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 209, 3-7.

Ruth, K.S. et al (2016), Genetic evidence that lower circulating FSH levels lengthen menstrual cycle, increase age at menopause and impact female reproductive health, *Human Reproduction*, 31(2), 473-481.

Saha, R. et al (2015), Heritability of endometriosis, *Fertility and Sterility*, 104(4), 947-952.

Shafrir, A.L. et al (2018), Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 51, 1-15.

Shah, D.K. et al (2013), Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort, *Human Reproduction*, 28(7), 1783-1792.

Treloar, S.A. et al (1999), Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample, *Fertility and Sterility*, 71(4), 701-710.

Vercellini, P. et al (2014), Endometriosis: pathogenesis and treatment, *Nature Reviews Endocrinology*, 10(5), 261-275.

Vigano, P. et al (2012), Principles of phenomics in endometriosis, *Human Reproduction Update*, 18(3), 248-259.

Zheng, J. et al (2017), Recent Developments in Mendelian Randomization Studies, *Current Epidemiology Reports*, 4(4), 330-345.

Zondervan, K. et al (2020), Endometriosis, *New England Journal of Medicine*, 382(13), 1244-1256.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahiko genizkieke Rebeca Arauzo, Jokin de Miguel eta Aintzane Rueda ikerketa kideei, euren laguntzagatik. Era berean, *FinnGen* ikerketako partaide eta azterlariak eskertu nahiko genituzke.

Gibeleko endotelioaren konbertasen eginkizuna gibeleko metastasian

Martin-San Sebastian, A.[1], García-Gallastegui, P.[1]

[1]*Zelulen Biologia eta Histologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, UPV/EHU*

ander.martinss@ehu.eus

Laburpena

Konbertasen eginkizuna tumoreen garapenean sarritan ikertu da eta tumore-zeluletan horien adierazpen-mailan gertatutako aldaketak deskribatu dira. Artikulu honetan, konbertasen garrantzia minbizian ikertzen dugun arren, ikertzen dugun zelula ez da minbizi zelula. Konbertasen adierazpena tumorearen mikroingurunean aztertzen dugu gibeleko sinusoideko zelula endotelialetan konbertasen adierazpena ikertuz. Modu honetan, gibel sinusoideko zelula endotelialen konbertasen adierazpenean gertatutako aldaketak aztertu ditugu, SW620rekin (koloneko tumore-zelula metastatikoak) zein CSC-SW620rekin (koloneko tumore-zelula ama metastatikoak) kontaktuan jartzerakoan. Hala, mRNA mailan, zelula endotelial hepatikoen konbertasen adierazpenean aldaketak ikusten dira, eta bereziki interesgarriak dira *PCSK9* eta *PACE4*-n gertatutako aldaketak.

Hitz gakoak: Konbertasak, Gibeleko Endotelioa, Gibeleko Metastasia, Mikroingurune tumorala

Abstract

The role of convertases in tumor development has often been investigated and changes in the expression level of convertases in tumor cells have been described. In this article, although we investigate the importance of convertases in cancer, the cell we investigate is not the cancer cell. We studied the expression of convertases in the tumor microenvironment by investigating their expression in hepatic sinusoid endothelial cells. Thus, we have analyzed the changes produced in the expression of convertases in hepatic sinusoid endothelial cells upon contact with both SW620 (metastatic colon tumor cells) and CSC-SW620 (metastatic colon stem cells). Thus, at the mRNA level, changes in the expression of hepatic endothelial cell convertases are observed, with changes in PCSK9 and PACE4 being of particular interest.

Keywords: Convertases, Hepatic endothelium, Hepatic metastasis, Tumor microenvironment

1. Sarrera eta motibazioa

Osasunaren Mundu Erakundeak (OME) 19,3 milioi minbizi kasu zenbatu zituen 2020an mundu mailan eta, eragin handiena dutenak kontuan hartuz, koloneko minbizia hirugarren postuan kokatu zuen (1,9 milioi kasu). Minbizia zelularen barne mekanismoen deserregulazioak ezaugarritzen duen gaixotasuna da eta horrek kontrolik gabeko zelulen ugalketa eragiten du. Fenomeno hori edozein organotan gerta daiteke eta bereziki kaltegarria izango da bizi-organoren batean gertatzen bada. Gainera, aipatu beharra dago minbiziaren arriskurik handiena metastasi-prozesua dela, gaixotasun horren ondoriozko heriotza-kausa nagusitzat hartzen baita. Horregatik, prozesu metastasikoa nola gertatzen den ikertzeak garrantzi handia dauka prozesu hau ekiditeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Metastasia, tumore zelulak beste organo eta ehun batzuetara hedatzean sortzen den prozesu bat da, gaixotasunaren hedapena eraginez. Fenomeno hori hainbat faktorek eragiten dute, besteak beste, kontrolik gabeko zelulen ugalketa eta tumore-zelulek matrizearen beharrik gabe ugaltzeko gaitasuna bereganatzea. Zelula osasuntsu gehienek azalera solido bat behar dute behar bezala hazi ahal izateko eta, horrelakorik ez dagoenean, apoptosi fenomeno bat gertatzen da. Gertakari hori defentsa-mekanismo bat da, zelulek organo batetik beste batera kontrolik gabe migratzea eragozten duena. Minbizi-zelulek matrize solidorik behar ez dutenez, defentsa-mekanismo hori saihestea lortzen dute. Horregatik, minbizi-zelula batzuk gai dira tumore primario lokalizatutik abiatuta hainbat leku kolonizatzeko (Becker et al., 2007). Tumore-zelulak, gainera, zirkulazio-sistematik irten eta beste ehunetan infiltratzeko gai dira. Horretarako, seinalizazio parakrinoa martxan jartzen dute eta metaloproteasa moduko entzimak sortzeko gaitasuna garatzen dute. Entzima horiek zelulaz kanpoko matrizea degradatzeko gai dira eta tumore-zelula ehun berrira sartzea ahalbidetzen dute (Massagué eta Obenauf, 2016).

Estatu Batuetako Minbiziaren Institutu Nazionalak adierazten duenez, beste organo eta ehun batzuen kolonizazioaren fenomenoa ez da ausaz gertatzen, minbizi mota bakoitzak organo espezifiko batera migratzen baitu. Gibela hainbat funtzio dituen bizi-organoa da, besteak beste, odolaren desintoxikazioa. Eginkizun hori bete ahal izateko, beharrezkoa da irrigazio handia izatea, odol bolumen handia igaro ahal izateko bertatik. Horren ondorioz, hainbat metastasik gibela kolonizatzeko joera dute; izan ere, zirkulazio-sistemaren bidez migratzen duten zelula metastasikoak gibeletik igaro beharko dira, eta gibelean ainguratuta gera daitezke (Van den Eynden et al., 2013).

Koloneko minbiziaren kasuan, gaixoen %50ak gibeleko metastasia garatzen du gaixotasunean zehar. Horrek lotura estua erakusten du koloneko minbiziaren eta gibeleko metastasiaren garapenaren artean, lehentasun metastatiko argia erakutsiz (Vatandoust et al., 2015).

Metastasi prozesuan tumore-zelula metastatikoek eta zelula endotelialek harreman estua ezartzen dute. Tumore-zelula metastatikoek, kolonizatuko duten organora iristean, seinale parakrinoak eta justakrinoak bidaltzen dituzte haien artean. Harreman horien ondorioz, aldaketak ezartzen dira faktore protumoralen adierazpenean (Maishi eta Hida, 2017).

Tumore zeluletan aztertutako aldaketetako bat proproteina konbertasetan gertatzen dena da. Molekula hauek lotura peptidikoak hidrolizatzeaz arduratzen diren entzima serina proteasak dira, horietako bakoitza ebaketa-puntu ezberdin baterako espezifikoa delarik (Bontemps et al., 2006). Batzuetan zelulak ez ditu proteinak bere egoera aktiboan sortzen, proproteina egoeran baizik eta aktibatzeko, dagokion konbertasak, polipeptidoaren C mutur terminala moztu beharko du. Hori da PC5 konbertasaren kasuan gertatzen dena, integrinen zenbait alfa-azpiunitaterekin elkarreraginean aritzen denean. Integrinak oso molekula garrantzitsuak dira migrazio zelularrean eta, ondorioz, baita metastasian ere. Horrek guztiak lotura zuzena erakusten du zelularen migrazio ahalmenaren eta konbertasen ekintzaren artean. Hala ere, hori ez da kasu bakarra. Izan ere, furina bezalako konbertasek metaloproteasen aktibazioan ere eragiten dute. Aipatu moduan, metaloproteasak zelulaz kanpoko matrizea degradatzeaz arduratzen diren entzimak dira. Beraz,

konbertasa horiek ere, tumore-zelulen infiltrazioa ahalbidetzen dute ehun berrietan (Khatib et al., 2002).

Metastasian, aipatutako funtzioa izateaz gain, konbertasek funtsezko eginkizuna dute tumore-prozesuen angiogenesian ere, migrazio zelularrari eragiten dioten faktoreak erregulatuz. Tumorea garatzea ahalbidetzen duten odol-hodiak sortzea ezinbesteko urratsa da tumorea sortzeko. Horren harira, furina moduko konbertasa batzuk, zenbait lotura peptidiko hautsiz, VEGF heldugabea heltzeko gai direla frogatu da (Siegfried et al., 2003). VEGF hazkuntza-faktorea da, zelula endotelialek odol-hodiak sortzea eragiten duena, hau da, angiogenesia sustatzen duena.

Konbertasek zelula mota desberdinetan duten inplikazioa sakon aztertu bada ere, ez dakigu nola adierazten diren prozesu metastasikoan gibel sinusoideko zelula endotelialen mailan.

Horregatik, lan honetan honako hipotesi hau planteatzen dugu: gibel sinusoideko zelula endotelialak koloneko tumore-zelula eta tumore-zelula amek jariatutako faktore disolbagarriekin kontaktuan jartzean, zelula endotelialen proproteina konbertasen adierazpenean aldaketak gertatuko dira

Lehen aipatutako hipotesi hori egiaztatzeko, honako helburu hauek bete nahi dira:

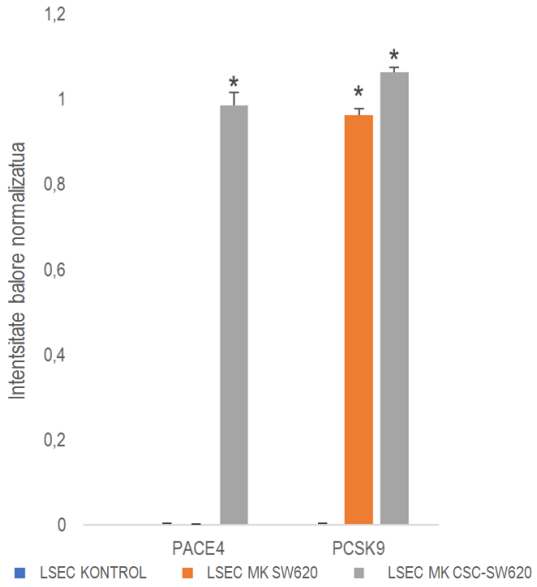
- *In vitro* eredu bat sortzea gibel sinusoideko zelula endotelialen portaera aztertzeko tumore-zelulen eta koloneko tumore-zelula ama metastatikoen eraginpean.
- Gibel sinusoideko zelula endotelialen mRNA erauztea, tumore-zelulek eta koloneko tumore-zelula ama metastatikoek jariatutako faktore disolbagarrien eraginpean.
- Gibel sinusoideko zelula endotelialetako proproteinen konbertasen transkripzioaren azterketa konparatiboa egitea, adierazitako baldintzetan.

3. Ikerketaren muina

Lehenik eta behin, aztertutako 3 zelula-lerroak hazi ziren: gibel sinusoideko zelula endotelialak (*liver sinusoidal endothelial cells*, LSEC), koloneko tumore-zelula metastasikoak (SW620) eta koloneko tumore-zelula metastasikoak (CSC-SW620). Gibeleko metastasiaren *in vitro* eredua egiteko, minbizi zelulekin baldintzatutako medioak lortu ziren. Medio hauek zelulak aberastu gabeko medioan 24 orduz haziz lortu ziren. Lortu ondoren, 24 orduz hazi ziren LSECak medio horiekin, eta zelulak bildu ziren mRNA erauzteko. Behin mRNA lortuta, alderantzizko transkripzioa burutu zen cDNA lortzeko.

Orduan, PCR arrunt bat egin zen, zeinetan *PACE4* eta *PCSK9* konbertasen adierazpenean gertatutako aldaketak aztertu ziren. Entzima horien adierazpen erlatiboa kalkulatzeko aktina erabili zen kontrol gisa. Elektroforesia egin ondoren, emaitzak Fiji bidez aztertu ziren 5 intentsitate-neurketa eginez, eta 1. irudiko grafikoa lortu zen. Grafiko horretan, 5 neurketen batezbestekoa irudikatu zen eta "*" ikurrak kontrolarekiko aldaketa estatistikoki adierazgarria zela esan nahi du.

1. irudia. Konbertasen adierazpen aldaketak LSECetan medio desberdinekin



Behatu zenez, *PACE4* eta *PCSK9* konbertasen arteko aldaketak esanguratsuak dira.

PACE4 konbertasa ez da adierazten LSEC kontroletan, ez eta SW620 baldintzatutako medioarekin tratatutakoetan ere. Aldiz, CSC-SW620en medio baldintzatuarekin tratatzen direnean, LSECek konbertasa hori adierazten dute. *PACE4* konbertasa honen adierazpena areagotuta egotea ez da batere arraroa, tumoreen agresibitatearen adierazlea baita.

Konbertasa honen jarduera nagusietako bat MMP-11 edo Str-3 gisako metaloproteasak heltzea da. Entzima horiek tumore prozesuetan agertzen dira behin eta berriz, zelulaz kanpoko matrizea degradatzeko gai baitira. Bere ekintzari esker tumore-zelulak mugitu egin daitezke, ehun berriak kolonizatu daitezkeelarik. Beraz, *PACE4*ren adierazpen altuaren arrazoia izan daiteke, *PACE4*ren adierazpena handituz gero, metaloproteasa helduen kopurua handitzen dela. Horrela, LSECek migratu eta angiogenesi prozesuan parte har lezakete, zelulaz kanpoko matrizea degradatuta egongo bailitzateke metaloproteasen ondorioz (Bassi et al., 2000).

Bestalde, PCSK9 konbertasa odoleko LDL kolesterolaren hartzailearen erregulazioaren arduraduna da. Konbertasa honek LDL kolesterolaren hartzailearengan eragiten du. Zelularen gainazalarekin garatzen duen loturaren bidez, LDL kolesterolaren hartzailea barneratzea eta degradatzea eragiten du, horrela odoleko LDL kolesterola handitzea eraginez, zelulek ezin baitute barneratu. Odoleko LDL kolesterol-maila altua metastasi hepatikoarekin lotu izan da (Sun et al. 2012).

LDL motako kolesterolaren eta metastasiaren arteko erlazioa, molekula honek, koloneko tumore-zeluletan aldaketa ugari eragitearekin lotuta dago. Horrela, seinaleztapen-bideak ugaritzen dira, hala nola MAPK, eta horrek zelula-zikloaren deserregulazioa eragiten du, kontrolik gabeko ugaritzea gertatzen da eta tumorearen eraketan eragiten du (Wang et al., 2017). Gainera, oxigenoaren espezie erreaktiboen (ROS) pilaketa areagotzea ere eragiten du koloneko kartzinometan. ROSek hantura prozesua eragiten dute, eta horrek tumorearen garapena errazten du. Azpimarratzekoa da, bereziki koloneko tumoreetatik eratorritako gibeleko metastasian, odoleko LDL kolesterol-maila handiak daudela (Wang et al., 2017).

Ikertutako LSECetan *PCSK9* adierazpen-mailak aztertuz gero, adierazpen hori nulua dela ikusten da, baina, aitzitik, LSECak SW620en ingurune baldintzatuarekin tratatzean, adierazpena agertzen da. *PCSK9*ren adierazpen-maila are gehiago handitzen da CSC-SW620en ingurune baldintzatuarekin tratatzean. Emaitza horiek bat datoz aurretik egindako ikerketa lanekin. Izan ere, koloneko tumore-zelulak gibel sinusoideko zelula epitelialekin kontaktuan jartzean, azken hauek *PCSK9*ren adierazpena handitzen dute, eta, beraz, odoleko LDL kolesterolaren mailak handitzen dira zeharka. LDL kolesterolaren handitze horrek aurretik aipatutako ondorioak izango ditu, eta tumorearen garapena erraztuko du.

4. Ondorioak

Lan honetan, erlazio zuzena ikusten da tumore-zelulen eta LSEC-en arteko interakzioaren eta konbertasen adierazpenaren aldaketaren artean. Tumore-zelulek (SW620 edo CSC-SW620) disolbagarriak diren faktoreak jariatzeak PACE4 eta PCSK9 entzimak aldatzea eragiten du.

Badirudi entzima horiek minbizia tratatzeko diana terapeutiko posible bat direla. Izan ere, hauek inhibituz gero, *a priori*, deserregulazio zelularraren prozesua geldiarazi liteke, edo minbiziaren agresibitatea murriztu, metaloproteasa helduen kopurua murriztuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lortutako ondorioez ziur egon ahal izateko, beharrezkoa da eremu horren inguruko ikerketekin jarraitzea. Izan ere, konbertasa horiek funtzio ugari dituztenez, hauen inhibizio osoak edo partzialak nahi gabeko ondorioak ekarri ahalko lituzke. Horregatik, beharrezkoa da mRNA mailako aldaketa horiek proteina mailan ere gertatzen diren aztertzea, bai eta bi entzima horien inhibitzaile espezifikoak garatzeko aukera dagoen ere. Horrela, ikerketa bide berri bat irekitzen da, non fokua ez da jartzen tumore-zelulen konbertasetan, baizik eta tumorearen mikroingurunean, gure kasuan, gibeleko zelula endotelialetan.

6. Erreferentziak

Bassi, D.E., Mahloggi, H., Klein-Szanto, A.J.P. (2000). The Proprotein Convertases Furin and PACE4 Play a Significant Role in Tumor Progression. *Mol. Carcinog*. 28: 63-69

Becker, W.M., Kleinsmith, L.J., Hardin, J. (2007). *El Mundo de la Célula*, 6. ed. Pearson Educación, Madril.

Bontemps, Y., Scamuffa, N., Calvo, F., Khatib, A.M. (2007). Potential Opportunity in the development of New Therapeutic Agents Based on Endogenous and Exogenous Inhibitors of the Proprotein Convertases. *Med. Res. Rev*. 27: 631–648

Folkman, J., Shing, Y. (1992). Angiogenesis. J. *Biol. Chem*. 267: 10931-10934.

Khatib, A.M., Siegfried, G., Chrétien, M., Metakros, P., Seidah, N.G. (2002). Proprotein Convertases in Tumor Progression and Malignancy. *Am. J. Pathol*. 160: 1921-1935

Maishi, N., Hida, K. (2017) Tumor Endotelial Cells Accelerate Tumor Metastasis. *Cancer Sci*. 108: 1921-1926

Massagu., J., Obenauf, A. (2016) Metastatic Colonization. *Nature* 529: 298-306

Posthaus, H., Dubois, C.M., Müller, E. (2002). Novel insights into cadherin processing by subtilisin-like convertases. *FEBS Lett* 536: 203-208

Scamuffa, N., Siegrfried, G., Bontemps, Y., Ma, L., Basak, A., Cherel, G., Calvo, F., Seidah, N.G., Khatib, A.M. (2008). Selective Inhibition of Proprotein Convertases Represses the Metastatic Potential of Human Colorectal Tumor Cells. J. Clin. Invest. 118: 352–363

Siegfried, G., Basak, A., Cromlish, J.A., Benjannet, S., Marcinkiewicz, J., Chrétien, M., Seidah, N.G., Khatib, A.M. (2003). The Secretory Proprotein Convertases Furin, PC5, and PC7 Activate VEGF-C to Induce Tumorigenesis. *J. Clin. Invest*. 111: 1723–1732

Sun, X., Essalmani, R., Day, R., Khatib, A., Seidah, N.G., Prat, A. (2012). Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Deficiency Reduces Melanoma Metastasis in Liver. *Neoplasia*. 14: 1122–1131

Van den Eynden, G.G., Majeed, A.W., Illeman, M., Vermeulen, P.B., Bird, N.C., Hoyer-Hansen, G., Eefsen, R.L., Reynolds, R., Brodt, P. (2013). The Multifaceted Role of the Microenvironment in Liver Metastasis: Biology and Clinical Implications. *Cancer Res*. 73: 2031–2043

Vatandoust, S., Price, T.J., Karapetis, C.S. (2015). Colorectal cancer: Metastases to a single organ. World *J. Gastroenterol*. 21: 11767-11776

Wang, C., Li, P., Xuan, J., Zhu, C., Liu, J., Shan, L., Du, Q., Ren, Y., Ye, J. (2017). Cholesterol Enhances Colorectal Cancer Progression via ROS Elevation and MAPK Signaling Pathway Activation. *Cell Physiol Biochem* 42: 729-742

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Euskal Herriko Unibertsitatea, Bordeleko Unibertsitatea eta Euskampus Fundazioaren arteko lankidetza eta laguntzari esker egin da.

EAEko emakumeek modu larrian ospitaleratzeko aukera handiagoa zuten zenbait bihotz-hodietako gaixotasunen kasuan 2016-2018 urteen artean

Labaka, A.[1], Zubeldia-Etxeberria, J.[1], Ugartemendia-Yerobi, M.[1] Elordi-Guenaga U.[1], Zinkunegi-Zubizarreta, N.[1], Pereda-Goikoetxea, B.[1]
[1]*Erizaintza II saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, UPV/EHU*
ainitze.labaca@ehu.eus

Laburpena

Badira hamarkada batzuk bihotz-hodietako gaixotasunak zituzten pertsonak artatzerakoan genero alborapena gertatzen zela salatu zenetik. Euskal Autonomia Erkidegoan (EAE), zenbait bihotz-hodietako gaixotasun pairatzerakoan emakumezko ala gizonezko izateak ospitaleratze larriak eta ez programatuak pairatzeko aukera handiagotzen duen aztertzea da helburua, atzerabegirako zeharkako azterketa bidez. Modu larrian eta ez programatuan ospitaleratzeko aukera handiagoa izan zuten EAEko emakumeek gizonekin alderatuta hipertentsioan, bularreko anginan, eroapen nahasmendu eta bihotzeko anginan, bihotz gutxiegitasunean eta aterosklerosian. Ikerketa honetan pazientearen sexuak ospitaleratze motan eragin dezakeela behatu da eta ondorioz, arrakala hau murrizteko hainbat lerro jorratzeko beharra ikusi da.

Hitz gakoak: bihotz-hodietako gaixotasunak, genero ezberdintasunak, ospitaleratzea.

Abstract

Gender bias when treating patients affected by cardiovascular diseases was firstly addressed some decades ago. The purpose of this cross-sectional retrospective study is to analyze whether being female or male increases the risk to result in unplanned and not planned hospital admission when suffering from some cardiovascular diseases in the Basque Autonomous Community (BAC). Women of BAC showed higher probabilities of unplanned hospital admissions when suffering from angina pectoris, conduction disorders and cardiac arrhythmias, heart failure, hypertensive diseases and atherosclerosis in comparison with men. Thus, we have found that patients' sex influences the type of hospital admission and we higlight the need to approach such gap in future studies.

Keywords: cardiovascular diseases, gender differences, hospital admission.

1. Sarrera eta motibazioa

Bernadine Patricia Healy doktoreak, National Institutes of Health-eko lehen emakumezko zuzendariak, 1991ean agerian utzi zuen emakumeek alborapena jasatzen zutela osasun-zerbitzuen aldetik bihotzeko gaixotasunak diagnostikatu eta tratatzeko garaian. Bere ikerketan, Healy doktoreak bihotz-hodietako gaixotasunen azterketak historikoki gizonen infartuen sintomatologian oinarritu zirela azaldu zuen, eta emakumeek sintomatologia desberdina zutenez, asko hiltzen zirela diagnostiko-akatsen ondorioz. Emakumeen ikusezintasun fenomeno hori Yentl sindrome modura izendatu zuen. Alborapen honek osasun-arretaren kalitatea eta eraginkortasuna murriztu ditzake, osasun-profesionalek ez baitute ahalegin diagnostiko eta terapeutiko bera egiten emakumeek beren iruditeria kliniko eta sozialarekin bat ez datorren sintomatologia agertzen dutenean (Healy, 1991).

Oraindik ere ikerketetan genero ikuspegia askotan txertatzen ez bada ere, epidemiologiak sexuaren arabera gaixotasun ezberdinak dituzten pertsonak nola artatzen diren adieraz diezaguke.

2. Arloko egoera, ikerketaren helburuak eta metodologia

2.1. Arloko egoera

Bihotz-hodietako gaixotasunak heriotza arrazoi nagusia dira mundu mailan, gizon zein emakumeentzat. Gertakari akutu modura azaldu aurretik (bihotzekoa, garun-hodietako istripua), modu progresiboan garatzen diren gaitzak barne hartzen ditu, hipertentsioa, bihotz-gutxiegitasun kronikoa eta aterosklerosia esaterako. Gaixotasun hauen garapen progresiboak berauek antzeman eta tratatzeko aukera eskaintzen digu esku-hartze planifikatuen bidez (Philips et al, 2004).

Badirudi ordea, oraindik ere genero bereizkeria ematen dela bihotz-hodietako gaixotasunak dituzten pertsonak artatzerakoan. Izan ere, hainbat autorek deskribatzen dute irizpide desberdinak jarraitzen direla gaixotasun koronarioarekin bat datozen sintomak dituzten adin ertaineko emakumeak bideratzerakoan (Arslanian-Engoren, 2001; Kuhn et al, 2017). Era berean, bihotzekoa pairatu duten emakumeei triajeko erizainek lehentasun gutxiago ematen dietela eta elektrokardiograma egin arteko denbora handiagoa dela aurkitu da (Kuhn et al., 2017). Aldiz, beste ikerketa batzuek ez dute genero-isuririk aurkitu bihotz hodietako gaixotasunen diagnostiko eta tratamenduan (Bösner et al., 2011; Nguyen et al, 2008; Van Der Meer et al., 2019). Geurera hurbilduz, badirudi EAEn ere badela genero arrakalarik, miokardioko infartu akutuaren maneiuan emakume gutxiagok jaso baitzuten tratamenduren bat (Telleria et al, 2017). Ez dugu aurkitu gainerako bihotz-hodietako gaixotasunen inguruko genero ezberdintasunak ikertu dituen lanik Euskadi mailan.

Zentzu horretan, datu epidemiologikoek genero arrakalarik ote den ikertzeko aztarnak eskaini diezazkigukete. Ospitaleratze programatuak lehen arreta mailatik bideratzen dira gehienetan, eta ebakuntza boluntarioak barne hartzen dituzte besteak beste. Zainketa programatua gurarizkoa eta prebentiboa izan ohi da beraz, eta osasun-kudeaketa eraginkorraren irizpidetzat har daiteke (Molloy et al, 2010). Ospitaleratze urgenteek, berriz, pertsonaren autozainketarako ezintasuna edo osasun-sistemak gaixotasuna garaiz antzemateko duen disfuntzioa adieraz dezakete (Gruneir et al, 2011; Stiernstedt, 2016). Garrantzitsua da hortaz ospitaleratze programatu eta larriak bereiztea osasun-zerbitzuen erabileran eragin dezaketen arrisku faktoreak ikertzerakoan (Dahlberg et al, 2018).

2.2. Helburua

EAEko biztanlerian, zenbait bihotz-hodietako gaixotasun pairatzerakoan emakumezko ala gizonezko izateak ospitaleratze larriak eta ez programatuak izateko aukera handiagotzen duen aztertzea.

2.3. Metodologia

Diseinua eta datu bilketa

Atzera begirako zeharkako azterketa burutu zen pazientearen sexuaren eta ospitaleratze egoeraren (larria edo programatua) arteko lotura aztertzeko. Eustat - Euskal Estatistika Erakundeak EAEn 2016-2018 bitartean erregistratutako ospitaleratze datuak eman zizkigun. Diagnostikoak Gaixotasunen Nazioarteko Sailkapenaren arabera zeuden banatuta (GNS-10), eta haietatik ondoko bihotz-hodietako gaixotasunen datuak aztertu ziren: hipertentsioa, bularreko angina eta eroapen nahasmendua, bihotzeko angina eta aterosklerosia.

Analisi estatistikoa

Erregresio logistiko binarioa erabili zen diagnostiko bakoitzean sexua eta ospitaleratze egoeraren arteko lotura aztertzeko. Dagozkien odds ratioak (OR) eta % 95eko konfiantza tarteak kalkulatu ziren, ospitalearen titulartasunaren eta pazientearen adinaren arabera doitu ondoren. OR-ak zera adierazten du: osasun- edo gaixotasun-egoera bat biztanleria-talde zehatz batean agertzeko aukera, beste talde batean agertzeko arriskuarekin alderatuta. Datuen esanguratsutasun maila $p < 0.05$ean finkatu zen. Analisiak SPSS© 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY) programaren bidez egin ziren.

Mendeko aldagaia: Ospitaleratze egoera honela sailkatu zen: a) programatua, pazientearen ospitaleratzea aldez aurretik planifikatuta zegoenean, eta b) larria, pazientea larrialdietako zerbitzuetara joandakoan edo beste zerbitzu batetatik modu urgentean bideratua izan zenean.

Aldagai askea: Sexua a) emakumezko edo b) gizonezko kategorietan sailkatu zen.

Koaldagaiak: Ospitaleen titulartasunak a) publikoa edo b) pribatua barne-hartzen zuen. Adina bost kategoriatan banatu zen: a) $\leq$ 14 urte, b) 15 – 44 urte, c) 45 – 64 urte, d) 65 – 84 urte eta e) $\geq$ 85 urte.

3. Ikerketaren muina

3.2. Emaitzak

EAEn 2016 eta 2018 urteen tartean hipertentsioa, bularreko angina, eroapen nahasmendua edo bihotzeko angina, bihotz gutxiegitasuna eta aterosklerosiagatiko ospitaleratze larri eta programatuen kasu kopuruak 1. taulan ikus daitezke.

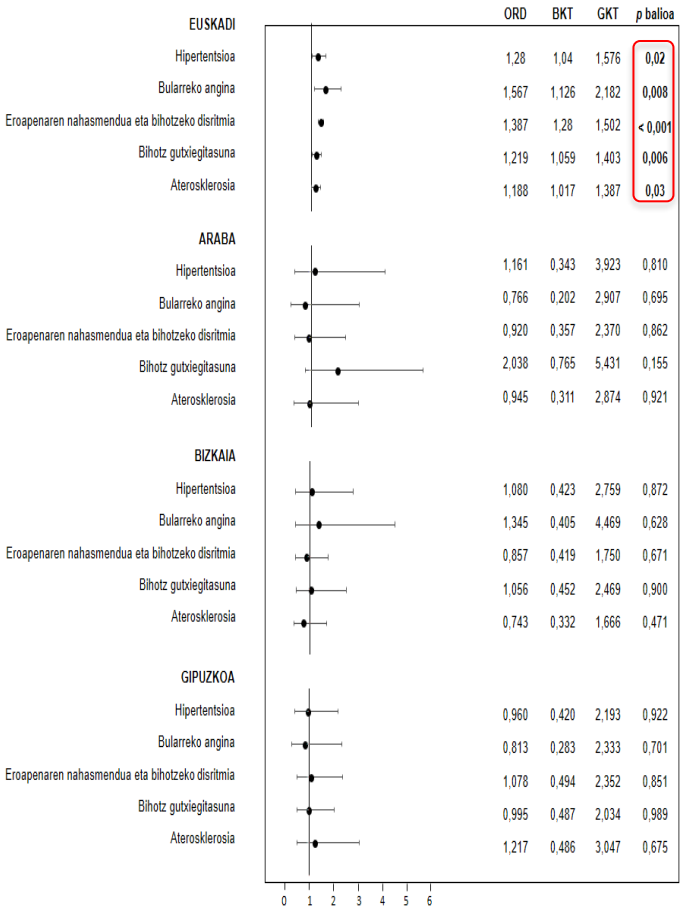
1. taula. EAEn 2016-2018 aldian erregistratutako ospitaleratze larri eta programatuak datu absolututan

	EAE		Araba		Bizkaia		Gipuzkoa	
Ospitaleratzeak	Larriak	Programatuak	Larriak	Programatuak	Larriak	Programatuak	Larriak	Programatuak
Hipertentsioa	156	84	34	17	65	28	57	39
Bularreko angina	116	55	23	14	45	17	48	24
Eroapen nahasmendua eta bihotzeko angina	201	127	51	27	78	55	72	45
Bihotz gutxiegitasuna	208	115	51	28	79	33	78	54
Aterosklerosia	120	111	30	26	49	48	41	37

Ospitalearen titulartasuna eta adina aldagaiak kontrolatuz lortutako odds ratio doituak (ORD) adierazi zuenez, modu larrian eta ez programatuan ospitaleratzeko aukera handiagoa izan zuten EAEko emakumeek gizonekin alderatuta hipertentsio [ORD 1.28 (95% CI 1.0-1.5), p>0.05], bularreko angina [ORD 1.56 (95% CI 1.1-2.1), p>0.01], eroapen nahasmendu eta bihotzeko angina [ORD 1.38 (95% CI 1.2-1.5), p>0.001], bihotz-gutxiegitasun [ORD 1.21 (95% CI 1.0-1.4), p>0.01] eta aterosklerosi kasuetan [ORD 1.18 (95% CI 1.0-1.3), p>0.05] (ikus 1. grafikoa).

Analisia EAEko probintzia bakoitzeko datuekin egiterakoan, berriz, ez zen ezberdintasun esanguratsurik aurkitu sexuaren arabera (ikus 1. irudia).

1. irudia. Emakumeek gizonekiko ospitaleratze larria eta ez-programatua izateko duten aukeren analisia.



Odds Ratio Doitua, ORD; Beheko Konfiantza-Tartea, BKT; Goiko Konfiantza-Tartea, GKT.

4. Ondorioak

Emaitzek adierazten dutenez, EAEko datu orokorrak kontuan hartuta, emakumezkoek modu larrian eta ez-programatuan ospitaleratzeko aukera gehiago dute gizonezkoekin alderatuta, hipertentsio, bularreko angina, eroapen nahasmendu eta bihotzeko disritmia, bihotz-gutxiegitasun eta aterosklerosi kasuetan. Bihotzeko arazoak dituzten pertsonen ezusteko ospitaleratzeetan eragin dezaketen faktoreak ikertzerakoan, orain arteko ikerketa gehienek pazienteek osasun-zerbitzuarekiko duten irisgarritasuna behatu dute. Esaterako, bihotz gutxiegitasuna duten pertsonek laguntza eskatzeko duten joera aztertzen duen meta-sintesi kualitatibo baten arabera, osasun-zerbitzuetara jotzeko mugak nabarmendu ziren, besteak beste, laguntza beharraren inguruko zalantzengatik (sintoma fluktuatzaileei lotuta), osasun-sistemaren baitan nora jo ez jakiteagatik, ospitaleekiko beldurragatik eta sintomak beste kausa batzuei egozteagatik (Clark et al., 2012). Beste ikerketa batzuk ere pazientearen autozainketa ohituretan (Schnell et al, 2006), ezagupenean (Agård et al, 2004) eta tratamenduarekiko atxikipenean (Scotto, 2005) zentratu dira. Haatik, badira ezusteko ospitaleratze larriak eragiten dituzten diagnostiko berantiarrak ulertzeko osasun profesionalen sinesmen eta jarrerak (Fuat eta Hungin, 2005; Fuat et al, 2003), eta esperientzia (Philips et al, 2004) aztertu duten lanak ere. Gure ikerketak berriz, sexuaren eragina aztertu du, eta emaitzek iradokitzen dutenez, gerturatze epidemiologiko hau egokia izan daiteke osasun-zerbitzuen erabileran ematen den genero arrakalaren adierazle moduan. Arrakala horren zergatia ezagutzeko ikerketa gehiago behar bada ere, arestian aipatutako ikerketen harira, baliteke emakumezko izatea osasun-zerbitzuetarako irisgarritasun txikiagoarekin lotuta egotea eta aldi berean osasun-profesionalek emakumezkoen sintomatologia sailkatzeko zailtasun handiagoa izatea. Kontuan izatekoa da, 2018ko Euskal Osasun Inkestaren arabera, azken 12 hilabeteetan zio ekonomikoengatik eta mugapenen edo urritasunengatik mediku-arreta jaso ez zuten pertsonen gehiengoa emakumezkoa zela.

Edonola ere, probintzia barneko emaitzek ez digute gizon eta emakumeen arteko OR balio handirik, ez eta ezberdintasun esanguratsurik erakutsi.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ezusteko ospitaleratzeak edo ospitaleratze larriak morbimortalitate handiagoarekin lotzen dira, osasun-sistemarentzat garestiagoak dira eta zainketen planifikazioa eteten dute (Huws et al., 2008). Hori dela eta, osasun beharrak egoera larritu aurretik kudeatzeko esfortzuak egin dituzte hainbat herrialdetan (Friberg et al., 2003; Hanlon et al., 2000; National Health Service (NHS), 2020; Steventon et al, 2018). Ingalaterran esaterako, erizaintzako kasuen kudeaketa indartu dute azken urteetan ospitaleratze larriak gutxitzeko asmoz (Huws et al., 2008). Euskadin, bihotzekoak artatzeko Bihotzez sareak miokardioko infartu akutua zuten emakumeetan erregistratutako atzerapen denborak eta hilgarritasun tasa gutxiarazi zituela aurkitu da (Telleria et al., 2017). Antzerako osasun-sare koordinatuek beste horrenbeste lor lezakete gainerako bihotz-hodietako gaixotasunei dagokienean ere. Ikerketa honetan behatu dugunez, pazientearen sexuak ospitaleratze motan eragin dezake. Ekitatea helburu, arrakala hau murrizteko hainbat lerro jorratzeko beharra dago: sexu-ezberdintasun biologikoak errespetatzen dituzten gida kliniko estandarizatuak erabiltzea, osasun-profesionalen genero-kontzientzia eta aurreiritziak lantzea, genero-gaiak erizaintza, medikuntza eta beste osasun zientzien ikasketetan jorratzea eta emakumezko eta gizonezko pazienteek osasun-zerbitzuak erabiltzerako izan ditzaketen irisgarritasun arazo eta erresistentziak aztertzea.

6. Erreferentziak

Agård, A., Hermeren, G., eta Herlitz, J. (2004). When is a patient with heart failure adequately informed? A study of patients' knowledge of and attitudes toward medical information. Heart Lung, 33, 219–226. https://doi.org/10.1016/j.hrtlng.2004.02.003

Arslanian-Engoren, C. (2001). Gender and Age Differences in Nurses' Triage Decisions Using Vignette Patients. Nursing Research, 50, 61–66.

Bösner, S., Haasenritter, J., Hani, M. A., Keller, H., Sönnichsen, A. C., Karatolios, K., … Donner-Banzhoff, N. (2011). Gender bias revisited: New insights on the differential management of chest pain. BMC Family Practice, 12. https://doi.org/10.1186/1471-2296-12-45

Clark, A. M., Savard, L. A., Spaling, M. A., Heath, S., Duncan, A. S., eta Spiers, J. A. (2012). Understanding help-seeking decisions in people with heart failure: A qualitative systematic review. International Journal of Nursing Studies, 49(12), 1582–1597. https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2012.05.010

Dahlberg, L., Agahi, N., Schön, P., eta Lennartsson, C. (2018). Planned and Unplanned Hospital Admissions and Their Relationship with Social Factors: Findings from a National, Prospective Study of People Aged 76 Years or Older. Health Services Research, 53(6), 4248–4267. https://doi.org/10.1111/1475-6773.13001

EAEko Osasun Inkesta (EAEOI, 2018). Osagin. Osasun Saila, Eusko Jaurlaritza. https://www.euskadi.eus/informazioa/osasun-inkesta-2017-2018/web01-a3osag17/eu/

Friberg, J., Buch, P., Scharling, H., Gadsbøll, N., eta Jensen, G. (2003). Rising rates of hospital admissions for atrial fibrillation. Epidemiology, 14(6), 666–672. https://doi.org/10.1097/01.ede.0000091649.26364.c0

Fuat, A., Hungin, A., eta Murphy, J. (2003). Barriers to accurate diagnosis and effective management of heart failure in primary care: qualitative study. BMJ, 326, 196.

Gruneir, A., Silver, M., eta Rochon, P. (2011). Review: Emergency Department Use by Older Adults: A Literature Review on Trends, Appropriateness, and Consequences of Unmet Health Care Needs. Medical Care Research and Review, 68(2), 131–155. https://doi.org/10.1177/1077558710379422

Hanlon, P., Walsh, D., Whyte, B., Scott, S., Hole, D., Lightbody, P., eta Gilhooly, M. (2000). Influence of biological, behavioural, health service and social risk factors on the trend towards more frequent. Health Bulletin, 58(4), 342–353.

Healy, B. (1991). The Yentl Syndrome. NEJM, 325(4), 2435. https://doi.org/10.1056/NEJM199107253250408

Huws, D. W., Cashmore, D., Newcombe, R. G., Roberts, C., Vincent, J., eta Elwyn, G. (2008). Impact of case management by advanced practice nurses in primary care on unplanned hospital admissions: A controlled intervention study. BMC Health Services Research, 8, 1–7. https://doi.org/10.1186/1472-6963-8-115

Kuhn, L., Page, K., Street, M., Rolley, J., eta Considine, J. (2017). Effect of gender on evidence-based practice for Australian patients with acute coronary syndrome: A retrospective multi-site study. Australas Emerg Nurs J, 20(2), 63–68. https://doi.org/10.1016/j.aenj.2017.02.002

Molloy, G. J., McGee, H. M., O'Neill, D., eta Conroy, R. M. (2010). Loneliness and Emergency and Planned Hospitalizations in a Community Sample of Older Adults. Journaloftheamerican Geriatrics Society, 58(8), 1538–41. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2010.02960.x

National Health Service (NHS) in England. (2020): A&E Attendances and Emergency Admissions 2020-21, eskuragarri hemen: https://www.england.nhs.uk/statistics/statistical-work-areas/ae-waiting-times-and-activity/ae-attendances-and-emergency-admissions-2020-21/ [Kontsulta eguna: 2021/03/05].

Nguyen, J. T., Berger, A. K., Duval, S., eta Luepker, R. V. (2008). Gender disparity in cardiac procedures and medication use for acute myocardial infarction. American Heart Journal, 155(5), 862–868. https://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.11.036

Philips, S., Marton, R., eta Tofler, G. (2004). Barriers to diagnosing and managing heart failure in primary care. Med J Aust, 181, 78–81. https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2004.tb06178.x

Schnell, K., Naimark, B., eta McClement, S. (2006). Influential factors for self-care in ambulatory care heart failure patients: a qualitative perspective. Can J Cardiovasc Nurs., 16(1), 13–19.

Scotto, C. (2005). The lived experience of adherence for patients with heart failure. J Cardiopulm Rehabil, 25, 158–163. https://doi.org/10.1097/00008483-200505000-00006

Steventon, A., Deeny, S., Friebel, R., Gardner, T., eta Thorlby, R. (2018): Briefing: Emergency hospital admissions in England: which may be avoidable and how?, The Health Foundation [On-line], eskuragarri hemen:https://www.health.org.uk/sites/default/files/Briefing_Emergency%2520admissions_web_final.pdf. [Kontsulta eguna: 2021/03/05].

Stiernstedt, G. (2016): Effektiv vård [Efficient care]. SOU2016:2. Government Offices of Sweden, Stockholm.

Telleria, M., Loma, A., Artaecheverria, J., San Roman, K.G., Rumoroso, J.R., Andres, A., Oria, C., Vazquez, P., Oria, C. (2017). Miokardioko infartu akutuen maneiua Euskal Autonomia Erkidegoan (EAE) sexuaren arabera, Bihotzez sarearen eragina. Osagaiz, 1, 16-25.

Van Der Meer, M. G., Appelman, Y., Rutten, K. H. G., Van Der Graaf, Y., Nathoe, H. M., Doevendans, P. A., … Rutten, F. H. (2019). Are there gender disparities in symptom presentation or triage of patients with chest discomfort at primary care out-of-hours services? An observational study. BMJ Open, 9(11). https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-031613

Telleria, M., Loma, A., Artaecheverria, J., San Roman, K.G., Rumoroso, J.R., Andres, A., Oria, C., Vazquez, P., Oria, C. (2017). Miokardioko infartu akutuen maneiua Euskal Autonomia Erkidegoan (EAE) sexuaren arabera, Bihotzez sarearen eragina. Osagaiz, 1, 16-25.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiogu Eustat Euskal Estatistika Erakundeari datu epidemiologikoak emateagatik, eta bereziki Marta De la Torre Fernandez teknikariari, bere profesionaltasun eta eraginkortasunagatik.

CB1 hartzaile kanabinoidearen azalpena saguaren garuneko zelula oligodendroglialetan

Manterola, A.[(1)], Bernal-Chico, A.[(1,2,3,4)], Mato, S.[(1,2,3,4)]

[(1)]Neurozientziak Saila Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU), [(2)]Achucarro Basque Center for Neuroscience, [(3)]Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), [(4)]Biocruces Bizkaia.
ana.bernal@ehu.eus

Laburpena

Esklerosi anizkoitza (EA) oligodendrozitoen (OL) heriotzarekin eta neuronen endekapenarekin erlazionatutako hanturazko lesioak azaltzen dituen erdiko nerbio-sistemaren gaixotasuna da. Neuroendekapenezko gaixotasun honek gazteen artean desgaitasun neurologikoak sortzen ditu. OLen zelula aitzindariek (OPC) OL heldu mielinizatzaileetan bihurtzeko ahalmena dute, sintomatologia arinduz. OPCen diferentziazioa eta mielinaren birsortzea estrategia terapeutiko garrantzitsua da EAren arloan. Ildo horretan, endokanabinoide sistemaren erabilerak onura ugari aurkezten ditu OL eta OPCetan. Zelula oligodendroglialetan CB1 hartzailearen aktibazioak potentzial terapeutikoa erakutsi duen arren, proteina horren adierazpena ez da oraindik *in situ* deskribatu.

Hitz gakoak: oligodendrozitoak, mielina, CB1 hartzailea, esklerosi anizkoitza

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system where focal lesions lead to neuronal damage. This neurodegenerative disorder induces disabilities in young adults. It is well stablished that the ability of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) to differentiate into myelinating oligodendrocytes (OLs) alleviates the symptomatology. OPC maturation and remyelination are key therapeutic strategies in MS. In this sense, manipulation of the endocannabinoid system in OLs and OPCs seems promising. Although CB1 receptor activation in oligodendroglial cells shows therapeutic potential, reliable demonstration of the presence of the receptor in these cell lineage in situ *remains elusive.*

Keywords: oligodendrocytes, myelin, CB1 receptor, multiple sclerosis

1. Sarrera eta motibazioa

Oligodendrozitoak (OLak) erdiko nerbio sisteman (ENS) mielina sortzeaz arduratzen diren glia zelula dira. Mielina nerbio zelulen axoiak estaltzen dituen izaera koipetsuko mintz zelularra da eta ezinbestekoa da nerbio bulkaden garraioa era egokian gerta dadin. Horrez gain, mielinak sostengu metabolikoa ere eskaintzen die axoiei (Nave eta Werner, 2014). Zelula oligodendroglialak zelula aitzindari neural multipotenteetatik sortzen dira garapen enbrionarioaren azken faseetan, seinale espezifikoak jaso eta oligodendrozitoen transkripzio faktore 2-a (Olig-2) adierazten hasten direnean. Hasierako desberdintzapen fase horretan, zelula horiek oligodendrozitoen zelula aitzindari (OPC ingelesetik) izena hartzen dute (Naruse et al., 2017). OPC hauek markatzaile bereizgarriak adierazten dituzte, horien artean neurona-glia antigeno 2 izeneko proteoglikanoa (NG2) hain zuzen ere (Richardson et al., 2011). OPCak aitzindariak diren heinean, ez dute mielinarik sortzeko gaitasunik. OL heldu mielinizatzaile gehiengoak jaio eta ondorengo lehen etapetan (saguetan lehen 10 aste inguruetan, gizakietan berriz, lehen 5-10 urteetan) sortzen dira OPCetatik. Hala ere, garun helduetan hainbat zelulek OPC izaten jarraitzen dute (Simons eta Nave, 2015), aktibitate neuronalean gertatzen diren aldaketen aurrean OLetan bihurtu eta mielina sortzeko gaitasuna erakusten dutelarik. OL heldu hauek mielina sortzeko ezinbestekoak diren proteinak adierazten dituzte, horien artean mielinaren proteina proteolipidoa (PLP) eta mielinaren oinarrizko proteina (MBP).

Esklerosi anizkoitza (EA) lehen aldiz Jean-Martin Charcotek deskribatu zuen 1868-an eta desmielinizazio fokuak sortzen dituen ENSko hanturazko gaixotasun kronikoa da. EA pertsona heldu gazteei eragiten dien gaixotasun ezgaitzaile neurologikorik ohikoena da, eta 2,3 milioi

pertsonek jasaten dute gaixotasun hau munduan. Desmielinizazioa, hantura eta endekapen neuronal/axonala dira patologia honen ezaugarririk nagusienak (Compston eta Coles, 2008). OLak kaltetzen edo hiltzen direnean, axoiak inguratzen duen mielina zorroa desagertzen da transmisio sinaptikoa kaltetuz, sintomak eraginez. Sintomen artean giharren espastizitatea, neuritis optikoa, ataxia sentsotiala eta oreka eta mugimenduen koordinazioaren galera ohikoa denez, maiz gaixoek baliaezintasuna pairatzen dute (Dobson eta Giovannoni, 2019). Lesio gehienek kronikoki desmielinizatuta jarraitzen duten arren, kasu batzuetan mielinaren ´konponketa´ espontaneo bat gertzen da (Chang et al., 2012). Birmielinizazioa erantzun fisiologiko gisa ulertu eta mielinaren berreskuratzea eragiten duen prozesu birsortzaile bezela deskribatzen da. Prozesu hau OPC-ak errekrutatu eta OL heldu mielinizatzaileetan desberdintzeko gaitasunari esker gertatzen da (Franklin eta Ffrench-Constant, 2017; Kremer et al., 2018). Birmielinizazio honek sintomen hobekuntzarekin erlazionatuta dagoen heinean, prozesu hau itu terapeutiko nagusia da gaur egun.

Endokanabinoide-sistema (EKS) garuneko hainbat funtzio doitzen dituen sistema neuromodulatzailea da (Katona eta Freund, 2012). EKSk EAren sintomatologia murrizteko potentziala duela frogatu dute urteetan zehar eginiko ikerketek (Kmietowicz 2010). Jakina da marihuana landarean (*Cannabis sativa L.*) aurkitzen diren agonista kanabinoideek EAren animalia ereduetan sintomak kontrolatzeko ahalmena dutela, babes neuronala, hanturaren aurkako eraginak eta birsortze mekanismoak eskaintzen dituztelarik (Arévalo-Martín et al. 2003; Cabranes et al. 2005; Maresz et al. 2007; Palazuelos et al. 2008). Eragin onuragarri hauek neuronetako CB1 hartzaileen eta batik bat zelula hematopoietikoetan adierazten diren CB2 hartzaileen aktibaziori esker ematen dira (Pryce et al. 2003; Maresz et al. 2007; Croxford et al. 2008; Eljaschewitsch et al. 2006).

OLek CB1 hartzailea adierazten dutela dioen ideiak indarra hartu du zelula bakarren sekuentziazioa burutu duen lan bati esker. Lan horretan OPC-etatik hasi eta OL helduetaraino, oligodendroglia leinuko ia populazio guztiek *Cnr1* transkritoak adierazten dituztela frogatzen da (Marques et al., 2016). Horrez gain, gizakien garuneko gai zuri subkortikaleko OPC A2B5^{+}etan ere aurkitu dira *Cnr1* transkritoak (Sim et al., 2006). Hartzaileaz gain, oligodendroglia zelulek 2-AG endokanabinoidea sintetizatu eta hidrolisatzeko behar diren entzimak (*Daglb* eta *Mgll*) ere adierazten dituzte. Hainbat *in vitro* lanetan oligodendroglia zelulek, 2-AG-a sortu eta beraien mintzeko CB1 hartzaileak aktibatuz, kontrol autokrinoa burutu dezaketela iradokitzen du, bai OPCen diferentziazioa eraginez edo OLak heriotza exzitotoxikotik babestuz (Gomez et al., 2010; Bernal-Chico et al., 2015; Gomez et al., 2015). Horrez gain, OPC-ek sortutako 2-AG-ak, mintzean dituzten CB1 hartzaileen aktibazioaren bitartez, zelula hauen migrazioa bultzatzen duela ikusi da (Sanchez-Rodriguez et al., 2018). Bestalde, CB1 hartzailea aktibatzen duen THCaren administrazioak OPCen diferentziazioa bultzatzen du mielinizazioa bultzatuz saguetan (Huerga-Gomez et al., 2021).

Beraz, *in vitro* zein *in vivo* eginiko aurkikuntza guzti horiek hainbat gauza iradokitzen dituzte: alde batetik, zelula oligodendroglialetan adierazitako CB1 hartzaileek mielinizazio prozesuan zereginen bat izan dezaketela; eta bestetik, hartzaile populazio horiek EA-ren testuinguruan kanabinoideek dituzten onuren bitartekari izan daitezkeela. Hala ere, zelula oligodendroglialetan CB1 hartzaileen adierazpena era fidagarrian frogatzen duten datuen faltak asko mugatu du horien funtzio biologikoa ulertzea itu terapeutiko gisa erabili ahal izateko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aurkikuntza horietan oinarrituta, konposatu kanabinoideen efektu onuragarriak, neurri batean bada ere, OLetako CB1 hartzaileen aktibazioarekin erlazionatuta egon daitezkeela uste da. Hala ere, proteina hauek zelula hauetan duten adierazpen maila baxuaren ondorioz, oso zaila izan da CB1 hartzaileek oligodendrozito leinuko zeluletan duten kokapena aztertzea. Gaur egun, oligodendroglia *in situ* CB1 hartzailea adierazten dutela frogatzen duten datu fidagarriak falta dira eta hartzaile populazio hauek mielinaren biologian izan dezaketen betebeharra eztabaidazko gaia da.

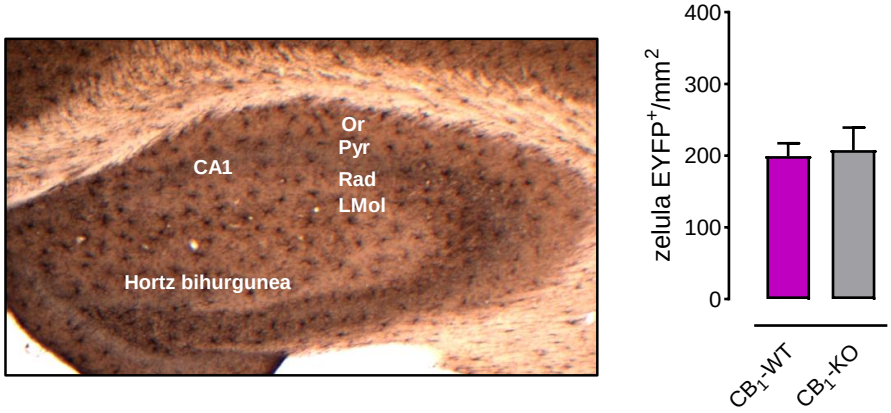
Testuinguru honetan, lan honen helburua sagu helduen garuneko OPCen eta OL helduetan CB_1 hartzaileen lokalizazio ultraegiturala aztertzea da.

3. Ikerketaren muina

3.1 CB1 hartzaileen lokalizazio ultraegiturala oligodendrozitoen zelula aitzindarietan

OPCetan CB1 hartzaileen lokalizazioa aztertu ahal izateko mikroskopio elektroniko (ME) bidez ikusgarria den markaketa bikoitza erabili genuen: alde batetik, immunoperoxidasa, eta bestetik, zilarrez anplifikatutako urrezko partikulen tindaketak hain zuzen ere. OPCak era egokian identifikatu ahal izateko, NG2 proteina kodifikatzen duen genearen promotorearen menpe proteina hori fluoreszentea (NG2-EYFP) adierazten duten sagu transgenikoak erabili genituen (Karram et al., 2008). Sagu hauen karakterizazioaren arabera, EYFPa adierazten duten zelula gehienek Olig2 eta Sox10 transkripzio faktore oligodendroglialak ere adierazten dituzte. Gainera, ez dituzte inondik inora OL helduen markatzaileak adierazten. NG2-EYFParentzat heterozigotoak ziren saguak $CB1^{+/-}$ saguekin gurutzatu genituen, NG2-$EYFP^{+/-}$-$CB1^{+/+}$ (OPCetan proteina hori fluoreszentea eta CB1 hartzailea adierazten dituzten saguak) eta NG2-$EYFP^{+/-}$-$CB1^{-/-}$ (OPCetan proteina hori fluoreszentea baina CB1 hartzailea adierazten ez dituzten saguak) mutante bikoitzak lortuz. Animalia hauetan, OPCak EYFP proteinaren aurkako immunomarkaketak eragindako DAB metaketari esker identifikatu ziren (1. irudia). CB1 hartzaileak, berriz, zilarrez anplifikatutako urrezko partikulen presentzia bitartez (2. irudia A).

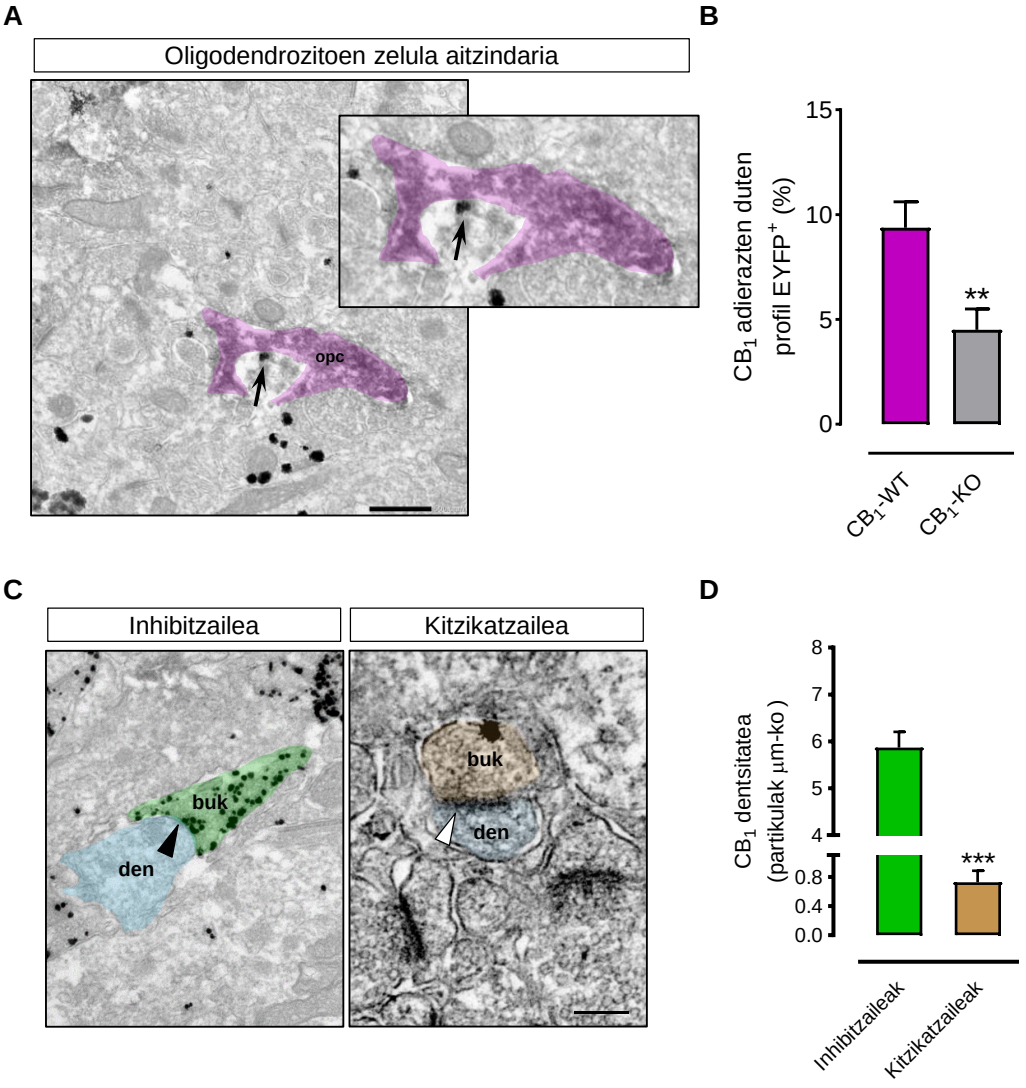
1. irudia. NG2-$EYFP^{+/-}$-$CB1^{-/-}$ saguen hipokanpoan oligodendrozitoen zelula aitzindarien dentsitatearen azterketa.



NG2-$EYFP^{+/-}$-$CB1^{+/+}$ saguen hipokanpoan CB1 hartzaileen markaketa lehendabizi argi-mikroskopio bitartez egiaztatu zen. Aldez aurretiko deskribapen lanekin bat eginez (Hájos et al., 2000; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017), haritsu itxurako markaketa esanguratsua hauteman genuen hipokanpoko CA1 eta CA3an, batik bat hortz bihurgunean, geruza piramidalean eta stratum radiatumean. NG2-$EYFP^{+/-}$-$CB1^{-/-}$ saguen hipokanpoan markaketa ikusezina zela egiaztatzean, seinalea espezifikoa zela frogatu ahal izan genuen. Bestalde, NG2-$EYFP^{+/-}$-$CB1^{+/+}$ animalia transgenikoetan, DAB seinaleak NG2 zelulen distribuzio uniforme eta ezaguna jarraitzen zuela frogatu genuen (Karram et al., 2008). Azkenik, DABarentzat positibo ziren zelulen kopuruari dagokionez, NG2-$EYFP^{+/-}$-$CB1^{-/-}$ eta NG2-$EYFP^{+/-}$-$CB1^{+/+}$ saguen artean desberdintasunik ez zegoela egiaztatu genuen (1. irudia). Honen bitartez, gure transgenikoaren baliotasuna frogatu genuen, aztertu nahi genituen zelulen dentsitatean aldaketarik ez zeudelako.

Ultraegitura mailako azterketa egitean, NG2-EYFP$^{+/-}$-CB1$^{+/+}$ saguen stratum radiatumean, dendritekin sinapsia egiten duten bukaera inhibitorioek CB1 hartzailea markatzen zuten partikula ugari erakusten zituztela ikusi genuen (Hájos et al., 2000; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017) (2. irudia C). Espero bezala, beraien morfologia bereizgarriagatik identifikatutako sinapsi kitzikatzaileetan askoz partikula gutxiago antzeman genituen (2. irudia C). Berriro ere, NG2-EYFP$^{+/-}$-CB1$^{-/-}$ saguen garun ehunean CB1 hartzaileen markaketa desagertu egiten zela egiaztatu genuen, ibilitako antigorputza espezifikoa zela frogatuz.

2. irudia. CB1 hartzaileen lokalizazioa saguen hipokanpoko oligodendrozitoen zelula aitzindarietan.



MEko irudietan, OPCak eta beraien prozesuak DAB markaketari esker identifikatuak izan ziren (2. irudia A). NG2-EYFP$^{+/-}$-CB1$^{+/+}$ saguetan, zelula horien %9,4 ± %0,7ak mintz zitoplasmatikoan zilar partikularen bat adierazten zutela ikusi genuen (2. irudia B). NG2-EYFP$^{+/-}$-CB1$^{-/-}$ saguen kasuan berriz soilik OPCen %4,5 ± %0,57ak azaltzen zuten zilar partikularen bat (**$p < 0.01$; 2. irudia B). Bi genotipoen arteko alderaketak, hipokanpoko stratum radiatumeko NG2 zelulen %6 inguruk CB1 hartzailea adierazten dutela erakusten du. DABarentzat positiboak ziren profiletan, zilar partikulen dentsitatea 0,2 partikula/µmkoa dela

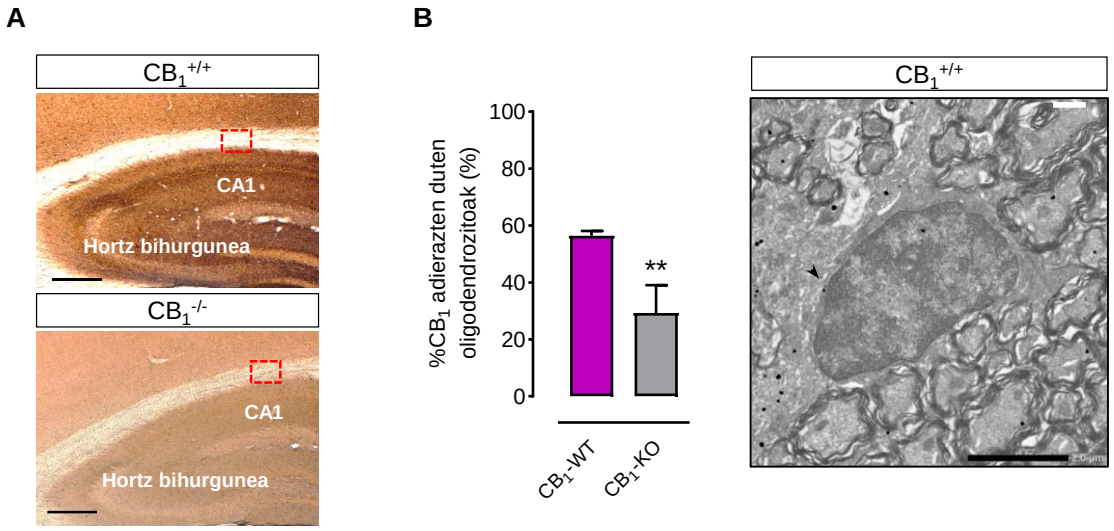
kalkulatu genuen. Era berean, garun azalera berdinean, sinapsietako CB1 hartzaileen dentsitateak ere kalkulatu genituen. Emaitzen arabera, OPCek sinapsi kitzikatzaileek baino dentsitate baxuagoa erakusten dute, eta sinapsi kitzikatzaileek inhibitzaileek baino dentsitate baxuagoa ere (**p < 0.01 eta ***p < 0.001 hurrenez hurren) (2. irudia D). Guztira, emaitza hauek sagu helduen hipokanpoko OPCek CB1 hartzailea maila oso baxuan adierazten dutela iradokitzen dute.

3.2 CB1 hartzaileen lokalizazio ultraegiturala oligodendrozito mielinizatzaileetan

OL heldu mielinizatzaileetan CB1 hartzaileen lokalizazio ultraegiturala aztertu ahal izateko, zilarrez anplifikatutako urrezko partikuletan oinarritutako markaketa metodoa aplikatu genien sagu basati ($CB1^{+/+}$) eta CB1 hartzailea adierazten ez zuten saguen ($CB1^{-/-}$) garun ehunei. NG2-$EYFP^{+/-}$-$CB1^{+/+}$ saguekin gertatzen zenaren antzera, CB1 hartzailearen markaketa tipikoa bereizi genuen $CB1^{+/+}$ animalien hipokanpoan (3. irudia A). Berriro ere, $CB1^{-/-}$ saguen ehunean markaketa desagertu egiten zela frogatu genuen, erabilitako antigorputzaren espezifikotasuna beste behin frogatuz (3. irudia A).

CB1 hartzailearen immuno-markaketa argi mikroskopio bitartez egiaztatu ondoren, ME bidez aztertu nahieko gai zuri eremua aukeratu eta ebaketa ultrafinak egin ziren (3. irudia A). OL heldu mielinizatzaileak beraien morfologia eta ezaugarri bereizgarrietan oinarrituta identifikatu ziren, inolako immuno-markaketarik gabe. Ezaugarri horien artean nukleo elektrodentsoa edo nukleoa inguratzen duen zitoplasma fina aurkitzen dira. Zelula horietan CB1 hartzaileak zilarrez intentsifikatutako urre partikulen bidez identifikatu ziren. $CB1^{+/+}$ saguetan, OL helduen %56,4 ± %0,9ak somaren mintz zitoplasmatikoan zilar partikularen bat adierazten zutela ikusi genuen (3. irudia B). $CB1^{-/-}$ saguen kasuan, aldiz, zelula horien %29,3 ± %5,7ak erakusten zuten CB1 hartzailearen kontrako markaketa positiboa (**p < 0,01). Bi genotipoen arteko alderaketak sagu helduen gorputz kailukarako OL mielinizatzaileen %27 inguruk CB1 hartzailea adierazten dutela erakusten du (3. irudia B).

3. irudia. CB1 hartzaileen adierazpena sagu helduen garuneko oligodendrozito mielinizatzaileetan.



4. Ondorioak

Lan honetan endokanabinoideen arloan orain arte erantzun gabeko galdera baten inguruan egin dugu lan, oligodendroglia zeluletako CB1 hartzaileen lokalizazio anatomikoari dagokiona hain zuzen ere.

Azken bi hamarkadetan, immunohistokimia analisi konbentzionalak, ME eta teknika elektrofisiologikoak erabiliz, CB1 hartzaileen lokalizazio zelular eta subzelularra sakonki aztertu da (Katona eta Freund, 2012). Ikerketa hauek garunean CB1 hartzaileak era heterogeneoan adierazten direla erakutsi dute, hipokanpoko sinapsi inhibitorioetako proportzio eta dentsitatea kitzikatzailetakoa baino altuagoa izanik (Katona et al., 2006; Kawamura et al., 2006). Berriki, CB1 hartzailea zelula mota espezifikoetan adierazten ez duten animaliak sortu izanak, CB1 hartzailea dentsitate baxuan adierazten duten zelula eta konpartimentu zelularretan proteina honen lokalizazioa deskribatzea ahalbidetu du, besteak beste bukaera sinaptiko glutamatergikoetan (Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017) eta astrozitoetan (Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018; Han et al., 2012). Aldi berean, tresna genetikoak eta MEko lanak konbinatuz, mitokondriek beraien mintzetan CB1 hartzailea adierazten dutela ere ikusi da (Hebert-Chatelain et al., 2016). Zelula oligodendroglialei dagokionez, OPC eta OLetako CB1 hartzaileen adierazpen funtzionala ondo aztertu da urteetan zehar (Bernal-Chico et al., 2015; Gomez et al., 2015; Mato et al., 2009; Molina-Holgado et al., 2002). Hala ere, immunohistokimia analisi arrunten bitartez ez da posible izan saguen garuneko zelula hauek CB1 hartzailea adierazten dutela era fidagarrian frogatzea. Hori horrela izanda, ikerketa lan honetan bereizmen altuko MEko teknikak erabili ditugu sagu helduen garuneko OPC eta OL mielinizatzaileek CB1 hartzailea adierazten duten aztertzeko. Beraz, ME eta sortu berri diren sagu transgenikoak erabiliz, hipokanpoko OPCek eta gorputz kailukarako OLek, *in situ*, CB1 hartzaileen dentsitate baxuak adierazten dituztela egiaztatu dugu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Zelula oligodendroglialetan CB1 hartzaileen adierazpena erakutsi ondoren, hartzaile honek zelula horietan duen garrantzia eta funtzioa aztertu nahi dugu, bai egoera basalean zein EA bezalako testuinguru patologikoetan ere. Horrela, birmielinizazioa bultzatzeko gaitasuna duten farmakoak diseinatu daitezke bestelako efektu ez desiragarriak ekidituz, neuronen CB1 hartzaileen aktibazioak eragindakoak, esaterako. Hau forgatzeko, OL helduetan edo OPCetan CB1 hartzaileak adierazten ez dituzten animaliak erabiliko ditugu EAren animalia eredu batean, sagu basatiek aurkezten dituzten sintoma eta ezaugarri patologikoekin alderatzeko nahian. Potentzial terapeutikoa aurkitzekotan, etorkizunean zelula espezifikoetan oinarritutako terapiak garatu ahal izango dira EA tratatzeko.

6. Erreferentziak

Árevalo-Martín, A. (2003), Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis, *J Neurosci*, 23, 2511-6.

Bernal-Chico, A. (2015), Blockade of monoacylglycerol lipase inhibits oligodendrocyte excitotoxicity and prevents demyelination in vivo, *Glia*, 63, 163-76.

Cabranes, A. (2005), Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis, *Neurobiol Dis*, 20, 207-17.

Chang, A. (2012), Cortical remyelination: a new target for repair therapies in multiple sclerosis, *Ann Neurol*, 72, 918-26.

Compston, A, eta Coles, A. (2008), Multiple sclerosis, *Lancet*, 372, 1502-17.

Croxford, JL. (2008), Cannabinoid-mediated neuroprotection, not immunosuppression, may be more relevant to multiple sclerosis, *J Neuroimmunol*, 193, 120-9.

Dobson, R, eta Giovannoni, G. (2019), Multiple sclerosis - a review, *Eur J Neurol*, 26(1), 27-40.

Eljaschewitsch, E. (2006), The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells, *Neuron*, 49, 67-79.

Franklin, RJM. eta Ffrench-Constant, C. (2017), Regenerating CNS myelin - from mechanisms to experimental medicines, *Nat Rev Neurosci*, 18, 753-69.

Gomez, O. (2010), The constitutive production of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol participates in oligodendrocyte differentiation, *Glia*, 58, 1913-27.

--------, (2015), A Basal Tone of 2-Arachidonoylglycerol Contributes to Early Oligodendrocyte Progenitor Proliferation by Activating Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/AKT and the Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) Pathways, *J Neuroimmune Pharmacol*, 10, 309-17.

Gutiérrez-Rodríguez, A. (2017), Anatomical characterization of the cannabinoid CB1 receptor in cell-type-specific mutant mouse rescue models, *J Comp Neurol*, 525, 302-18.

----------, (2018), Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus, *Glia*, 525, 1417-31.

Hájos, N. (2000), Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations, *Eur J Neurosci*, 12, 3239-49.

Han, J. (2012), Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD, *Cell*, 148, 1039-50.

Hebert-Chatelain, E. (2016), A cannabinoid link between mitochondria and memory, *Nature*, 539, 555-59.

Huerga-Gómez, A. (2021), Δ9-Tetrahydrocannabinol promotes oligodendrocyte development and CNS myelination in vivo, *Glia*, 69(3), 532-545.

Karram, K. (2008), NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse, *Genesis*, 46, 743-57.

Katona, I. (2006), Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses, *J Neurosci*, 26, 5628-37.

Katona, I. eta Freund, TF. (2012), Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain, *Annu Rev Neurosci*, 35, 529-58.

Kawamura, Y. (2006), The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum, *J Neurosci*, 26, 2991-3001.

Kmietowicz, Z. (2010), Cannabis based drug is licensed for spasticity in patients with MS, *BMJ*, 340, c3363.

Kremer, D. (2018), Current advancements in promoting remyelination in multiple sclerosis, *Mult Scler*, 1352458518800827.

Maresz, K. (2007), Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells, *Nat Med*, 13, 492-7.

Marques, S. (2016), Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system, *Science*, 352, 1326-9.

Mato, S. (2009), CB1 cannabinoid receptor-dependent and -independent inhibition of depolarization-induced calcium influx in oligodendrocytes, *Glia*, 57, 295-306.

Molina-Holgado, E. (2002), Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling, *J Neurosci*, 22, 9742-53.

Naruse, M. (2017), Origin of oligodendrocytes in mammalian forebrains: a revised perspective, *J Physiol Sci*, 67, 63-70.

Nave, KA. eta Werner, HB. (2014), Myelination of the nervous system: mechanisms and functions, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 503-33.

Palazuelos, J. (2008), The CB(2) cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking: involvement in the pathogenesis of an animal model of multiple sclerosis, *J Biol Chem*, 283, 13320-9.

Pryce, G. (2003), Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis, *Brain*, 126, 2191-202.

Richardson, WD. (2011), NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy?, *Neuron*, 70, 661-73.

Sanchez-Rodriguez, MA. (2018), The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol regulates oligodendrocyte progenitor cell migration, *Biochem Pharmacol*, 157, 180-88.

Sim, FJ. (2006), Complementary patterns of gene expression by human oligodendrocyte progenitors and their environment predict determinants of progenitor maintenance and differentiation, *Ann Neurol*, 59, 763-79.

Simons, M. eta Nave, KA. (2015), Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8, a020479.

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau ahalbidetu duen finantziazioa: Eusko Jaurlaritzako 2014-2015 ikasturteko doktoreak ez diren ikertzaileak prestatzeko Doktoratu Aurreko Programako Laguntza (AM) eta 2016-2017 ikasturteko ikertzaile doktoreentzako Doktoratu Ondoko Hobekuntza Programarako Laguntza (ABC); Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioaren (SAF2013-45084-R eta SAF2016-75292-R) laguntzak; Eusko Jaurlaritzaren (IT702-13) laguntza; CIBERNEDren (PRY-15-404) laguntza; ARSEP fundazioa.

Hezkuntza Nutrizionala: Gluten Gabeko Dieta Segurua, Orekatua eta Inklusiboa

Vázquez-Polo, M., Diez, M., Perez-Junkera, G., Larretxi, I., Txurruka, I., Lasa, A., Martinez, O., Bustamante, M.A., Salmerón, J., Navarro, V.

[1]*Gluten3S ikerketa taldea, Farmazia eta Elikagaien Zientziak Saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).*

maialen.vazquez@gmail.com

Laburpena

Gaixotasun zeliakoa oinarri immunologikoa duen heste patologia kronikoa da. Zeliakoen bizitza soziala mugatuta dago, glutenik gabeko dieta eraman behar izanak eguneroko jardueretan inpaktu handia baitu. Nutrizio Hezkuntza programa egoki batek pertsona hauen osasun fisiko eta soziala hobe ditzakeela uste da. Are gehiago, gaixotasunak zeliakoaren ingurukoetan duen inpaktua handia izanik eta populazio orokorrak pertsona hauen zaintzan eta inklusioan duen rol garrantzitsua kontuan hartuz, pazienteari ez ezik, hezkuntza populazio osoari zuzentzea interesgarria izan daitekeela pentsatzen da. Horregatik, lanaren helburua Nutrizio Hezkuntza garatzeko esku-hartze bat diseinatzea da. Aurretik ondo zehaztutako gaitasun eta ikasketa-emaitzak oinarri hartuta, unitate didaktikoak garatu dira zeliakiarekin, glutenarekin, dieta eta bizi ohitura osasuntsuarekin erlazionatutako kontzeptuak barneratzeko eta integratzeko, bai zeliakoentzat bai populazio orokorrarentzat ere. Gainera, unitate hauen eraginkortasuna neurtzeko plana diseinatu da.

Hitz gakoak: gaixotasun zeliakoa, gluten gabeko dieta, nutrizio-hezkuntza, dieta orekatua, inklusioa, gaitasun zientifikoa

Abstract

Celiac disease is a chronic immune-mediated intestinal pathology. The social life of coeliac patients is restricted, since having to follow a gluten free diet has a major impact on daily activities. It is thought that an appropriate nutritional education program may improve coeliac people´s physical and social health. Even more, as the impact on relatives of those with coeliac disease is significant and considering that general population play an important role in the care and inclusion of coeliac people, it is considered that addressing education not only to the patient but also to the society might be of interest. Therefore, the aim of this work is to design an intervention to develop Nutritional Education. Didactic units have been created for the assimilation and integration of concepts related to celiac disease, gluten, diet and a healthy lifestyle, both for coeliacs and for the general population, based on the results of predetermined competencies and learning outcomes. In addition, a plan has been designed to evaluate the effectiveness of these units.

Keywords: celiac disease, gluten-free diet, nutrition education, balanced diet, inclusion, scientific ability

1. Sarrera eta motibazioa

Gaixotasun Zeliakoa (GZ) gure inguruan ohikoena den heste patologia kronikoa da. Oinarri immunologikoa du, glutenaren presentzian sistema immunearen aktibazioa ematen da aldez aurreko joera duten pertsonetan. Populazioaren %1 zeliakoa dela estimatzen da (Rodrigo et al., 2008) eta zeliakoen %80 diagnostikatu gabe dagoela uste da (Roy et al., 2016), gainera, emakumeetan prebalentzia bikoitza da gizonezkoekin alderatuta, hau da, gizon zeliako bakoitzeko bi emakume zeliako daude (Muñoz Tello et al., 2018). Intzidentzia handituz doa, nahiz eta ez den ziurra zergatik

gertatzen ari den hori, kasu gehiago gertatzen direlako edo gehiago diagnostikatzen delako diagnosi tekniken berrikuntza dela eta (Catassi et al., 2015).

Diagnostikatuta dauden pertsonek normalean GZren sintomatologia tipikoak pairatzen dituzte: beherakoa, goragalea, gorakoa, anorexia, pisu galera… Aldiz, tipikoak ez diren sintomak aurkezten dituzten gaitzaren aldaerak diagnostikatzeko zailagoak dira: anemia ferropenikoa, hezurren mineralizazio desegokia, artritisa eta aknea, besteak beste (Roy et al., 2016).

Gaur egun, gaixotasunaren tratamendu bakarra bizi osorako gluten gabeko dieta (GGD) zorrotza jarraitzea da, glutenak hestean eragiten dituen efektu kaltegarriak murriztu ahal izateko (Gurjral et al., 2012). GGD segurua izatea ezinbestekoa da, baina dieta orekatua eta osasuntsua ere izatea oinarrizkoa da osasun egoera ezinhobea lortzeko.

GGDk elikagai batzuk dietatik ezabatzea dakar eta, ondorioz, zenbait nutrizio gabezia ekar ditzake. Euskal Autonomia Erkidegoan populazio zeliakoaren GGDri buruzko ikerketak egin ostean ondorengo akatsak atzeman dira: zuntz dietetikoa eta karbohidrato konplexuak gutxiegi kontsumitzen dira eta gantz ase eta proteina gehiegi. Akats dietetiko horiek ohikoak dira populazio orokorrean ere eta zuzendu ahal izateko, beharrezkoa da jarraibide dietetikoak proposatzea (González et al., 2018; Churruca et al., 2015).

Hori horrela, Nutrizio Hezkuntza programa egoki batek GZ maneiatzen laguntzea espero da. Mota honetako hezkuntza interbentzioak osasun profesionalen eskuduntza dira, hezkuntza esparruan hezitako osasun profesionalek garatzen dituzte alegia. Demostratu denez, gaixotasun kronikoak maneiatzeko beharrezkoak dira hezkuntza jarduerak, egun halako gaitzei aurre egiteko neurri gomendatuenetakoa izanik (Casellas et al., 2019). Jarduerek honako hau bilatzen dute: gaixotasuna pairatzen duten pertsonei edo/eta euren inguruko pertsonei tratamenduan edo saihestu daitezkeen zailtasunen prebentzioan laguntzea, bizi kalitatea mantendu edo hobetu ahal izateko. Hezkuntzaren helburuak informazioa ematea, ezagutza praktikoak zabaltzea eta portaera moldatzea dira (Casellas et al., 2019). Gaixotasunaren tratamendua nutrizionala denean, GZren kasuan bezala, Nutrizio Hezkuntza deitzen zaio.

Lasa eta kolaboratzaileek (2019) azpimarratu dute pertsona zeliakoen bizi kalitatea hobetzeko Nutrizio Hezkuntzaren garrantzia. Connan eta kolaboratzaileek (2019) ikusi zuten haur zeliakoetan egindako hezkuntza jarduera batzuk gai zirela umeek GGDri buruzko informazioa barneratzeko eta ondorioz euren bizi kalitatea hobetzeko. Halaber, Haas eta kolaboratzaileek (2017) egindako beste ikerketa batean zeliako gazteei zuzendutako “testu mezuak” euren bizi kalitatea hobetzen zutela ikusi zuten.

GGDk osasun fisikoa bilatzen du, baina, aldi berean, bizi kalitatean eragina du, batez ere bizi kalitate sozialean eta familiakoan (Sevinç et al., 2017). Etxetik kanpo jatea da zailtasun handienetakoa, jatetxeetan gluten gabeko elikagai edo platerrak aurkitzeak eta elikagaien kutsadura gurutzatua egoteak kezkatzen ditu zeliakoak (Zysk et al, 2018). Gainera, sozialki baztertuak senti daitezke jatetxe arrunt batera joateko gonbidapena baztertu behar dutenean (Makharia et al., 2014).

Beharrezkoa da familiako kideak gaixotasunaren gestioaren parte izatea gaixoarekin duten erlazioa ona izan dadin, saihestezina baita GGDk etxeko elikadura ohituretan ez eragitea (Zysk et al., 2018). Are gehiago, askorentzat familiaren sostengua ezinbestekoa da.

Zenbait ikerkuntzetan baieztatu da osasun hezkuntza garatzea eta pertsona zeliakoei eskaintzea beharrezkoa dela euren egoera sozialari aurre egiteko (Martínez-Martínez et al., 2019; Chellan et al., 2019). Horregatik guztiagatik, Nutrizio Hezkuntza programak osasun fisikoa eta soziala bilatu behar ditu. Gainera, gaixotasunak zeliakoaren inguruko pertsonetan duen inpaktua handia izanik, pazienteari ez ezik, hezkuntza populazio osoari zuzentzea interesgarria izan daiteke.

Zenbait jarduera egin dira prebalentzia handia duten beste gaixotasunen prebentzio eta tratamendua bultzatzeko, hala nola, Patriota eta kolaraboratzaileek (2017), Li eta kolaboratzaileek (2017; 2019), eta Xu eta kolaboratzaileek (2017), besteak beste, populazio orokorrari zuzendutako obesitatea tratatzeko interbentzioak diseinatu dituzte.

Elikadura ohiturekin erlazionatutako interbentzioek badute bereizgarri bat, asko haurrei zuzendutakoak dira, haurtzaroan ikasten eta ezartzen baitira elikadura ohiturak eta bizi-estiloa (Minossi et al., 2015), gainera, hauek eskola giroan zentratzen dira gehienbat (Gold et al., 2017; Baterlink et al., 2019; Bustos et al., 2016).

Aipagarria da halako programek zeharkako gaitasunak ere landu ditzaketela, gaitasun zientifikoa esaterako. Izan ere, haurren zientziarekiko interesa azken urteetan murriztu izana oso kezkagarria baita, eta, ondorioz, hainbat autorek gaitasun hori lantzeko beharra azpimarratu dute (Scherr et al., 2017).
Hori horrela, populazio orokorrari zuzendutako ikuspuntu zientifikoa duen nutrizio hezkuntzarako programa batek parte hartzaileen, eta ondorioz gizartearen, ezagutzak handitu ditzakela uste dugu eta, honenbestez, pertsona zeliakoen inklusioa eta bizi kalitatea hobetu.

2. Ikerketaren helburuak

Lan honen helburu nagusia populazio orokorraren Nutrizio Hezkuntza sustatzeko esku-hartze bat diseinatzea da.
Programak honako azpi-helburuak bilatuko ditu:

1. Populazio orokorraren eta zeliakoaren dieta hobetzea.
2. Populazio orokorraren kontzientziazioaren bidez populazio zeliakoaren inklusio soziala bultzatzea, zeliakiari eta GGDri buruzko ezagutzak handituz.
3. Haurren zientziarekiko eta ikerkuntzarekiko interesa sustatzea.

3. Ikerketaren muina

Nutrizio Hezkuntza helburu duen esku-hartze bat diseinatu da. Unitate didaktikoak garatu dira zeliakiarekin, glutenarekin, GGDrekin, dieta eta bizi ohitura osasuntsuarekin erlazionatutako kontzeptuak barneratzeko eta integratzeko. Are gehiago, haurrek zientzia gaitasunak lortzea bilatzen da. Gaitasunetan eta ikasketa-emaitzetan oinarritutako diseinua da.

Metodologiari dagokionez, Irakaskuntza-Ikasketa Sekuentzietan (IIS), edo *Teaching-Learning-Squence*-en *(TLS)*, eta Ikerketan Oinarritutako Ikaskuntzan (IOI), edo *Inquiry Based Learning*-en *(IBL)*, oinarritu da interbentzioa. TLS ikasleen ulermena errazteko ikerkuntza kutsua duten jardueretan zentratzen da. IBLan ikasleek gaitasunak eta ezagutzak garatzen dituzte ikertuz sortzen zaizkien ideien bitartez.

Diseinua egiteko bilaketa bibliografiko eguneratua egin da eta Gluten3S ikerketa taldeak eskoletan dagoeneko egin dituen Nutrizio Hezkuntza programen pilotoak oinarri bezala hartu dira.

Esku-hartzea sakon ebaluatuko da, eta ikerketa kuasi-esperimentala, longitudinala, aleatorizatua, multzokatua, geruzatua eta kontrolatua egingo da. Gainera, Euskal Herriko Unibertsitateko, UPV/EHUko, Gizakiekin lotutako Ikerketetarako Etika Batzordeak (GIEBk) onartua izan da (M10/2020/081).

3.1. Lagin tamaina eta errekrutatzea

Vitoria-Gasteizko Lehen Hezkuntzako (LH) eskola publiko, itunpeko eta pribatuek hartuko dute parte. Haurrei zuzendutako Nutrizio Hezkuntza programak eskola giroan zentratu ohi dira, umeek eguneko ordu ugari pasatzen baitituzte bertan eta, gainera, gehiengoek ikasteko prestutasuna adierazten dutelako han (Blitestein et al., 2016). Helburuaren arabera, adin tarte ezberdinetan garatu ohi dira interbentzio hauek, baina elikadura ohiturak ezartzearekin erlazionatutako programak LHko urteetan zentratzen dira, haurren ulertzeko eta ikasteko gaitasuna orduan egokiena baita (Gold et al., 2017; Baterlink et al., 2019; Bustos et al., 2016; Wall et al, 2012; Pablos et al., 2018). Gure programan zehazki LHko hirugarren zikloko umeek,

hots, 5. eta 6.mailako ikasleek hartuko dute parte. 10-12 urteko adina kontsideratzen da egokiena, orduan dieta eta nutriente kontzeptuak *curriculum*ean lantzen dituztelako, gaitasun zientifikoa lantzen hasten direlako eta horretan sakontzeko une egokia dela kontsideratzen delako zenbait lanetan (236/2015 Dekretua). Gainera, Gluten3S ikerketa taldeak burututako ikerketak ere adin horretako haurretan zentratu dira eta adin egokia dela ondorioztatu dute (López, 2019), beraz, interbentzio hau garatzeko adin egokiena dela uste da.

Saio bakoitzean 20-30 haurrek parte hartzea estimatzen da; hau da, klaseen tamaina errespetatuko da sesio bakoitzeko parte hartzaileen kopurua erabakitzeko, hala ere, ekintza batzuk burutzeko talde txikiagoetan banatuko dira. Estimatzen da guztira 300 ikasle inguru egongo direla bai interbentzio eta bai kontrol taldeetan. Balio hori Arabako Lehen Hezkuntzako populazioan oinarrituta kalkulatu da %5,5eko errorea onartuz. Dena den, oraindik behin behineko datua da; izan ere, taldearen errekrutatze ahalmenaren arabera eta umeen azpitaldeak garatzeko aukeren arabera, kantitate hau handitu baitaiteke etorkizunean.

Kontuan hartuko da parte hartzaileak zeliakoak diren edo ez. Horrez gain, pertsona zeliakoak ezagutzen dituzten parte hartzaileak ere identifikatuko dira. Taldeak egindako ikerketetan ikusi da zeliakoak diren edo ezagun zeliakoren bat duten haurren erantzunak oso ezberdinak direla eta besteen erantzunengandik bereizi behar direla (López, 2019). Gainera, zenbait datu soziodemografiko jasoko dira interbentzioaren emaitzak horien arabera ere aztertu ahal izateko.

3.2. Programaren deskribapena

Interbentzioan Gluten3S ikerketa taldeko kideek parte hartuko dute, hauek programaren eta materialen diseinuan, hezkuntza tailerren ezarpenean eta emaitzen bilketan eta analisian jardungo dute. Esku hartzea gaitasun eta ikasketa-emaitzetan oinarrituta dago, horien arabera jarduera aktiboak proposatzen zaizkie haurrei eta baita horiek ebaluatzeko baliabideak, 1. taulan beha daitekeenez.

Interbentzioa 8 saioetan garatuko da, zeinak hiru gai nagusiren ingurukoak izango diren: (1) Elikadura ohitura osasuntsuak, (2) GGD eta GZ, eta (3) zientzia eta ikerkuntza sustatzea.

Saio bakoitzaren iraupena 60 minutukoa izango da eta eskola orduetan egingo da. Astean bi sesio egingo dira, beraz, guztira 4 astetan burutuko dira jarduerak. Haurrei informazioa dosi txikietan ematea modu konpaktuagoan ematea baina eraginkorragoa dela dirudi, beraz, 60 minutuko saioak hilabete batean sakabanatuta egitea egokitzat jotzen da (Xu et al., 2017; Minossi et al., 2015; Gold et al., 2017).

Saio bakoitzean gai ezberdinak garatzen joango dira. Klaseak ez dira teorikoak izango eta joko ezberdinen bidez ikasiko dira kontzeptuak, zenbait ikerketek dibertimenduan oinarritutako hezkuntza estrategiak teorian oinarritutakoak baino eraginkorragoak direla baitiote (Minossi et al., 2015).

Klasean landutako gaiak jasotzen dituen koaderno bat banatuko zaie eta plataforma birtual batean jasoko dira, gurasoekin batera etxean kontsultatu ahal izateko. Gai batzuen ostean jarduera bat proposatuko da, zeina etxean egin beharko den familiako kideen laguntzaz. Hurrengo eskola-saioaren hasieran etxean egin beharreko jarduera komentatuko da: izan dituzten zailtasunen inguruan galdetuko zaie eta horiei aurre egiteko proposamenak egingo zaizkie.

Emaitza onak izan dituzten ikerketa ugarik azpimarratu dute gurasoak interbentzioan inplikatzeko beharra, zeharka, adibidez, etxerako lanen bidez (Gatto et al., 2017; Sherr et al., 2017; Duncan et al., 2019), edo zuzenean, gurasoekin aurrez aurreko saioak eginez (Pablos et al., 2018; Santos-Beneit et al., 2019; Adab et al., 2018). Horregatik, etxerako lanen bidez eta web orriaren bidez gurasoekin sor daitekeen harremana haurren ikasketa prozesuan eraginkorra izan daitekeela uste da.

Taula 1. Gaitasun eta ikasketa emaitzetan oinarrituta interbentzioaren laburpena jasotzen duen taula.

Gaitasuna	Ikasketa emaitza	Zein jarduera egingo dira?	Ebaluazioa: inkesten bidezko galderak
Ikaslea gai izan behar da elikagai taldeak elikadura-piramidean kokatzeko.	*B3. Aplikazioa* Piramidean elikagai ezberdinak ongi antolatzen ditu.	Elikadura piramideari buruzko jokoa.	1. Elikadura piramidearen atal ezberdinetan dauden elikagaiak izendatzeko gai naiz? Bai edo ez. 2. Zeintzuk daude goiko aldean? 3. Zeintzuk beheko aldean? 4. Elikagai bikote ezberdinak proposatuko zaizkie eta horietako zein dagoen piramidean gorago adierazteko eskatuko zaie.
Ikaslea gai izan behar da dietako akatsak identifikatzeko eta aldatzeko gomendioak emateko.	*B4. Analisia* Maiztasun txikiz kontsumitu behar diren elikagaiak identifikatzen ditu. *B6. Ebaluazioa* Horien kontsumoa moldatzeko gomendioak ematen ditu.	24 orduko oroigarria osatu eta moldatu.	5. Zenbat fruta eta barazki hartu behar dira egunean? 6. Jaten ditudan elikagai ez osasuntsuak identifikatzeko gai naiz? Bai edo ez. 7. Zeintzuk dira elikagai horiek? 8. Zure ustez, zertan hobetu beharko zenuke zure elikadura?
Ikaslea gai izan behar da piramidearen goiko aldeko elikagai gutxiago kontsumitzeko.	*B6. Ebaluazioa* Ikasleak jarduerak burutu aurretik baino hamarretako osasuntsugoak egiten ditu.	Elikadura piramideari buruzko jokoa. 24 orduko oroigarria osatu eta moldatu. Hamarretako osasuntsuak egiteko erronka.	9. Egunean zenbat elikagai jaten dituzu piramidearen goi-goian daudenak? 10. Zure ustez, garrantzitsua da elikadura osasuntsua jarraitzea? 11. Astean zehar zenbatetan eramaten duzu hamarretako osasuntsua eskolara (fruta, esnekiak, ogi integrala...)?
Ikaslea gai izan behar da zeliakia gaixotasuna zer den azaltzeko.	*B2. Ulermena* Glutenak pertsona zeliakoei kalte egiten diela eta gaixotzen direla onartzen du. Zeliakoek glutenik gabeko dieta jarraitu behar dutela	Gaixotasunaren ezaugarriak ikasteko jolasa.	12. Zein sintoma dituzte pertsona zeliakoek? 13. Noiz agertzen dira sintoma horiek? 14. Elikagaien zein osagaik egiten die kalte zeliakoei?
Norbere ekintzek besteengan duten eragina baloratzeko gai da.	*B6. Ebaluazioa* Portaera enpatikoa defendatzen du. Pertsonen arteko ezberdintasunak gainditzeko ekintza eta portaerak aukeratzen ditu.	Gaixotasunaren ezaugarriak ikasteko jolasa. Inklusioa lantzeko kasu praktikoa: eztabaida.	15. Nola uste duzu sentitzen direla pertsona zeliakoak? 16. Pertsona zeliako batek jaten disfrutatu dezake? 17. Zer egingo zenuke zure urtebetetzea balitz eta klasera tarta bat eramango bazenu, baina zure klasekide bat zeliakoa balitz? Berak tarta jaten ez duela ziurtatu, beretzako gluten gabeko beste tarta bat eraman edo guztiontzako gluten gabeko tarta eraman.
Ikaslea gai izan behar da glutena aztertzeko.	*B3. Aplikazioa* Glutena manipulatu eta aurkitzen du. Glutenak oreari elastikotasuna ematen diola aztertzen du.	1. esperimentua: irin mota ezberdinekin egindako oreekin esperimentua. 2. esperimentua: zentzumenen bidezko elikagaien analisia.	18. Non dago glutena? 19. Zerk egiten du orea elastikoa izatea, luzatzea? a) glutenak b) urak
Ikaslea gai izan behar da elikagai	*B4. Analisia* Glutena duten elikagai	3 esperimentua: glutena detektatzeko esperimentua,	20. Ondorengo zein elikagai taldetik ezin dute jan zeliakoek? 21. Ondoren irakurriko duzun

taldeak gluten edukiaren arabera sailkatzeko.	taldeak identifikatzen ditu: glutena zerealetan kokatuz. Elikagai prozesatuek glutena izan dezaketela ondorioztatzen du.	immunokromatografia. 4. esperimentua: elikagaien etiketen azterketa.	elikagaien zerrendatik, zientzuk izan dezakete glutena?
Ikaslea gai izan behar da zientzilarien lana ulertzeko, elikagaietako glutena beraiek ikertzen dutela jakin behar dute. Esperimentuak egiten dituztela jakin behar dute.	*B6. Ebaluazioa* Lan esperimental bat gauzatzeko, emaitzak behatzeko, analizatzeko eta ebaluatzeko gai izatea.	Lau esperimentuak.	22. Ondorengo baieztapenekiko adostasuna adierazi: -Glutena detektatzeko laborategian esperimentuak egin behar dira. -Zientzialariek esperimentuak egitea garrantzitsua da. -Etorkizunean zientzialaria izatea gustatuko litzaidake. -Ikerlariak txoroak, gizonezkoak eta arraroak dira.

B: Ikasketa emaitzen Bloomen taxonomia maila adierazten du (Bloom et al., 1956).

3.3. Nutrizio Hezkuntza programa ebaluatzeko erremintak

Ikasleen datuak eta emaitzak jasoko dira interbentzioa hasi aurretik, bukatu bezain laster eta 1 eta 6 hilabete ostean. Horretarako galdetegi espezifikoak diseinatu dira. Guztiak eskolan beteko dira, ikastetxeko irakasleei azalduko zaie nola bete behar den inkesta hauek haurrei lagundu ahal izateko. Galderak ahots altuan irakurriko dira guztiek galdetzen ari zaiena ongi ulertzen dutela ziurtatzeko (Wall et al., 2012). Gainera, galdetegiak betetzea astuna izan ez dadin, saio bakoitzaren hasieran eta amaieran atal horri dagozkion galdera gutxi batzuk egingo zaizkie, horrela, lehengo eta azkeneko saioetan galdetegi luzeak betetzea eragotziko da. Haurren adina kontuan izanik galdetegien betetzeak gehiegizko esfortzua suposa dezakeela uste da eta hori eragozteko egunero pare bat galdera motz erantzutea egokia izan daitekeela uste da.

Haurrek bete beharko dituzten galdetegietan mota ezberdinetako galderak egongo dira: datu soziodemografikoak biltzeko galderak, lortutako jakintza maila neurtzeko galderak, norberaren gaitasunak hobetu diren neurtzeko galderak, portaeretan aldaketak egon diren neurtzeko galderak eta gaitasun zientifikoa hobetu den neurtzeko galderak, nagusiki.

3.4. Datuen analisia

Galdetegietan jasotako datu guztiak modu digitalizatuan eta anonimotasunean jasoko dira Excel batean (Microsoft Office Excel) eta kuantitatiboki eta kualitatiboki ebaluatuak izango dira analisi estatistikorako SPSS paketearen bidez. Laginaren deskribatzaileen eta maiztasunen aldagai bakarreko analisia egingo da. Pre-post emaitzen eta, interbentzio taldearen eta kontrol taldearen arteko emaitzen konparaketa egiteko bi aldagaiko analisia egingo da. Neurri errepikatuen ANOVAk erabiliko dira koaldagai gisa sartuz puntuazio basalak, nahasgarri posibleak ere kontuan izanik.

4. Ondorioak

Gaur egun arte gaixotasun zeliakoaren tratamendua soilik dietetikoa izan da. Gluten gabeko dieta zorrotz eta osasuntsua da gaixotasunari aurre egiteko aukera bakarra, baina osabide honek baditu albo ondorioak ere, hala nola, zeliakoen bizi kalitate sozialaren murrizketa.

Diseinatutako interbentzioak populazio orokorraren kontzientziazioaren bidez kolektibo zeliakoaren inklusio soziala bultzatzea, eta populazio orokorraren, eta bereziki zeliakoen, dietan aldaketa positiboak eragitea espero da. Are gehiago, proposatutako jarduerak Bloomen taxonomiako maila gorenetan jorratuz haurren besteekiko zaintza eta ondoriozko inklusioa

bultzatuko direla uste da. Jorratutako gaien barneratzea eta integratzea modu egokian balioztatzeko, ikerketa kuasi-esperimentala, longitudinala, aleatorizatua, multzokatua, geruzatua eta kontrolatua diseinatu da.

Zeliakoen bizi kalitatea hobetze aldera, beharrezkoa da zeliakiaren tratamendua ikuspuntu zabalago batetik jorratzea, horregatik, lan hau aurrerapausu garrantzitsua da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunera begira, Nutrizio Hezkuntza beste kolektibo batzuetara zabalduko da, pertsona zeliakoen bizitzan eragin zuzena duten kolektiboetara, hain zuzen ere. Ostalaritza ikasleak heziko dira, ardura handia izango baitute eskaintzen duten zerbitzuetan eta, beraz, zeliakoen bizitza sozialean; haurrekin familia giroan sukaldaritza tailerrak egingo dira; sare sozialetan, gaixotasun zeliakoaren eta gluten gabeko dietaren dibulgazio zientifikoa egingo da. Esku hartze horiek ebaluatuko dira ere, haien eraginkortasuna aztertzeko.

6. Erreferentziak

236/2015 Dekretua, abenduaren 22koa, Oinarrizko Hezkuntzaren curriculuma zehaztu eta Euskal Autonomia Erkidegoan ezartzen duena. EHAA, 9zk, (2015eko abenduaren 19a).

Adab, P. et al. (2018): The West Midlands ActiVe lifestyle and healthy Eating in School children (WAVES) study: a cluster randomised controlled trial testing the clinical effectiveness and cost-effectiveness of a multifaceted obesity prevention intervention programme targeted at children aged 6-7 years, *Health Technol Assess*, 22(8), 1-608.

Bartelink, NHM. et al. (2019): One- and Two-Year Effects of the Healthy Primary School of the Future on Children's Dietary and Physical Activity Behaviours: A Quasi-Experimental Study, *Nutrients*, 11(3).

Blitstein, JL. et al. (2016): Adding a Social Marketing Campaign to a School-Based Nutrition Education Program Improves Children's Dietary Intake: A Quasi-Experimental Study, *J Acad Nutr Diet*, 116(8), 1285-94.

Bustos, N. et al. (2016): Impact of a school-based intervention on nutritional education and physical activity in primary public schools in Chile (KIND) programme study protocol: cluster randomised controlled trial, *BMC Public Health*, 16(1), 1217.

Bloom, BS., eta Krathwohl, DR. (1956): Taxonomy of educational objectives: the classification of educational goals. Longmans, Green.

Casellas, F. et al. (2019): Documento de consenso sobre las Dietas de exclusión en el Síndrome del Intestino Irritable, *Sociedad Española de Patología Digestiva (SEPD).*

Catassi, C. Gatti, S. eta Lionetti, E. (2015): World perspective and celiac disease epidemiology, *Dig Dis*, 33(2), 141-6.

Chellan, D. et al. (2019): Effect of gluten-free diet and compliance on quality of life in pediatric celiac disease patients, *JGH Open*, 3(5), 388-93.

Churruca, I. et al. (2015): Analysis of Body Composition and Food Habits of Spanish Celiac Women, *Nutrients*, 7(7), 5515-31.

Connan, V. et al. (2019): Online education for gluten-free diet teaching: Development and usability testing of an e-learning module for children with concurrent celiac disease and type 1 diabetes, *Pediatr Diabetes*, 20(3), 293-303.

Duncan, S. et al. (2019): Efficacy of a compulsory homework programme for increasing physical activity and improving nutrition in children: a cluster randomised controlled trial, *Int J Behav Nutr Phys Act*, 16(1), 80.

Gatto, NM. et al. (2017): LA sprouts randomized controlled nutrition, cooking and gardening programme reduces obesity and metabolic risk in Hispanic/Latino youth, *Pediatr Obes*, 12(1), 28-37.

Gold, A. et al. (2017): Classroom Nutrition Education Combined With Fruit and Vegetable Taste Testing Improves Children's Dietary Intake, *J Sch Health*, 87(2), 106-13.

González, T. et al. (2018): Celiac Male's Gluten-Free Diet Profile: Comparison to that of the Control Population and Celiac Women, *Nutrients*, 10(11).

Gujral, N. Freeman, HJ. eta Thomson, AB. (2012): Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment, *World J Gastroenterol*, 18(42), 6036-59.

Haas, K. Martin, A. eta Park, KT. (2017): Text Message Intervention (TEACH) Improves Quality of Life and Patient Activation in Celiac Disease: A Randomized Clinical Trial, *J Pediatr*, 185: 62-7.

Lasa, A. et al. (2019): New Software for Gluten-Free Diet Evaluation and Nutritional Education, *Nutrients*, 11(10).

Li, B. et al. (2017): Cluster-randomised controlled trial to assess the effectiveness and cost-effectiveness of an obesity prevention programme for Chinese primary school-aged children: the CHIRPY DRAGON study protocol, *BMJ Open*, 7(11).

Li, B. et al. (2019): The CHIRPY DRAGON intervention in preventing obesity in Chinese primary-school--aged children: A cluster-randomised controlled trial, *PLoS Med*, 16(11).

López, M. (2019): Implementación y mejora de una Unidad Didáctica sobre celiaquía en colegios de Vitoria-Gasteiz. Trabajo Fin de Master, Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea.

Makharia, GK. (2014): Current and emerging therapy for celiac disease, *Front Med*, 1, 6.

Martínez-Martinez, et al. (2019): Quality of Life in People with Coeliac Disease: Psychological and Socio- Economic Aspects, *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*,19(2), 116-20.

Minossi, V. Eta Pellanda, LC. (2015): The "Happy Heart" educational program for changes in health habits in children and their families: protocol for a randomized clinical trial, *BMC Pediatr*, 15, 19.

Muñoz Tello, P. (2018): Prevalencia mundial de la enfermedad celíaca, Sevilla, España: Universidad de Sevilla.

Pablos, A. et al. (2018): Effectiveness of a school-based program focusing on diet and health habits taught through physical exercise, *Appl Physiol Nutr Meta*, 43(4), 331-7.

Patriota, PF. et al. (2017): Effectiveness of a 16-month multi-component and environmental school-based intervention for recovery of poor income overweight/obese children and adolescents: study protocol of the health multipliers program, *BMC Public Health*, 17(1): 708.

Rodrigo, L. Garrote, JA. eta Vivas, S. (2008): Enfermedad celíaca, *Medicina Clínica*, 131(7), 264-70.

Roy, A. et al. (2016): The association between socioeconomic status and the symptoms at diagnosis of celiac disease: a retrospective cohort study, *Therap Adv Gastroenterol*. 9(4), 495-502.

Santos-Beneit, G. et al. (2019): Rationale and design of the SI! Program for health promotion in elementary students aged 6 to 11 years: A cluster randomized trial, *Am Heart J*, 210, 9-17.

Scherr, RE. et al. (2017): A Multicomponent, School-Based Intervention, the Shaping Healthy Choices Program, Improves Nutrition-Related Outcomes, *J Nutr Educ Behav*, 49(5), 368-79.

Sevinç, E. Çetin, FH. eta Coşkun, BD. (2017): Psychopathology, quality of life, and related factors in children with celiac disease, *J Pediatr*, 93(3), 267-73.

Wall, DE. et al. (2012): Nutrition education intervention improves vegetable-related attitude, self-efficacy, preference, and knowledge of fourth-grade students, *J Sch Health*, 82(1), 37-43.

Xu, H. et al. (2017): Comprehensive school-based intervention to control overweight and obesity in China: a cluster randomized controlled trial, *Asia Pac J Clin Nutr*, 26(6), 1139-51.

Zysk, W. Głąbska, D. eta Guzek, D. (2018): Social and Emotional Fears and Worries Influencing the Quality of Life of Female Celiac Disease Patients Following a Gluten-Free Diet, *Nutrients*, 10(10).

7. Eskerrak eta oharrak

Maialen Vázquez Polo eta Gesala Perez Junkera ikertzaileak prestatzeko kontratuen onuradunak dira, zehazki, Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) kontratu baten eta Eusko Jaurlaritzako beste kontratu baten onuradunak dira, hurrenez hurren. UPV/EHUko unibertsitate-enpresa-gizartea ikerketa proiektuen eta UPV/EHUko Ikerketa taldeen laguntzen finantzazioari esker egin da lan hau (US18/15, US20/16 eta GIU18/078).

Esker onak Gluten3S ikerketa taldeko kide guztiei, proiektu hau aurrera ateratzeko egindako lan guztiagatik. Eskerrik asko ere lan honetan parte hartu duten ikastetxe, irakasle, haur eta familia guztiei. Bereziki, Gasteizeko San Prudentzio eta Angel Gavinet ikastetxeei.

RNAren N^6-metiladenosina (m^6A) modifikazioren rol berriak hesteko inflamazioaren garapenean eta tratamenduan

Olazagoitia-Garmendia, A.[1,2], Sebastian-DelaCruz, M.[1,2], Garcia-Santisteban, I.[1,2], Mendoza, L.M.[1], Huerta, A.[3], Irastorza, I.[4], Rodriguez, J.A.[1], Bilbao, J.R.[1,2,5], Castellanos-Rubio, A.[1,2,5,6]

[1]Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, UPV-EHU, Leioa. [2]Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketarako Institutoa, Barakaldo. [3]Gaixotasun Intestinalak, Galdakao-Usansolo Ospitalea, Galdakao 4Pediatria Saila, UPV-EHU, Leioa. [5]CIBERDEM, Insituto de Salud Carlos III, Madril. [6]Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbo.

ane.olazagoitia@ehu.eus

Laburpena

Eritasun Zeliakoa (EZ) genetikoki sentikorrak diren pertsonetan garatzen den gaixotasun autoimmune konplexua da. Glutenak erantzun immunea eragiten die eta gaur egun dagoen tratamendu bakarra bizi osorako glutenik gabeko dieta zorrotza jarraitzea da. EZari loturiko sentikortasun genetikoa HLA (Human Leucocyte Antigen) geneekin eta HLAtik kanpoko hainbat eremu genomikorekin asoziaturik dagoela jakina den arren, haien ekarpena gaixotasunean oraindik ez dago guztiz deskribatua. Horrek zaildu egiten du beharrezkoak diren dietaz besteko tratamendu berrien garapena. Lan honetan EZrekin asoziaturiko aldaera (Single Nucleotide Polymorphism edo SNP) baten deskribapen funtzionala azaltzen da, zeina *XPO1* genearen 5'UTR eremuan dagoen eta EZan ohikoa den hanturan eragiten duen.

Hitz gakoak: RNA ez kodetzaileak, SNP, m^6A, pQTL

Abstract

Celiac disease (CD) is a complex autoinmune disorder that develops in genetically susceptible individuals. Dietary gluten triggers an immune response for which the only available treatment so far is a strict, lifelong gluten free diet. Human leucocyte antigen (HLA) genes and several non-HLA regions have been associated with the genetic susceptibility to CD, but their role in the pathogenesis of the disease is still essentially unknown, making it complicated to develop much needed non-dietary treatments. Here, we describe the functional involvement of a CD-associated single-nucleotide polymorphism (SNP) located in the 5'UTR of XPO1 in the inflammatory environment characteristic of the celiac intestinal epithelium.

Keywords: ncRNAs, SNP, m^6A, pQTL.

1. Sarrera eta motibazioa

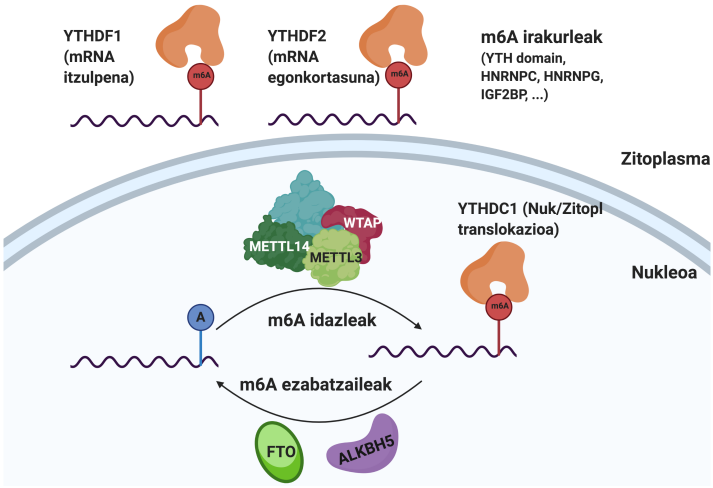
Eritasun Zeliakoa (EZ) sentikortasun genetikoa duten pertsonetan glutenak sortzen duen hesteetako hanturazko desoreka da. Pertsona horietan glutenak erantzun proinflamatorioa sortzen du eta immunitate-sistema aktibatzen da (Abadie et al., 2020; Garrote et al., 2008), hala, zelula immune zein epitelialek zitokina proinflamatorioak jariatzen dituzte hantura kronikoa sustatuz (Dieli-Crimi et al., 2015; Ricaño-Ponce et al., 2016). Gaur egun, EZ tratatzeko aukera bakarra bizi osorako glutenik gabeko dieta (GGD) zorrotza jarraitzea da. Hala ere, dieta mota hau zuzen jarraitzeko zailtasunek konplikazioak sortzen dituzte gaixoetan, hesteetako minbizia kasu, beraz tratamendu berriak beharrezkoa dira.

EZ garatzeko arrisku genetikoaren ia %30 HLA geneek (Human Leukocyte Antigen) ematen dute. Azken urteotako ikerketek heredagarritasunaren %6,5 gehigarria osatzen duten HLAtik kanpoko eremu genomiko berriak aurkitu dituzte (Caio et al., 2019). EZ gaixoen %90 inguruk HLA-DQ2 edo DQ8 aleloak dituzten arren, aldaera hauek populazio orokorrean ere ohikoak dira. Beraz, EZren patogenesia hobeto ulertzeko beharrezkoa da asoziaturiko aldaeren ikerketa funtzionalak egitea. Hala ere, EZrekin asoziaturiko aldaera (Single Nucleotide Polymorphism edo SNP) gehienak genomaren eremu ez kodetzailean daude, eta zaila izaten da beraien eragina identifikatzea (Kim et al., 2015).

RNA mezulari (mRNA) eta RNA ez kodetzailetan agertzen den aldaketa kimiko ugariena N^6-

metiladenosina (m^6A) da. m^6A aldaketak RNA molekulen aspektu desberdinetan eragiten du eta prozesu zelular ugaritan paper garrantzitsua jokatzen du. Hori dela eta, m^6A aldaketak gene adierazpenaren erregulazioan duen garrantzia azaleratzen ari da azken aldian (Geula et al., 2015; Koranda et al., 2018; Wang et al., 2014; Wang et al., 2015). Gaur egun, jakina da m^6A idazle edo metilasek (METTL3/METTL14 konplexua) eta m^6A ezabatzaile edo demetilasek (ALKBH5 esaterako) m^6A mailak kontrolatzen dituztela metilazio markak gehituz ala ezabatuz. Ondoren, m^6A irakurle deitzen diren proteinek (YTHDF1 kasu) metilatuak dauden RNAk ezagutzen dituzte eta haien erregulazioan eragiten dute (1.Irudia). Gainera, metilazio prozesua dinamikoa da eta zelulei aukera ematen die autoimmunitate eta hantura eragiten dituzten kanpo estimuluei azkar erantzuteko (Shulman et al., 2020; Winkler et al., 2019).
Azken aldian argitaratu diren ikerketa berriek gaixotasun autoimmune eta inflamatorioekin asoziaturiko SNPek m^6A metilazio marketan eragina izan dezaketela iradokitzen dute (Lu et al., 2020; Zhang et al., 2020). Hori horrela, lan honen helburu nagusia EZrekin asoziaturiko aldaerek m^6A marketan izan dezaketen eragina ikertzea eta horrek glutenaren aurka sortzen den hantura prozesua nola erregulatzen duen aztertzea izan da.

1. irudia. ***RNAren m^6A aldaeran parte hartzen duten proteina idazle, ezabatzaile eta irakurleen funtzioen eskema.*** Zelularen nukleoan m^6A idazleek (METTL3, METTL14 edota WTAP) RNA molekulen adenosina (A) metilatzen dute. m^6A ezabatzaileak (FTO edo ALKBH5), aldiz, metilazio markak ezabatzeko gai dira. Nukleoan zein zitoplasman, m^6A irakurle desberdinek metilaturik dauden RNAk identifikatzen dituzte eta maila desberdinetan eragiten dute RNA molekuletan (itzulpenean, egonkortasunean zein kokapen zelularrean).



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aipatu bezala, EZ eragiten duen kanpo faktore ezagunena glutena da, baina glutenak erantzun immunea nola sortzen duen ez da guztiz deskribatu oraindik. Gainera, EZrekin asoziaturiko aldaera asko identifikatu diren arren, haien funtzioa gehienetan ez da ezaguna. Hortaz, oraindik bide luzea gelditzen da EZ patogenesian kanpo eragileek eta aldaera genetikoek duten funtzioa ulertzeko.

Bide horretan, EZri asoziaturiko aldaera genomikoek RNAren metilazioan eragina duten eta aldaketa horiek gaixotasunaren garapenean eragiten duten ikertu nahi izan genuen, horretarako EZri asoziaturiko eta m^6A marken inguruan dauden SNPen ikerketa eginez. Horrez gain, glutenak metilazio aldaketak eragiten dituen aztertzea ere genuen helburu.

Hain zuzen ere, exportin 1 (*XPO1*) genean dagoen EZrekin asoziaturiko rs3087898 SNP ez kodetzailearen ikerketa funtzionala aurkezten dugu. XPO1 zenbait RNA eta proteina nukleotik zitoplasmara garraiatzen dituen exportina bat da (Fukuda et al., 1997). Alde batetik, XPO1ek NFkB hantura bidezidorra erregulatzen duela ikusi da (Khan et al., 2013), zeina EZ gaixoetan aktibatua dagoen (Fernandez-Jimenez et al., 2014). Bestalde, XPO1 gainadierazpena edota mutazioak zenbait gaitzekin erlazionatu dira eta minbiziaren aurkako itu terapeutiko moduan aztertu da (Gravina et al., 2014; Tan et al., 2014).

Lan honetan, *XPO1*en 5'UTRan dagoen (*Untranslated Region* edo itzuli gabeko eskualdea) EZrekin asoziaturiko SNParen m^6A maila desberdinek proteinaren itzulpenean eragiten dutela deskribatu dugu. Gainera, orain arte deskribatu gabeko glutenaren eta m^6A proteinen arteko lotura berri bat aurkeztu dugu, EZren aurkako tratamenduetan ate berriak irekitzen dituena (Olazagoitia-Garmendia et al., 2021).

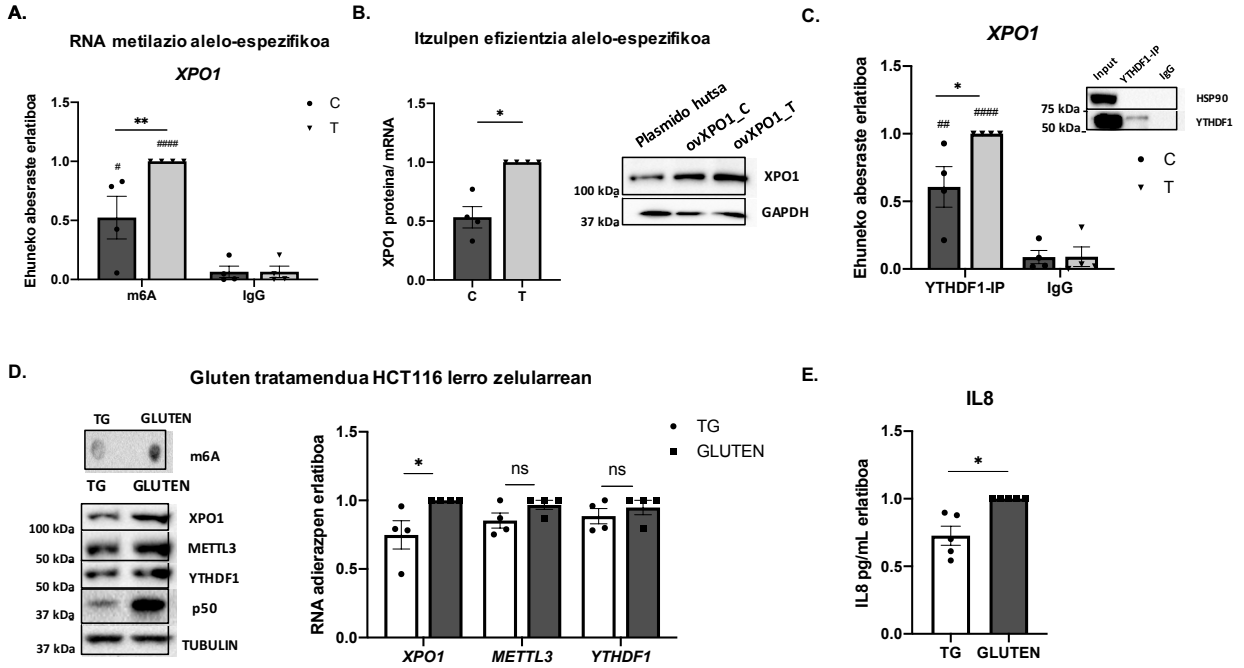
3. Ikerketaren muina

3.1. *EZrekin asoziaturiko XPO1en aleloak metilazio maila altuagoa du,* glutenak m^6A makinaria aktibatzen du, eta ondorioz, XPO1 mailak eta NFkB hantura-bidezidorra areagotzen dira

EZrekin asoziaturiko rs3087898 SNPa (GRCh38:chr2:61538039) *XPO1*en 5'UTRan eta hiru m^6A motiboren ondoan dagoela ikusi genuen. Lehenik, eremu hori metilatua dagoela konfirmatu genuen m^6A immunoprezipitazioa burutuz eta qPCR bidez kuantifikatuz. HCT116 lerro zelular heterozigotikoak erabiliz, EZaren arrisku aleloak (*XPO1**T) metilazio maila altuagoa duela baieztatu genuen (2.Irudia A). Ondoren, m^6A metilazioak RNAren prozesu metaboliko desberdinetan eragiten duenez, *XPO1*en metilazio maila desberdinek duten funtzioa ulertu nahi izan genuen. Horretarako T eta C aleloak daramatzaten bi 5'UTRak *XPO1*en eremu kodetzailearen aurrean klonatu genituen gainadierazpenerako plasmido batean. Horrela, arrisku aleloak XPO1 proteina gehiago ekoizten duela baieztatu genuen (2.Irudia B).
*XPO1**T arrisku aleloaren m^6A maila altuagoak itzulpena areagotzearen erantzule diren baieztatzeko, itzulpen efizientziarekin erlazionatua dagoen YTHDF1 m^6A irakurlea (Zhang et al., 2020) aztertu genuen. YTHDF1 proteinak XPO1en m^6A marka identifikatu eta bertara lotzen den jakiteko, YTHDF1 proteina immunoprezipitazio bidez isolatu eta bertara loturiko *XPO1* mailak kuantifikatu genituen qPCR bidez. Modu horretan ikusi genuen *XPO1**T arrisku aleloa (metilazio maila altuagoa duena) YTHDF1 proteinari gehiago lotzen zaiola (2.irudia C). Hortaz, EZri asoziaturiko eta m^6A motiboen ondoan dagoen SNPak metilazio mailak aldatu eta XPO1 proteina kantitatea areagotzen dituela baieztatu genuen.

Zenbait kanpo estimuluen aurrean 5'UTRan dauden m^6A markak areagotu egiten direla deskribatu da. Hori dela eta, aztertu nahi izan genuen ea EZan glutenak m^6A markak areagotu eta XPO1 mailetan eragina duen. Horretarako, HCT116 zelulak glutenarekin estimulatu genituen eta horren efektua aztertu. Glutenak zelularen m^6A metilazio maila areagotzen duela eta *METTL3* (m^6A idazlea), *YTHDF1* (m^6A irakurlea) zein *XPO1* geneen adierazpen mailak igo egiten direla ikusi genuen (2.Irudia D). Gainera, glutenak eragindako igoera horrek NFkB hantura-bidezidorra ere aktibatzen duela baieztatu genuen. Izan ere, p50 NFkB proteina eta ondoriozko IL8 zitokina inflamatorioaren mailak altuagoak dira glutenarekin estimulaturiko zeluletan (2.Irudia D,E).

2. irudia. ***EZrekin asoziaturiko XPO1en aleloak metilazio maila altuagoa du, glutenak m^{6}A makinaria aktibatzen du, eta ondorioz, XPO1 mailak eta NFkB hantura-bidezidorra areagotzen dira.*** **(A)**. m^{6}A antigorputza edo IgG kontrol negatiboa erabiliz HCT116 lerro zelularrean egindako immunoprezipitazioaren kuantifikazio alelo-espezifikoa qPCR bidez. **(B)** XPO1en 5'UTRaren itzulpen efizientzia alelo-espezifikoa. Eskubian, XPO1 proteina mailak adierazten dituen Western Blot argazkia, GAPDH kontrol moduan erabiliz. Ezkerrean, XPO1 proteina kuantifikazioa gainadierazitako XPO1 mRNA mailekiko erlatibizatua. **(C)** YTHDF1 m^{6}A irakurlearekin immunoprezipitatutako XPO1 mRNAren kuantifikazio alelo-espezifikoa qPCR bidez. **(D)** Gluten tratamendua HCT116 lerro zelularrean. Ezkerrean goian, tratamendurik gabeko zeluletan (TG) edo glutenarekin trataturiko zeluletan (GLUTEN) m^{6}A mailak Dotblot bidez kuantifikatuak. Ezkerrean behean, TG edo GLUTEN zeluletan m^{6}A makinaria, XPO1 eta p50 NFkB unitatea WB bidez irudikatuak. Eskubian, m^{6}A makineria eta *XPO1* mRNA kuantifikazioa qPCR bidez. **(E)** IL8 hantura zitokinaren kuantifikazioa ELISA bidez TG edo GLUTEN zelulen gainjalkinetan. (ns=ez esangarria* p <0,05; **p<0,01; #p<0,05; ##p<0,01; ####p<0,0001)



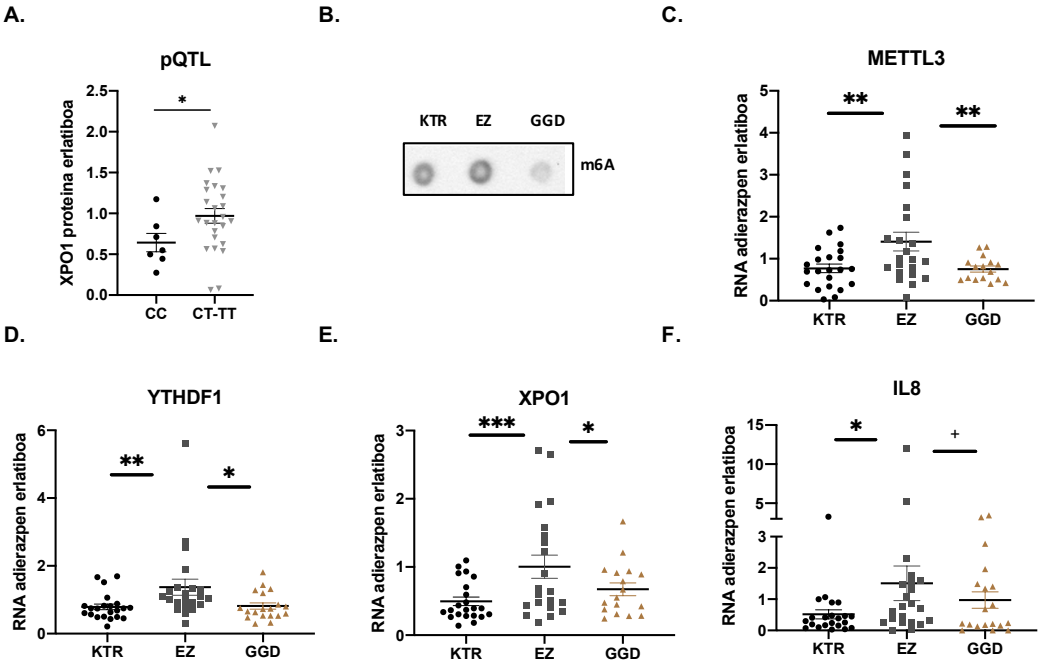
3.2. EZrekin asoziaturiko arrisku aldaera duten gaixoek XPO1 proteina maila altuagoak dituzte eta glutenaren mendeko m^{6}A, *XPO1*, *METTL3* eta *YTHDF1* mailak, baita ondorengo hantura efektuak aurkezten dituzte

Lortutako emaitzak baieztatzeko EZ gaixoen eta kontrolen heste meharreko biopsiak erabili ziren. Arrisku aleloa daukaten pertsonek XPO1 proteina maila altuagoak dituztela ikusi genuen (3.Irudia A), hau da, EZrekin asoziaturiko SNPak XPO1en proteina mailan eragiten duela baieztatu genuen, eta gaixotasuna pairatzeko arriskuan eragina duela (pQTL).

m^{6}A maila orokorrak ere kuantifikatu genituen eta EZ aktibodun pazienteen (diagnostikatu berri) biopsiek kontrolenak baino metilazio maila altuagoa dutela ikusi genuen (3.Irudia B). Kontrolekin alderatuta, EZ aktiboen taldean adierazpen altuagoa ikusi genuen gene guztietan (3.Irudia C, D, E, F). Gainera, glutenik gabeko dietan (GGD) zeuden EZdun gaixoetan, m^{6}A maila orokorrak (3.Irudia B) eta gene guztien adierazpen (3.Irudia C, D, E, F) balioak normaltasunera itzuli ziren.

Orokorrean, emaitza hauek aurretik ikusitako ondorioak berresten dituzte eta glutenak m^{6}A makineria aktibatzean eta EZ gaixoetan eragindako *XPO1* eta *IL8* indukzioaren garrantzia azpimarratzen dute.

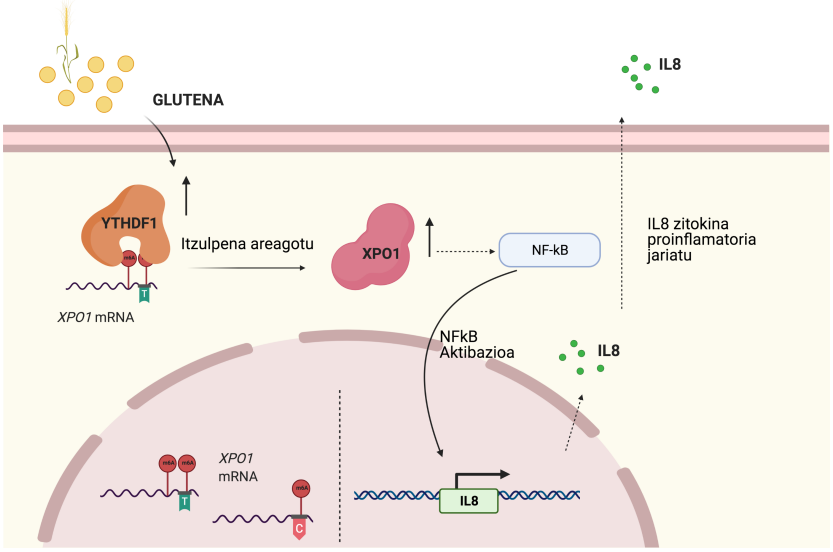
3. irudia. EZrekin asoziaturiko arrisku aldaera duten gaixoek XPO1 proteina maila altuagoak dituzte eta glutenaren mendeko m^{6}A, *XPO1*, *METTL3* eta *YTHDF1* mailak, baita ondorengo hantura efektuak aurkezten dituzte . (A) DNA eta proteina kontrolen hesteetako biopsietatik erauzi ziren, XPO1 mailak ELISA bidez neurtu eta rs3087898 genotipatu ziren. XPO1 proteina mailak babes genotipoa (CC) duten pertsonen eta arrisku aleloa dutenen artean (CT + TT) alderatu ziren. **(B)** RNA kontrolen biopsietatik (KTR), zeliako aktiboetatik (EZ) eta glutenik gabeko dietan egondako zeliakoetatik (GGD) erauzi zen. RNA metilazioa m^{6}A dotblot bidez kuantifikatu zen. **(C, D, E, F)** m^{6}A makineria, *XPO1* eta *IL8* mRNA adierazpen kuantifikazioa qPCR bidez. (+p<0,1; * p <0,05; **p<0,01, ***p<0,001)



4. Ondorioak

Gure lanak frogatu du gaixotasun autoimmune eta inflamatorioekin asoziaturiko SNP ez kodetzaileek m^{6}A mailak alda ditzaketela eta gaixotasunaren patogenesian eragin dezaketela.
Glutena EZan erantzun immunitarioaren aktibatzaile gisa proposatu bada ere, glutenarekiko tolerantzia galtzea eragiten duten lehen urratsen inguruan ezer gutxi dakigu. Gure esperimentuek glutena m^{6}A eta YTHDF1 areagotzearekin lotzen dute, eta horrek XPO1 proteina mailak igotzea dakar. Gure datuek m^{6}A makineriaren garrantzia azpimarratzen dute XPO1 mailak baldintzatzen baititu, horrek NFkBren adierazpena eta ondoren, IL8ren indukzioa eragiten du EZ gaixoetan.
Orain arte EZren aurkako tratamendu fidagarri bakarra glutena bizitza osorako dietatik kentzea da, baina gaixotasunaren sintoma gehienak gutxitzen dituen arren, gaixoen bizi kalitatean eta ongizate psikologikoan modu negatiboan eragiten du (Hang et al., 2015). Gure ikerketak glutenaren aurrean erantzuten duen m^{6}A-XPO1-NFkB bidezidor berria plazaratzen du, EZren patogenesian itu dena eta gaixotasunaren balizko alternatiba terapeutiko berria izan daitekeena.

4. irudia. Glutenaren aurrean zelula epitelialetan erantzuten duen m^{6}A-XPO1-NFkB bidezidor berriaren laburpena. Glutenak m^{6}A makineria aktibatzen du eta XPO1en mRNA metilazio mailak areagotzen ditu. YTHDF1 m^{6}A irakurlearen eta XPO1 mRNAren arteko elkarrekintzak itzulpena areagotzea dakar. XPO1 maila altuek NFkB hantura-bidezidorra aktibatzen dute, baita ondorengo IL8 zitokina proinflamatorioaren jariatzea.



5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

m^{6}A irakurle eta ezabatzaileen aurkako molekula txikiak dagoeneko iradoki dira minbizi mota desberdinetarako terapia potentzial gisa (Huang et al., 2020) eta aukera ona izan litezke EZ gaixoen hanturaren aurkako babeserako. Horrez gain, XPO1 inhibitzaileak dagoeneko erabiltzen ari dira minbiziaren aurkako agente terapeutiko gisa eta NFkB jarduera gutxitzeko gaitasuna dutela erakutsi dute (Sendino et al. 2018; Syed, 2019). Beraz, lan honen hurrengo pausua mota honetako inhibitzaileak erabiltzea izango litzake deskribatu dugun m^{6}A-XPO1-NFkB bidezidorra kontrolatu ahal izateko.

6. Erreferentziak

Abadie V, Kim SM, Lejeune T, et al. Il-15, gluten and HLA-DQ8 drive tissue destruction in coeliac disease. Nature 2020;578:600–4.

Caio G, Volta U, Sapone A, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. BMC Med 2019;17:1–20.

Dieli-Crimi R, Cénit MC, Núñez C. The genetics of celiac disease: a comprehensive review of clinical implications. J Autoimmun 2015;64:26–41.

Fernandez-Jimenez N, Castellanos-Rubio A, Plaza-Izurieta L, et al. Coregulation and modulation of NF B-related genes in celiac disease: uncovered aspects of gut mucosal inflammation. Hum Mol Genet 2014;23:1298–310.

Fukuda M, Asano S, Nakamura T, et al. Crm1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. Nature 1997;390:308–11.

Garrote JA, Gómez-González E, Bernardo D, et al. Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2008;47:S27–32.

Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, et al. m 6 A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. Science 2015;347:1002–6.

Gravina GL, Senapedis W, McCauley D, et al. Nucleo-Cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer. J Hematol Oncol 2014;7:85.

Hang Y, Chen W, Li P, et al. Association between coeliac disease and risk of any malignancy and gastrointestinal malignancy. Medicine 2015;94:e1612–7.

Huang H, Weng H, Chen J. M6A modification in coding and non-coding RNAs: roles and therapeutic implications in cancer. Cancer Cell 2020;37:270–88.

Khan D, Sharathchandra A, Ponnuswamy A, et al. Effect of a natural mutation in the 5′ untranslated region on the translational control of p53 mRNA. Oncogene 2013;32:4148‑59.

Kim SM, Mayassi T, Jabri B. Innate immunity: actuating the gears of celiac disease pathogenesis. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2015;29:425–35.
Koranda JL, Dore L, Shi H, et al. Mettl14 is essential for Epitranscriptomic regulation of striatal function and learning. Neuron 2018;99:283–92.
Lu TX, Zheng Z, Zhang L, et al. A New Model of Spontaneous Colitis in Mice Induced by Deletion of an RNA m6A Methyltransferase Component METTL14 in T Cells. Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2020;10:747–61.
Olazagoitia-Garmendia A, Zhang L, Mera P, et al. Gluten-induced RNA methylation changes regulate intestinal inflammation via allele-specific XPO1 translation in epithelial cells. Gut 2021. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322566
Ricaño-Ponce I, Zhernakova DV, Deelen P, et al. Refined mapping of autoinmune disease associated genetic variants with gene expression suggests an important role for non-coding RNAs. J Autoimmun 2016;68:62–74. Sendino M, Omaetxebarria MJ, Rodríguez JA. Hitting a moving target: inhibition of the nuclear export receptor Xpo1/Crm1 as a therapeutic approach in cancer. Cancer Drug Resist 2018;1:139–63.
Shulman Z, Stern-Ginossar N. The RNA modification N6-methyladenosine as a novel regulator of the immune system. Nat Immunol 2020;21:501–12.
Syed YY. Selinexor: first global approval. Drugs 2019;79:1485–94.
Tan DSP, Bedard PL, Kuruvilla J, et al. Promising SINEs for Embargoing Nuclear–Cytoplasmic export as an anticancer strategy. Cancer Discov 2014;4:527–37.
Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. Nature 2014;505:117–20.
Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al. N6-Methyladenosine modulates Messenger RNA translation efficiency. Cell 2015;161:1388–99.
Winkler R, Gillis E, Lasman L, et al. M6A modification controls the innate immune response to infection by targeting type I interferons. Nat Immunol 2019;20:173–82.
Zhang Z, Luo K, Zou Z, et al. Genetic analyses support the contribution of mRNA N6-methyladenosine (M6a) modification to human disease heritability. Nat Genet 2020;52:939–49.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau PGC2018-097573-A-I00 eta ISCIII PI16/00258 ikerketa proiektuen bidez finantziatu da.

Omega-3 gantz-azidoen propietate onuragarriak

Serrano, M.[1,2], Lekunberri, L.[1,2], Soria-Gomez, E.[1,2,3], Bonilla-Del Rio, I.[1,2], Mimenza, A.[1,2], Egaña-HuguetJ.[1,2], Anaut-Lusar, I.[1], Terradillos, I.[1,2], Achicallende, S.[1,2], Puente, N.[1,2], Ramos-Uriarte, A.[1,2], Gerrikagoitia, I.[1,2], Elezgarai, I.[1,2], Rico-Barrio, I.[1,2], Grandes, P.[1,2]

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

Laburpena

Omega-3 gantz-azidoek hainbat onura eragiten dituzte, izan ere, neuronen nahiz sinapsien sorkuntzan parte hartu eta zelulen biziraupena bermatzen dute. Hortaz, gaztaroan garunaren garapena suspertzeko eta antsietatea murrizteko, nahiz zahartzaroan narriadura kognitiboa apaltzeko erabili dira. Efektu onuragarri horiek bideratzeko, neuromodulazioan parte hartzen duen endokannabinoide-sistema baliatzen dute. Azterlan honen helburua omega-3an aberastutako dietak helduaro goiztiarrean memorian nahiz antsietatean onurak eduki ditzakeen aztertzea da. Baita dieta horrek saguen hipokanpoko endokannabinoide-sisteman aldaketa molekularrak eragiten dituen ikertzea ere.

Hitz gakoak: omega-3; endokannabinoide-sistema; hipokanpoa.

Abstract

Omega-3 fatty acids have been shown to play a role in neurogenesis, synaptogenesis and cell survival, thus improving brain development and reducing anxiety in the youth and preventing cognitive decline in elderly people. The omega-3 benefits seem to be conducted, among others, through the endocannabinoid system, but an in-depth knowledge of the molecular events taking place at this system are still poorly understood. The aim of this research is to study whether the effects of a diet enriched in omega-3 has on memory and anxiety in the early adulthood involve the modulation of the endocannabinoid system. Not only that, but also analysing the molecular impact elicited by omega-3 on components of this system in the mouse hippocampus.

Keywords: omega-3, endocannabinoid system, hippocampus.

1. Sarrera eta motibazioa

Omega-3ak lipidoak osatzen dituzten gantz-azido (GA) asegabeak dira. Omega-3 garrantzitsuenak GA poliasegabeak dira, azido dokosahexaenoikoa (DHA) eta azido eikosapentaenoikoa (EPA) hain zuzen ere (Aguilera et al., 2017; Bowen et al., 2016). DHA kantitate handitan dago garunean, izan ere, sinapsien eta neuronen sorkuntzan eta azken horien migrazioan funtsezko papera jokatzen du. Horrez gain, EPA nahiz DHAtik abiatuta sortzen diren molekulek zelulen biziraupena bermatzen dute eragin antiinflamatorio eta antiapoptotikoari esker (Aguilera et al., 2017; Aparicio et al., 2010; Dyall, 2017; Kawakita et al., 2006). Gainera, zelula mintzen fluidotasunean eragiten dute, beraz, zelula kitzikagarrietan omega-3ek seinale-transdukzioan eta mintzari lotutako hartzaile, ioi-kanal eta entzimen aktibitatean eragiten dute (Aguilera et al., 2017; Dyall, 2017).

Ugaztunen GAk eraldatzeko gaitasuna mugatua da. Hori dela eta, omega-3 garrantzitsuenak esentzialak dira, hau da, dietaren bidez bereganatu behar dira. Munduko Osasun Erakundeak omega-3 GAen kontsumoa energia totalaren %1-2a izatea gomendatzen du. Orokorrean, Europan mota horretako GAen kontsumoa eskasa da (Aparicio et al., 2010; Carrero et al., 2005). Rosa Ortega eta bere kideek (2013) agerian utzi zuten helduen artean nahiz eta lipido kontsumo totala gomendatutakoa baino altuagoa izan, GA asegabeen ahorakina, omega-3ena bereziki, baxua zela. Hain zuzen ere, aztertutako populazioaren %85,3aren omega-3 kontsumoa %1ekoa baino baxuagoa zen. Dieta desorekatuetan, omega-3ek ez dituzte beren funtzioak egoki betetzen, eta, beraz, ondorio kaltegarriak eragin ditzakete gure osasunean (Aguilera et al., 2017).

Omega-3an aberastutako dieta haurdun dauden karraskariei emateak kumeen gaitasun motorrak hobetzen ditu epe-luzera, bai nerabezaroan (Coluccia et al., 2009; Janssen et al., 2015) baita

helduaroan ere (Coluccia et al., 2009). DHAk enbrioien zelula-ama neuralen proliferazioa handitzen du eta nerbio-sistema zentralean zelula heriotza saihesten du (Kawakita et al., 2006). Gainera, DHAren ahorakin kronikoak hipokanpoko funtzionaltasuna eta ikasteko gaitasuna hobetzen ditu, bai arratoi gazte zein adinekoetan ere (Gamoh et al., 1999, 2001).

Endokannabinoide-sistema neuromodulazio sistema bat da, zeinak nerbio-sistema zentralaren garapenean, plastikotasun sinaptikoan eta kanpo- nahiz barne-inguruneko estimuluen erantzunean parte hartzen duen (Lu eta Mackie, 2016). Endokannabinoide-sistema hartzailez, endokannabinoidez eta azken horiek sortu eta degradatzeko entzimaz osatuta dago. Hartzaileen kasuan, garrantzitsuenak CB_1 eta CB_2 hartzaileak dira (Dyall, 2017; Lu eta Mackie, 2016).

Omega-3 GAen eta endokannabinoide-sistemaren lotura estua da, izan ere, EPA eta DHA endokannabinoideen aitzindariak dira (Dyall, 2017). Hori gutxi balitz, Pan eta bere kideek (2011) *in vivo* eta *in vitro* egindako analisietan, DHA osagarriaren efektu desiragarriak memoria espazialean endokannabinoide-sistemaren bidez gauzatzen direla agerian utzi zuten. Helduaroko neurogenesiari dagokionez, EPA eta DHA gehigarriek hipokanpoko neurogenesia handitzen dute (Dyall, 2017; Kawakita et al., 2006). Areago EPAk neuronen proliferazioa handitzen du endokannabinoide seinalizazio bideak baliatuz; zehazki, CB_1 eta CB_2 hartzaileen bidez (Dyall et al., 2016).

Ildo horretatik eta mendebaldeko dieten patroia jarraituz, omega-3an eskasa den dietak sistema endokannabinoideko CB_1 hartzailearen funtzionaltasuna kaltetzen du. Horren ondorioz, saguetan, depresio eta antsietate-motako sintomak handitzen dira (Lafourcade et al., 2011; Larrieu, 2012).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Omega-3 GA asegabeak dietaren bidez bereganatu beharreko mantenugaiak dira. Hala ere, mendebaldeko dieta patroiak jarraituz nekez lortzen da gomendatutako kantitatea. Omega-3ak, eta, bereziki DHA, kantitate handitan agertzen dira garunean, eta, beraz, GA asegabe horien gabeziak garun kalteak eragiten ditu. Aitzitik, omega-3etan aberatsa den dietak gazteetan nahiz adinekoetan onura ugari eragiten ditu. Konkretuki, gaitasun motorrak eta ikasteko ahalmena hobetzen ditu, baita hipokanpoko funtzionaltasuna ere.

Horrenbestez, azterlan honek bi helburu nagusi izango ditu. Alde batetik, helduaroan omega-3 osagarriaren eragina portaeran sakontasunez aztertzea. Zehazki, oroimenean, ikas ahalmenean eta antsietatean eragiten dituen efektuak analizatuko dira. Bestalde, omega-3an aberastutako dietak hipokanpoko endokannabinoide-sistemaren osagai nagusietan eragiten dituen aldaketa molekularrak ikertuko dira, CB_1 hartzailean bereziki.

3. Ikerketaren muina

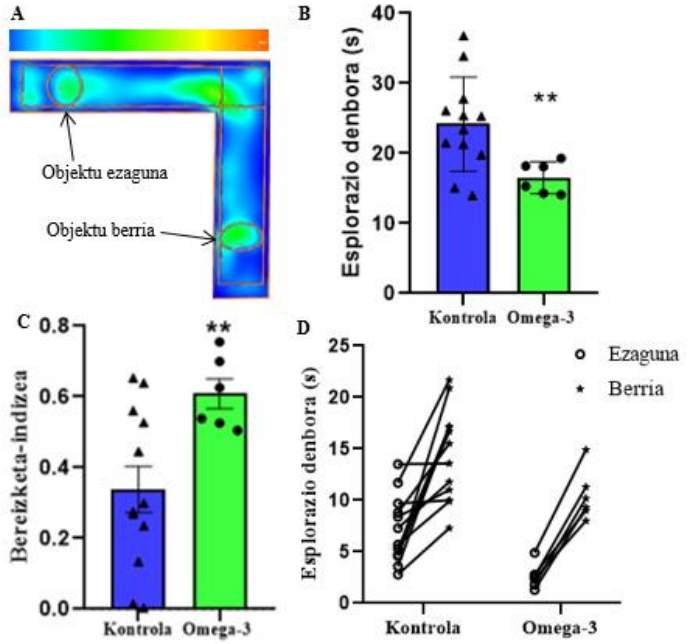
Ikerlan honen helburuak aurrera eramateko, C57BL/6J ar saguek nerabezaroan zehar dieta arrunta jarraitu zuten, eta, horren ostean, helduaro goiztiarrean 15 egunetan zehar EPA eta DHAn aberastutako dieta ezarri zitzaien (1. taula). Horrela, bi talde esperimental sortu ziren: janari arruntarekin elikatutako kontrol taldea (kontrola) eta helduaro goiztiarrean omega-3an aberastutako janariarekin elikatutako taldea (omega-3).

1. taula. Jarraitutako dieta ezberdinen gantz ekarpena

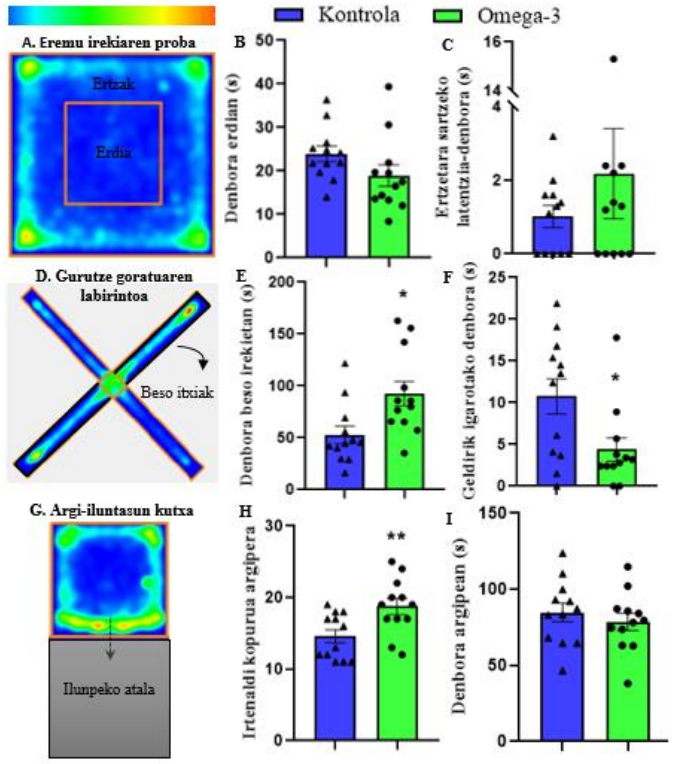
	Dieta arrunta	Omega-3an aberastutako dieta
Gantza (%)	4	5,9
GA poliasegabeak (%)	2,1	3,1
Omega-3 (%)	0,1	0,54
EPA+DHA (%)	-	0,22

3.1. Portaera probak

1. irudia. A)Objektu berrien ezagutza probaren bero mapa B)Esplorazio denbora totala C)Bereizketa-indizea D)Esplorazio denboraren konparaketa objektu ezagunean eta berrian.p<0,01.Balioak t-testaren bitartez analizatu dira. ▲eta ● sinboloek sagu bakoitzaren balioak erakusten dituzte.**



2. irudia. A)Eremu irekiaren probaren bero mapa B)Erdian egondako denbora C)Lehenengo aldian ertzetara sartu arte pasatu den denbora D)Gurutze goratuaren labirintoaren bero mapa E)Beso irekietan igarotako denbora F)Proban zehar geldirik egon diren denbora G)Argi-iluntasun kutxaren bero mapa H)Argi atalera ateratako aldi kopurua I)Argipean egondako denbora. *p<0,05; **p<0,01.Balioak t-testaren bitartez analizatu dira. ▲eta ● sinboloek sagu bakoitzaren balioak erakusten dituzte.



Objektu berrien ezagutza proba

Ezagutze-oroimena neurtzeko objektu berrien ezagutza proba erabili zen. Probaren oinarria karraskariek objektu berriak esploratzeko duten berezko joera da. Lehenengo eta behin, animaliak entrenatzeko asmoarekin, L itxurako labirinto baten muturretan bi objektu berdin kokatzen dira, horiek esplora ditzaten. Hurrengo egunean, objektuetako bat berri batengatik aldatu egiten da eta saguak objektu bakoitza esploratzen duen denbora neurtzen da. Ezagutza-oroimena neurtzeko bereizketa-indizea (BI) erabiltzen da. (1) BI=(denbora objektu berrian – denbora objektu ezagunean)/denbora totala.

Proba hau burutzeko, kontrol taldeko 12 sagu eta omega-3 taldeko 6 sagu erabili dira. Omega-3 taldeak denbora gutxiago esploratzen du kontrol taldearekin alderatuta. Hala ere, bi taldeek bereizketa egokia egiten dute objektu ezagunaren eta berriaren artean, BI>0,3 izanik bi kasuetan. Baina, omega-3 taldearen BIa esanguratsuki altuagoa da (kontrola BI=0,34; omega-3 BI=0,61), nahiz eta objektuak esploratzen egondako denbora kontrolena baino baxuagoa izan (1. irudia). D grafikan sagu bakoitzak objektu ezaguna eta berria esploratzen igarotako denbora ikusi daiteke. Omega-3 taldekoek ez bezala, kontrol taldeko hainbat saguk bi objektuen arteko bereizketa egiten ez dutela behatu daiteke, izan ere, bi objektuak esploratzen egondako denbora oso antzekoa izan da.

Antsietate maila neurtzeko probak

Antsietate maila neurtzeko hiru egunetan zehar 5 minututako hiru proba egiten dira. Probak, talde bakoitzeko 12 sagurekin zertu dira. Lehenengo egunean, eremu irekiaren proba egiten da kutxa karratu batean, zeinen funtsa saguek ertzetan egoteko berezko joera den, izan ere, saguei estutasuna eragiten die erdialdean egotea. Kasu honetan, animalia kutxaren erdian kokatzen da eta era librean mugituko da kutxatik zehar, ertzetan nahiz erditik igaroz. Animalia

erdiko eremuan dagoen denbora neurtzen da, izan ere, erdiko eremu honetan denbora luzez egotea antsietate-maila baxuaren adierazle izango da. Bigarren egunean, gurutze goratuaren labirinto proba egiten da. Labirintoak bi beso itxi, eta beste bi beso ireki edukiko ditu; azken horiek, estutasuna eragingo diete saguei. Kasu honetan, beso irekietan egondako denbora neurtuko da, antsietate-maila baxuaren isla izango dena. Horrez gain, animaliak proban zehar geldi irauten duten denbora neurtuko da, geldi egotea antsietatearen adierazlea da eta. Azken egunean, argi-iluntasun kutxaren proba egiten da. Horretarako, bi ataletan banatuta dagoen kutxa erabiltzen da; kutxaren zati bat ilunpean dago; eta, bestea, saguentzat estresagarria den argipean (2. irudia). Azken proba honetan, saguak argipean dauden denbora neurtuko da; eta, eremu honetan denbora luzeagoa egoteak antsietate-maila baxuagoa adierazten du. Horrez gain, saguek kutxaren atal batetik bestera igarotzen diren aldi kopurua neurtzen da, izan ere, zenbat eta gehiagotan atera argipera, orduan eta antsietate-maila baxuagoa dutela adierazten du. Saguek esploratzeko joera eta ikusmin handia daukate, eta, beraz, orduan eta antsietate gutxiago eduki, labirinto ezberdinetako gune estresagarrietan denbora gehiago egongo dira eremu horiek esploratzeko.

Eremu irekiaren proban, erdian egondako denboran ez dago ezberdintasunik. Proba hasteko, sagua kutxaren erdialdean kokatzen da eta ertzetara lehenengo aldiz sartu arte igaro den denboran ez dago ezberdintasun esanguratsurik taldeen artean ezta ere. Gurutze goratuaren labirintoan, omega-3 taldea denbora gehiago egon da beso irekietan ($p<0,05$); denbora gutxiago, ordea, geldirik ($p<0,05$). Argi-iluntasun kutxaren kasuan, nahiz eta bi taldeen artean argitan igarotako denboran ezberdintasunik ez egon, omega-3 taldea gehiagotan atera da argipera ($p<0,01$).

3.2. Analisi molekularra

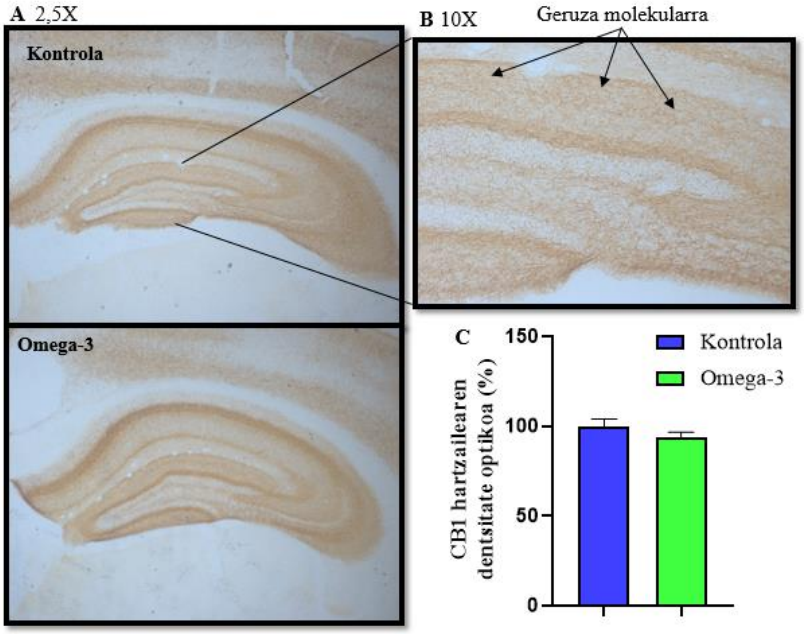
Garunaren erauzketa:

Animaliak %4ko kontzentrazioan dagoen kloral hidratoaren bidez (10mL/kg pisu) anestesiatu ostean; lehenengo, gatz fosfato tanpoia (0,1M PBS, pH7,4) bihotz bidetik perfunditzen da, eta, segidan, fixatzaile bat (80mL %4 paraformaldehido, %0,2 azido pikriko eta %0,1 glutaraldehido, fosfato tanpoian- 0,1M PB, pH7,4-) jartzen da. Ondoren, garunak erauzi eta soluzio fixatzaile berdinean postfixatzen dira 4ºC-tan. Gero, bibratomoan 45 µm-ko koroa-ebaketak egiten dira.

Immunozitokimika:

Tindaketa talde esperimental bakoitzeko hiru sagutan egin zen. Ebaketak ordu erdiz blokeo soluzioan inkubatu ondoren, soluzio berdinean diluitutako anti-CB_1 ahuntz antigorputz poliklonal primarioarekin (2 µg/mL) inkubatzen da egun batez giro-tenperaturan. Hurrengo egunean, garbiketa soluzioan 10 minututako hiru garbiketa egin ostean, laginak ordu betez anti-ahuntz zaldi G-immunoglobulina sekundarioan (1:200) kontaktuan ipintzen dira giro tenperaturan. Hiru garbiketa egin eta gero, ordu betez inkubatzen dira abidina-biotina konplexuarekin, seinalea anplifikatzeko asmoarekin. Garbiketen ondoren, laginak %0,05 diaminobenzidinarekin ipini behar dira kontaktuan 3 minutuz emaitzak errebelatzeko. Fosfato tanpoian azkeneko garbiketak egin ostean, animalia bakoitzeko laginak gelatinizatutako portetan kokatzen dira eta hurrengo egunean, portak alkohol kontzentrazio

3. irudia. A)Kontrol eta omega-3 taldeetako hipokanpo garun eremua 2,5X-ko handipenean B)Kontrolaren hipokanpo garun eremu berdina 10X handipenean C)CB_1 hartzailearen dentsitate optikoaren datu



gorakorretan (%50, %70, %96 eta %100) eta xilolean 5 minutuz murgilduz laginak deshidratatzen dira. Azkenean, DPX izeneko erretxina akrilikoa baliatuz estalkia ipintzen zaio portari.

Mikroskopia optikoa:

Laginak mikroskopioan behatu eta 10x handipenean hipokanpoko geruza molekularraren argazkiak atera dira (3. irudia). Argazkien analisian CB_1 hartzailearen dentsitate optikoa neurtu da eta, horretarako, ImageJ erabili da. Argazkiak zuri-beltzera aldatu eta intereseko geruzan hiru neurketa egin dira, kolore iluntasunaren arabera balio ezberdina dutenak. Hori egin ostean, datuak normalizatzeko, kontrol taldeko balioen batez-bestekoa kalkulatu eta hori %100,0 gisa adierazten da.

Bi taldeen artean ez dago ezberdintasun esanguratsurik CB_1 hartzailearen dentsitate optikoan. Kontrol taldeko CB_1-aren batez-besteko dentsitate optikoa %100,0 gisa adierazten da, eta horren arabera, omega-3 taldeak %93,6-ko dentsitatea dauka.

4. Ondorioak eta eztabaida

Estresaren (Arteaga et al., 2016; Perez et al., 2013) nahiz jaiotzean hipoxia jasatearen (Perez et al., 2017) tratamendu gisa dieta omega-3-an aberasteak memorian dituen onurak azpimarratzekoak dira. Baita omega-3 gehigarriak hartzea adinarekin lotutako gainbehera kognitiboaren kontra ere, memoriarekin erlazionatutako ikasteko gaitasuna hobetuz (Hashimoto et al., 2015). Pusceddu eta bere kideek egindako ikerketan (2015), EPA eta DHA-rekin aberastutako dieta jaso zuten eme osasuntsuek objektu ezaguna gutxiago esploratzen zuten baina bi objektuen arteko bereizketa dieta aberastua jaso ez zuten emeek baino hobeto egiten zuten. Ikerketa honetan, emaitzak ildo berdina jarraitu dute baina ar osasuntsuetan kasu honetan. Omega-3 taldeko kideek objektuak denbora gutxiagoz esploratu zituzten. Esplorazio denbora baxuagoa izan arren, ezagunaren eta berriaren arteko bereizketa egiteko gai ziren, izan ere, omega-3 taldeko animalia guztiek bi objektuen arteko bereizketa egin zuten, kontrolek ez bezala. Beraz, helduaroan zehar dieta omega-3-an aberasteak ikasteko gaitasuna normalizatu eta banakoen arteko aldakortasuna murrizten du, ezagutze-oroimena hobetuz.

Antsietateri dagokionez, estres egoeran dauden (Perez et al., 2013) nahiz osasuntsu dauden karraskari gazteetan (Pusceddu et al., 2015), omega-3 osagarriak, eta bereziki EPAk (Oshima et al., 2018), antsietatearekin erlazionatutako jokabideak murrizten ditu. Azterlan honetan, helduaroan zehar omega-3an aberastutako dietak estutasun maila jaisten duela frogatu da. Eremu irekiaren proban ez dira ezberdintasun esanguratsurik ikusi bi taldeen artean, baina beste bi probek agerian utzi dute omega-3 taldeak antsietate gutxiago pairatzen duela.

CB_1 hartzailearen dentsitateari dagokionez, ikerketak eskasak dira eta eztabaida abian dago. Alde batetik, *in vitro* egindako esperimentuetan, neuronen CB_1 hartzailearen espresioa handitzen doa DHA kontzentrazioa igo ahala (Pan et al., 2011). Bestalde, EPA eta DHA-n aberastutako dieta eta dieta arrunta jarraitutako C57BL/6J saguen artean ez zen ezberdintasunik behatu garuneko CB_1 hartzailearen ARNm mailetan (Yamada et al., 2014). Ikerketa honetan, Yamada eta bere kideek (2014) lortutako emaitzen ildoa jarraituz, ez dugu ezberdintasun esanguratsurik ikusi CB_1 hartzailearen dentsitate optikoan. Azterlan honetan saguek dietaren bitartez bereganatzen dituzte omega-3ak, eta, beraz, baliteke CB_1 hartzailearen espresioa handitzeko garuneko DHA maila nahikoa ez igotzea. Nahiz eta CB_1 hartzailearen dentsitatean aldaketarik ikusi ez ditugun, DHA gehigarriek zelula mintzetako kolesterolaren kanporaketa bultzatzen du (Stillwell eta Wassall, 2003), CB_1 hartzailearen aktibitatea emendatzen duena (Bari et al., 2005).

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Omega-3 GAei efektu onuragarri anitzak atxikitzen zaizkie, bereziki garunaren funtzionaltasunari lotuta. Hori dela eta oso erabilia izan da haurdunaldi eta jaiotza ostean (Coluccia et al., 2009; Janssen et al., 2015) nahiz zahartzaroan (Gamoh et al., 2001; Hashimoto et al., 2015). Gure ikerketan, heldu osasuntsuetan dieta omega-3an aberastea faboragarria dela ikusi dugu hainbat alderditan, hain zuzen ere, ezagutza-oroimenarekin eta antsietatearekin erlazionatutako jokabideak hobetzeko. Ildo beretik, beste memoria mota batzuetan zein gaitasun motorretan eragin onuragarriak dituen aztertzea interesgarria izango litzateke. Baita onura horietan guztietan endokannabinoide sistemaren rola aztertzeke dago oraindik ere. Horrez gain, gure laborategian nerabezaroan alkohola edateak garunean eragiten dituen kalteak ikertu dira

(Peñasco et al., 2020; Rico-Barrio et al., 2019). Omega-3 GAetan aberastutako dietak nerabezaroan zehar alkoholak sortutako kalte horiek murrizteko edota leheneratzeko tratamendu ez farmakologiko gisa erabili daitekeen aztertzea izango da etorkizunerako erronka.

6. Erreferentziak

Arteaga, O., Revuelta, M., Urigüen, L., Martínez-Millán, L., Hilario, E. eta Álvarez, A. (2017), Docosahexaenoic acid reduces cerebral damage and ameliorates long-term cognitive impairments caused by neonatal hypoxia-ischemia in rats, Molecular Neurobiology, 54, 7137-7155.

Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Finazzi-Agròs, A. eta Maccarrone, M. (2005), Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells, The Journal of Biological Chemistry, 250, 12212-12220.

Bowen, K.J., Harris, W.S. eta Kris-Etherton, P.M. (2016), Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Are there benefits?, Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine, 18.

Carrero, E., Martín-Bautista, E., Baró, L., Fonollá, J., Jiménez, J., Boza, J.J. eta López-Huertas, E. (2005), Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta, Nutrición Hospitalaria, 1, 63-69.

Coluccia, A., Borracci, P., Renna, G., Giustino, A., Latronico, E., Riccio, P. eta Carratù, M.R. (2009), Developmental omega-3 supplementation improves motor skills in juvenile-adult rats, International Journal of Developmental Neuroscience, 27, 599-605.

Dyall, S.C., Mandhair, H.K., Fincham, R.E.A., Kerr, D.M., Roche, M. eta Molina-Holgado, F. (2016), Distinctive effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in regulating neural stem cell fate are mediated via endocannabinoid signalling pathways, Neuropharmacology, 107, 387-395.

_____ , (2017), Interplay between n-3 and n-6 long chain polyunsaturated fatty acids and the endocannabinoid system in brain protection and repair, Lipids, 52, 885-900.

Gamoh, S., Hashimoto, M., Sugioka, K., Shahdat-Hossain, M., Hata, N., Misawa, Y. eta Masumura, S. (1999), Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats, Neuroscience, 93, 237-241.

_____ , (2001), Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats, Clinical and Experimental Pharmachology and Physiology, 28, 266-270.

Gil, A. (2017): Tratado de nutrición. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición, Editorial Médica Panamericana, Madrid.

_____ (2010): Tratado de Nutrición. Tomo III. Nutrición Humana en el Estado de Salud, Editorial Médica Panamericana, Madrid.

Hashimoto, M., Katakura, M., Tanabe, Y., Al Mamun, A., Inoue, T., Hossain, S., Arita, M. eta Shido, O. (2015), n-3 datty acids effectively improve the reference memory-related learning ability associated with increased brain docosahexaenoic acid-derived docosanoids in aged rats, Biochimica et Biophysica Acta, 1851, 203-209.

Janssen, C.I.F., Zerbi, V., Mutsaers, M.P., de Jong, B.S.W., Wiesmann, M., Arnoldessen, I.A.C., Geenen, B., Heerschap, A., Muskiet, F.A.J., Jouni, Z.E., van Tol, E.A.F., Gross, G., Homberg, J.R., Berg, B.M. eta Kiliaan, A.J. (2015), Impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on cognition, motor skills and hippocampal neurogenesis in developing C57BL/6J mice, Journal of Nutritional Biochemistry, 26, 24-35.

Kawakita, E., Hashimoto, M. eta Shido, O. (2006), Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo, Neuroscience, 139, 991-997.

Lafourcade, M., Larrieu, T., Mato, S., Duffaud, A., Sepers, M., Matias, I., De Smedt-Peyrusse, V., Labrousse, V.F., Bretillon, L., Matute, C., Rodríguez-Puertas, R., Layé, S. eta Manzoni, O.J. (2011), Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions, Nature Neuroscience, 14, 345-350.

Larrieu, T., Madore, C., Joffre, C. eta Layé, S. (2012), Nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signalling pathway in the brain and associated anxiety-like behavior in mice, Journal of Physiology and Biochemistry, 68, 671-681.

Lu, H.C. eta Mackie, K. (2016), An introduction to the endogenous cannabinoid system, Biological Psychiatry, 79, 516-525.

Ortega, R.M., González, L.G., Villalobos, T.K., Perea, J.M., Aparicio, A. eta López, A.M. (2013), Fuentes alimentarias y adecuación de la ingesta de ácidos grasos omega-3 y omega-6 en una muestra representativa de adultos españoles, Nutrición Hospitalaria, 28, 2236-2245.

Oshima, Y., Watanabe, T., Endo, S., Hata, S., Watanabe, T., Osada, K. eta Takenaka, A. (2018), Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on anxiety-like behavior in socially isolated rats, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 82, 716-723.

Pan, J.P., Zhang, H.Q., Guo, Y., Xiao, N., Cao, X.H. eta Liu, L.J. (2011), Some subtypes of endocannabinoid/endovanilloid receptors mediate docosahexaenoic acid-induced enhanced spatial memory in rats, Brain Research, 15, 18-27.

Peñasco, S., Rico-Barrio, I., Puente, N., Fontaine, C.J., Ramos, A., Reguero, L., Gerrikagoitia, I., Rodríguez de Fonseca, F., Suarez, J., Barrondo, S., Aretxabala, X., García del Caño, G., Sallés, J., Elezgarai, I., Nahimey, P.C., Christie, B.R. eta Grandes, P. (2020), Intermittent ethanol exposure during adolescence impairs cannabinoid type 1 receptor-dependent long-term depression and recognition memory in adult mice, Neuropsychopharmacology, 45, 309-318.

Perez, M.A., Terreros, G. eta Dagnino-Sublabre, A. (2013), Long-term ω-3 fatty acid supplementation induces anti-stress effects and improves learning in rats, Behavioral and Brain Functions, 9.

_____ , (2017), n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation restored impaired memory and GABAergic synaptic efficacy in the hippocampus of stressed rats, Nutritional Neuroscience, 21, 556-569.

Pusceddu, M.M., Kelly, P., Ariffin, N., Cryan, J.F., Clarke, G. eta Dinan, T.G. (2015), n-3 PUFAs have beneficial effects on anxiety and cognition in female rats: Effects of early life stress, Psychoneuroendocrinology, 58, 79-90.

Rico-Barrio, I., Peñasco, S., Puente, N., Ramos, A., Fontaine, C.J., Reguero, L., Giordano, M.E., Buceta, I., Terradillos, I., Lekunberri, L., Mendizabal-Zubiaga, J., Rodríguez de Fonseca, F., Gerrikagoitia, I., Elezgarai, I. eta Grandes, P. (2019), Cognitive and neurobehavioral benefits of an enriched environment on young adult mice after chronic ethanol consumption during adolescence, Addiction Biology, 24, 969-980.

Stillwell, W. eta Wassall, S.R. (2003), Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid, Chemistry and Physics of Lipids, 126, 1-27.

Yamada, D., Takeo, J., Koppensteiner, P., Wada, K. eta Sekiguchi, M. (2014). Modulation of fear memory by dietary polyunsaturated fatty acids via cannabinoid receptors, Neuropsychopharmacology, 39, 1852-1860.

7. Eskerrak eta oharrak

Hauen babes eta finantzioazioari esker egin da lan hau: Eusko Jaurlaritza (IT1230-19); Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III (ISC-III) eta Europar Batasunaren Europako Eskualde Garapenerako Funtsa (ERDF-EU; RD16/0017/0012); MINECO/FEDER, UE (SAF2015-65034-R); Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-107548RB-I00); Ikerbasque eta MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad) PGC2018-093990-AI00 (MICIU/AEI/FEDER, UE) (E.D.G); MS, LL, IT eta SA-ren Euskal Herriko Unibertsitateko doktoratu aurreko ikertzaileen kontratuak (PIF 19/164; PIF 18/315; PIF 17/292 et PIF 16/251) eta AM-ren Eusko Jaurlaritzako doktoratu aurreko ikertzaile kontratua; JEH doktorearen kontratua (PIC 280/20), eta IBDR doktorearena (BES-2016-076766).

Erizaintzako ikasleen heziketaren eragina elikadura-sinesmen eta elikadura-aukeraketan

San Juan, A.[1], Lamas, M.M.[2,3], Fernández, J.[1], Caballero, S.[1], Ayesta, I.[1], Gravina, L.[1,2]
1 Erizaintza Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Leioa, Bizkaia
2 Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketa Institutoa, Barakaldo, Bizkaia
3 Osakidetza, Bilbo-Basurtuko Erakunde Sanitario Integratua, Basurtuko Unibertsitate Ospitalea, Bilbao, Bizkaia
ainara.sanjuan15@gmail.com

Laburpena

Euskal Herriko Unibertsitateko (EHU) erizaintzako lehen mailako ikasleek elikadura ikasgaia jaso ondoren elikadura sinesmenetan eta hautaketetan izandako aldaketak aztertzen dira ikerketa honetan. Parte-hartzaileek lauhileko batean 3 aldiz bete zuten Internet bidez hurrengo atalak biltzen zituen galdetegi bat: datu antropometrikoak; sinesmen arrazional eta irrazionalak; eta elikadura plater osasungarrien aukeraketa. Nahiz eta ikasleek sinesmen arrazionalen maila altua erakutsi zuten, sinesmen irrazionalen eta plateren hautaketa ez osasungarrien artean lotura handia nabarmendu zen. Nutrizio-ikasgaia jasotzeak sinesmen irrazionalen zuzenketa ahalbidetu zuen, elikadura aukera osasungarriak hobetuz.

Hitz gakoak: elikadura-sinesmenak, elikadura-aukeraketa, ikasleak, erizaintza, nutrizioa.

Abstract

This study analyzes the changes in the beliefs and food choices of first-year nursing students at the University of the Basque Country (EHU/UPV) after receiving the nutrition course. For this purpose, participants completed an online questionnaire with anthropometric data, rational and irrational beliefs and a questionnaire on healthy food choices 3 times during a four-month period. Although students showed a high level of related rational beliefs, irrational beliefs were related to a high level of choosing unhealthy dishes. Teaching the nutrition course allowed a correction of irrational beliefs by improving healthy food choices.

Keywords: dietary beliefs, dietary choice, students, nursing, nutrition.

1. Sarrera eta motibazioa

Bizi-ohiturak gure osasunaren determinatzailerik handiena dira, gure bizimodu eta jokabideen multzoa biltzen dituela. Gizarteak bizimolde osasungarriak sustatzeko duen garrantzia ingurunearen araberakoa da. Unibertsitatera sartzeak bizimodu-aldaketa dakar: estresa, betebehar akademikoak, ikasketa ordutegi luzeak, freskagarri edota alkohol kontsumoa, aurrez prestatutako kaloria altuko jakiak, janari azkarra eskuratzeko erraztasuna, eta produktu osasungarrien prezio altuak (de-Mateo-Silleras *et al.*, 2019). Lagunen eta senideen influentziek ere eragina dute elikadura-jokabideetan (Sogari *et al.,* 2018). Ikasleen artean dieta kaltegarria eramateko hainbat arrisku faktore identifikatu dira, hala nola; osasun mental txarra eta drogen kontsumoa (Aceijas *et al.*, 2017). Gainera, ikasle askok onartu dute elikagaien aukeraketa haien eskuragarritasuna, zaporea, prezioa eta janaria prestatzeko edo jateko duten denboraren araberakoa dela, elikagaien ezaugarri nutrizionalak alde batera utzita (Abraham, R. Noriega eta Shin, 2018). Osasungarriak ez diren bizi-ohiturak eramateak eragin nabarmena du gazteen osasunean, adibidez, gizentzearekin eta buruko osasunaren okertzearekin (Aceijas *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2021). Kirola praktikatzen duten ikasleek, ordea, bizimodu osasuntsuari buruzko kontzientzia handiagoa dute eta gehiago zaintzen dute beraien dieta (Sogari *et al.*, 2018).

Unibertsitateko ikasle gazteen elikadura-ohitura ez osasungarriak kaltegarriak dira haien etorkizuneko nutrizio-ohiturentzako, eta ondorioz, haien osasunerako arriskutsuak. Horregatik unibertsitateko ikasleen artean nutrizio-ezagutza eta bizi-ohitura osasungarriak hobetzeko premia dago (Yahia *et al.*, 2016). Gazteen artean bizimodu osasungarriak sustatzea eta ezagutza zientifikoa eta pentsamendu kritikoa garatzea garrantzitsua da elikadura-mito faltsuetan erortzea saihesteko (Fundación Española de la Nutrición, 2013). Unibertsitate-ingurunea da gazteen ohiturak aldatzeko tokirik eraginkorrenetako bat, eta horregatik unibertsitate-aldian jasotako informazioa funtsezkoa izan daiteke helburu hori lortzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Sinesmenak eta ezagutza kontzeptu desberdinak dira. Lehenengoak pertzepzioan oinarritzen dira, eta ezagutza, berriz, ideiak eta gertakarietan (Worsley, 2002). Adibide bat jartzearren, publizitateak gure sinesmenetan eragina izan dezake light produktuek koipea galtzen laguntzen dutelakoan. Hala ere, bizipenek eta ezagutza zientifikoak erakutsi digute gorputzeko gantza pixkanaka galtzen dela dietaren ekarpen energetikoa gastu energetikoa baino txikiagoa denean. Beraz, azukrerik gabeko edariak kaloria eskasia lortzen lagundu dezake, eta horrek pisua galtzeko prozesua bultzatzen du (Fundación Española de la Nutrición, 2013).

Logikoa dirudi nutrizio-ezagutzek elikagaiak kontsumitzeko erabakietan eragina dutela pentsatzeak. Aurretik egindako ikerketek erlazio hori frogatu badute ere (Rivera Medina *et al.*, 2020), elikadurari buruzko ezagutzak edo prestakuntza egokia izatearen eta nozio horiek praktikan jartzearen artean alde handia dago (Sogari *et al.*, 2018). Elikagaien aukeraketan pisu handia dute aldagai sozialek. Hala nola, esperientzia pertsonalak, ideia kulturalak, baliabideak, testuinguruak eta balioek, besteak beste (Sobal eta Bisogni, 2009). Hala badakigu, elikadura-inguruneak elikadura-erabakiak baldintzatzen dituela neurri handi batean, testuinguru sozioekonomikoak bizi-ohituretan duen eragina erakutsiz (Gravina *et al.*, 2020). Bestalde, norbanakoen interesek eta kezkek ere eragina dute elikaduran: pisua galtzeko, ilearen eta azalaren egoera hobetzeko, edo gehigarririk gabeko jakiak bilatzeko helburuarekin dieta baldintzatu eta bideratuz (Worsley, 2002).

Aurretik egindako elikadura-ohitura osasungarriak sustatzeko beste hezkuntza interbentzio batzuk (nutrizio-programak, hitzaldiak eta online materialak) eraginkorrak izan dira hainbat herri eta adinetako ikasleen sinesmenak, ezagutzak eta dietaren kalitatea hobetzeko (Yarrow, Remig eta Higgins, 2009; Evans *et al.*, 2016; Duan *et al.*, 2017; Hamulka *et al.*, 2018). Nutrizio-prestakuntza jasotzen duten unibertsitateko ikasleei dagokienez, elikadura-ezagutzaren eta -ohituren artean lotura bat dagoela frogatu da (Rivera Medina *et al.*, 2020). Elikadura-aukeraketan ere hobekuntzak nabari dira, nutrizio balio osasungarriagoek, aukera osasuntsuekiko joerak eta fruta eta barazkien kontsumo areagotzeak erakusten duten bezala (Abraham, R. Noriega eta Shin, 2018). Espainiar unibertsitateetan, esparru honetan egindako interbentzioek antzeko emaitzak izan dituzte, ikasleen nutrizio-ezagutzak hobetuz (Sánchez *et al.*, 2017).

Osasun Zientzietako unibertsitate-graduko ikasleek jasotzen duten hezkuntza haien nutrizio-ezagutza hobetzeko eta bizimodu osasungarria sustatzeko lehen urratsa izan daiteke, (Sogari *et al.*, 2018) aurretik deskribatu den bezala Medikuntza eta Erizaintzako ikasleek ez baitute dieta egoki eta orekaturik jarraitzen (Antonopoulou et al. 2020). Oraindik ez da ezagutzen unibertsitate hezkuntza horrek ikasleen osasunean eta bizi-ohituretan izan dezakeen eragina. Horregatik, interesgarria litzateke nutrizio hezkuntzak Euskadiko osasun-arloko unibertsitate-ikasleengan izan dezakeen eragina ezagutzea.

Hala, ikerketa honen helburu nagusia Euskal Herriko Unibertsitateko (EHU) Erizaintza Graduko ikasleek elikadurari buruzko irakasgaia jasotzeak elikadura-sinesmen arrazional eta irrazionaletan duen eragina ebaluatzea izan zen, eta baita sinesmen horien eta elikagai osasungarrien aukeraketen arteko lotura ezagutzea ere. Horretarako, honako helburu espezifiko hauek proposatzen dira:

2.1. Helburu espezifikoak

1) Nutrizio-ikasgaia jaso ondoren erizaintzako ikasleen elikadura-sinesmenetan emandako aldaketak zehaztea.

2) Nutrizio-ikasgaia jaso ondoren erizaintzako ikasleen elikadura-hautaketetan izandako aldaketak zehaztea.

3) Elikadura-aukeraketaren eta elikadura-sinesmenen artean emandako lotura aztertzea, lehen lauhilekoaren hasieran eta amaieran.

4) Elikadura-aukeraketa txarrean eragin dezaketen elikadura-sinesmen irrazionalak zein diren aztertzea.

3. Ikerketaren muina

3.1. Diseinua

Ikerketa hau Euskal Herriko Unibertsitateko (EHU) Medikuntza eta Erizaintza Fakultatean egin zen 2019ko iraila eta abendu bitartean. Erizaintzako Graduko 1. Mailako 193 ikasle gonbidatuak izan ziren ikerketan parte hartzera. Parte-hartzaile guztiei azterlanaren berri eman zitzaien eta borondatez parte hartu zuten. Ikerlana EHUko Gizakien Ikerketarako Etika Batzordeak onartu zuen (CEISH, M10_2019_175).

Parte-hartzaileek galdetegi bat bete zuten on-line, eta bertan datu antropometrikoak (adina, sexua, pisua eta altuera) eta elikadura-sinesmen arrazional eta irrazionalei buruzko eta elikadura plater osasuntsuen aukeraketari buruzko datuak jaso ziren. Datuak hiru alditan bildu ziren: ikastaroa hasi eta 3 astera (T0 edo 0 denbora), 6 astera (T1) eta 12 astera (T2). T1 eta T2 denboretan ikasleek nutrizioari buruzko irakaskuntza jaso zuten, 1. mailako lehen lauhilekoan ematen den "Giza Gorputzaren Egitura eta Funtzioa II" (EFII) irakasgaiaren bitartez.

3.2. Interbentzioa

"Giza Gorputzaren Egitura eta Funtzioa II" oinarrizko irakasgaia da, 6 ECTS kreditu ditu (European Credit Transfer System) eta 15 asteko iraupena du. 6 kreditu horietatik 3,6 mantenugaiei eta haien metabolismo zelularrari buruzko irakaskuntzan oinarritzen dira (9 astez), eta 2,4 kreditu elikadura osasungarriari buruzko prestakuntzari dagozkie (6 astez). Nutrizioari buruzko esku-hartzea azken 6 asteetan burutu zen (T1-T2) nutrizio-prestakuntzari buruzko klase magistral gisa. Kontzeptu hauek landu ziren: makro- eta mikro-nutrienteak, indize gluzemikoa, bitaminak eta mineralak, dieta orekatua eta Dieta Mediterraneoa, eta baita elikadura plater osasungarrien aukeraketari buruzko pentsamendu kritikoa sustatzera bideratutako praktikak. Irakaskuntza metodologia tradizionala izan da: materiaren aurkezpena, eta nork bere dieta banaka ebaluatzeko klase praktikoak (4 ordu).

3.3. Neurketa tresnak

Elikadura-Sinesmenen Eskala erabili zen. Bi azpieskala ditu: Elikadura-Sinesmen Irrazionalak eta Elikadura-Sinesmen Arrazionalak (Jáuregui Lobera eta Bolaños 2010; Osberg et al. 2008). *Elikadura-Sinesmen Irrazionalen* azpieskalak 41tik 164ra arteko puntuazioa du, non puntuazio handiago batek sinesmen irrazional gehiago daudela adierazten duen. Eskala 41 itemez osatuta dago, eta haien puntuazioa handitzen doa sinesmen irrazionala sendoagoa den heinean. *Elikadura-Sinesmen Arrazionalen* azpieskalak 16 eta 64 puntu arteko balioak izan ditzake, eta puntuazio handiago batek sinesmen arrazional gehiago egotea suposatzen du. Eskala 16 itemek osatzen dute, eta sinesmen arrazionala sendoagoa denean item bakoitzaren puntuazioa handitzen da.

Platerrak aukeratzeko galdetegi bat erabili zen, 12 itemez osatua, eta bakoitzeko hiru aukera aurkezten ziren: plater osasungarri bat, hain osasuntsua ez zen beste bat, eta ez oso osasungarria zen hirugarren plater bat. Galdetegian erabilitako platerrak unibertsitate-kanpuseko establezimenduetan eskainitako plater errealak ziren, non nutrizionista talde batek platerren kalitatea ebaluatu zuen Dieta Mediterraneoan oinarrituz. Plater osasungarrien eta ez oso osasungarrien aukeraketa zenbatu egin zen. Plater osasungarrien aukeraketa neurtzeko, 0 eta 12 mailen arteko Likert eskala erabili zen, eta aukera osasungarri bakoitzeko puntu bat zenbatu zen. Osasungarriak ez ziren plateren aukerak neurtzeko, eskala berdina erabili zen, baina hautaketa ez osasungarriak zenbatzen ziren. Galdetegiak analisi faktorial baieztagarriaren bidez ebaluatu ziren, korrelazio polikorikoen matrizearen gainean haztatutako gutxieneko karratuak kalkulatzeko metodo sendoa erabiliz. Elikadura-kontsumoaren maiztasunari buruzko galdetegiarekin (Trinidad Rodríguez et al. 2008) konbergentea zen balioztatu zen, Spearmanen korrelazioen eta haren fidagarritasunaren bitartez, alpha ordinal koefizientea barne-sendotasun gisa; eta denbora-egonkortasuna korrelazio polikorikoak erabiliz test-retets analisiaren bidez. Nahiz eta dimentsio bakarreko ereduaren doikuntzaren emaitzak baxuak izan (CFI=0,900, TLI=0,880, RMSEA=0,110 (IC =0,093-0,138) eta SRSR=0,119), galdetegi horien eta elikadura-kontsumoaren maiztasunaren artean lotura moderatua dago (0,38) fidagarritasun handi batekin (0,84), barne-sendotasunari eta aldi baterako egonkortasunari dagokienez.

3.4. Analisi estatistikoa

Aldagai kuantitatiboak batezbestekoa eta desbiderapen estandarraren bidez deskribatu ziren, eta aldagai kategorikoen maiztasun eta ehunekoak atera ziren. T0 (basala), T1 (pre) eta T2 (post) eskaletako puntuazioak Wilcoxonen zeinu probarekin alderatu ziren. Elikadura-Sinesmen Irrazionalen eskaletako itemak McNemar-en testaren bidez konparatu ziren. Aldagai kuantitatibo jarraituak Spearmanen korrelazio-koefizientea erabiliz alderatu ziren. Analisi estatistikoak STATA softwarearekin egin ziren (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP.). Grafikoak egiteko Microsoft Excel erabili zen (Microsoft Corporation, 2019). Adierazgarritasun estatistikoa $p<0,05$ mailan ezarri zen.

3.5 Emaitzak

Guztira 160 ikaslek parte hartu zuten ikerketan (145 emakume eta 15 gizon), 18 eta 48 urte bitartekoak eta 19,3 ± 3,8 urteko batezbesteko adinarekin. Galdetegia 106 ikaslek bete zuten hiru neurketa-denboretan (95 emakume eta 11 gizon), 18 eta 29 urte bitartekoak eta 18,8 ± 1,7 urteko batezbesteko adina zutenak.

3.5.1. Elikadura-sinesmenak eta elikadura-aukeraketak

Maila basalean (T0) sinesmen arrazionalen ehunekoa (%63,25) sinesmen irrazionalena (%36,75) baino handiagoa izan zen. Sinesmen arrazionalek gora egin zuten pixkanaka, eta %2,2 hobetu ziren EFII ikasgaia ikasi ondoren ($p<0,01$). Aldiz, sinesmen irrazionalak %1,8 gutxitu egin ziren lauhilekoaren lehenengo 6 astetan, hau da, T0-T1 bitartean ($p<0,01$), eta %6,1 nutrizio-interbentzioaren ondoren, edo T1-T2 bitartean ($p<0,001$). Guztira, sinesmen irrazionalen %7,9-ko murrizketa egon zen ikasturte hasieratik ($p<0,001$).

Elikagaien aukeraketari dagokionez, ikasleek egoki aukeratu zituzten galdetegian eskainitako plater osasungarrien %40,3-a, eta osasungarriak ez ziren plateren %43,5-a. 6. Lauhilekoaren lehenengo 6 asteen ondoren, T0tik T1era, plater osasungarrien aukeraketa egokia %3,1 gutxitu zen ($p<0,05$), eta plater ez osasungarrien aukeraketa desegokia %4,2 handitu zen ($p<0,01$). Nutrizio-ikasgaian zehar, hau da, T1etik T2ra, aldaketa esanguratsurik ez zen egon. Hala ere, hasierako neurketaren eta lauhilekoaren amaiera artean, hau da, T0 eta T2 tartean, beherakada nabarmena ikusi zen: aukera osasuntsuak %3 murriztu ziren ($p<0,05$) eta aukera ez osasungarriak %3,7 handitu ziren.

1. Taula. Erizaintzako ikasleen elikadura-sinesmenen eta elikadura-aukeraketen informazio deskriptiboa (batezbestekoak, desbideratze estandarrak, minimoak eta maximoak)

	n	mean±DS	Min	Max
Elikadura-sinesmen irrazionalak (T0)	157	72,41±11,1	47	96
Elikadura-sinesmen irrazionalak (T1)	156	71,2±14,8[a]	44	137
Elikadura-sinesmen irrazionalak (T2)	152	66,8±13[b,c]	44	105
Elikadura-sinesmen arrazionalak (T0)	157	48,6±3,8	39	58
Elikadura-sinesmen arrazionalak (T1)	156	48,7±5	22	60
Elikadura-sinesmen arrazionalak (T2)	150	49,6±5[c]	31	64
Elikagai-aukeraketa osasungarria (T0)	145	4,4±2,6	0	11
Elikagai-aukeraketa osasungarria (T1)	148	4,1±2,5[a]	0	11
Elikagai-aukeraketa osasungarria (T2)	149	4,1±2,6[c]	0	11
Elikagai-aukeraketa ez osasungarria (T0)	145	3,9±2,3	0	9
Elikagai-aukeraketa ez osasungarria (T1)	148	4,3±2,2[a]	0	9
Elikagai-aukeraketa ez osasungarria (T2)	149	4,3±2,3[c]	0	9

Wilcoxonen zeinu proba $p<0.05$: [a]T0 vs. T1, [b]T1 vs. T2, [c]T0 vs. T2

3.5.2. Sinesmenen eta aukeraketen arteko lotura

Elikadura-sinesmen irrazionalen eta arrazionalen artean erlazio negatiboa ikusi zen (p<0,05). Gainera, elikadura-sinesmen irrazionalen eta hiru neurketa-denboretako plater osasungarrien aukeraketaren artean erlazio negatiboa nabarmendu zen (p<0,05), eta erlazio hori positiboa izan zen aukera ez osasungarriekiko (p<0,05).

2. Taula. Elikadura-sinesmenen eta elikadura-aukeraketa osasungarri eta ez osasungarrien arteko Spearmanen korrelazioak (ρ (rho))

	Sinesmen irrazionalak (T0)			Sinesmen irrazionalak (T1)			Sinesmen irrazionalak (T2)		
	n	ρ (rho)	p	*n*	ρ (rho)	p	*n*	ρ (rho)	p
Sinesmen arrazionalak (T0)	157	0,12	0,141						
Sinesmen arrazionalak (T1)				152	-0,21	0,01			
Sinesmen arrazionalak (T2)							146	-0,21	0,011
Aukera osasungarria (T0)	135	-0,31	<0,001						
Aukera osasungarria (T1)				142	-0,22	0,009			
Aukera osasungarria (T2)							141	-0,24	0,004
Aukera ez osasungarria (T0)	135	0,43	<0,001						
Aukera ez osasungarria (T1)				142	0,28	<0,001			
Aukera ez osasungarria (T2)							141	0,26	0,002

3.5.3. Sinesmen irrazionalak eta elikadura-aukeraketa ez osasungarria

Unibertsitatera sartzerakoan (T0), parte-hartzaileen %69-ak baino gehiagok honako elikadura-sinesmen irrazionalak sinisten zituen: "Elikagai batzuek mendekotasuna sortzen dute"; "Elikagai batzuk lasaitzeko balio dute"; eta "Momentu batzuetan elikagai jakin batzuk "behar" ditut". Gainera, ikasleen %55-%58-a ere honako sinesmen irrazionalekin identifikatu ziren: "Janaria plazerraren ordezko bat da"; eta "Elikagai batzuk jaterakoan kontrola galtzen dut". 6 asteren ondoren (T1), 26-54 bitarteko itemek nabarmen egin zuten behera (p<0,05), eta nutrizio-interbentzioa amaitzean (T2), 1, 2, 18 eta 31 itemek nabarmen egin zuten behera (p<0,05). Lauhilekoaren amaiera iristean, bi item ez ziren aldatu: "Jatea aspertuta ez egoteko modu on bat da"; eta "Janaririk ez badago erlazio sozialak ez dira hain dibertigarriak".

3. Taula. Elikadura-Sinesmen irrazionalen azpieskala: baiezko erantzun gehien dituzten itemak (ados edo erabat ados)

	T0	T1	T2
1. Janaria plazerraren ordezko bat da.	58%	52%	31%[b, c]
2. Elikagai batzuk lasaitzeko balio dute.	69%	64%	51%[b, c]
4. Seguruenik nire janari gogokoena gabe ezingo nintzateke bizi.	36%	34%	28%[c]
6. Nire bizitzako plazerrik handiena jatea da.	28%	27%	15%[b, c]
7. Jatea aspertuta ez egoteko modu on bat da.	33%	37%	32%
11. Janaririk ez badago erlazio sozialak ez dira hain dibertigarriak.	40%	35%	34%
18. Janari batzuk tentagarriak dira.	64%	59%	48%[b, c]
26. Elikagai batzuk jaterakoan kontrola galtzen dut.	55%	42%[a]	42%[c]
27. Goxorik gabe ezin naiz bizi.	37%	26%[a]	22%[c]
31. Elikagai batzuek mendekotasuna sortzen dute.	84%	72%[a]	62%[b, c]
40. Momentu batzuetan elikagai jakin batzuk "behar" ditut.	69%	55%[a]	52%[c]
54. Nahi duzuna jan ezin izateak tristetu egiten du.	48%	31%[a]	26%[c]

McNemar-en testa p<0.05: [a]T0 vs. T1, [b]T1 vs. T2, [c]T0 vs. T2.
Kolore berdez (< 40%); Kolore horiz (40% - 60%); Kolore gorriz (> 60%).

3.6. Eztabaida

3.6.1. Ikerketaren emaitza nagusia

Erizaintzako Graduko ikasleek kurtso hasieran elikadura-sinesmen arrazionalen maila altua erakutsi dute, eta sinesmen irrazionalen maila baxua. Gainera, osasungarriak ez diren platerrak gutxi aukeratzen dituzte, elikadura-sinesmen arrazional eta irrazionalen mailarekin bat datorrena. Hala ere, plater osasungarriak ez dituzte asko aukeratzen. Lauhilekoan zehar, sinesmen irrazionalak gutxitu eta sinesmen arrazionalak areagotu egin dira, eta horrek elikagai-aukeraketa osasuntsuagoarekin duen erlazioa egiaztatu da. Ikerketa honek plater osasungarrien edo ez oso osasungarrien aukeraketa elikadura-sinesmen irrazionalen mailaren araberakoa dela frogatu du. Hezkuntza interbentzio honek ez ditu elikadura-sinesmen arrazionalak handitu, ezta aukeraketa osasungarriagoak ekarri. Hala ere, nutrizio-irakaskuntza interbentzioak ikasleen elikadura-sinesmen irrazionalen zuzenketa egiteko aukera ematen duela erakutsi da, eta horrek haien elikadura-aukeraketak hobetzea ahalbideratu du.

3.6.2. Gai honi buruz ezagutzen dena

Erizaintzako ikasleek dituzten sinesmenak oso garrantzitsuak dira, frogatu baita erizaintzako profesionalen sinesmenak pazienteei egindako gomendioekin eta haien ohitura propioekin lotuta dagoela (Esposito eta Fitzpatrick 2011). Gainera, azterlan honetan erabilitako Elikagai-Sinesmenen Eskala pisu-igoerarekin (Osberg et al. 2008) eta Gorputz-Masaren Indize (GMI) handiagoarekin (Jáuregui Lobera eta Bolaños 2010) erlazionatu da aldez aurretik. Beraz, badirudi elikadura-sinesmen egokiak sustatzeak eragina izan dezakela, ez soilik etorkizuneko osasun-profesionalen eta -eragileengan, baita pazienteen osasunean ere.

Nutrizioari buruzko hezkuntza eraginkorra da ezagutzak (Rodrigo Vega et al. 2014; Jeruszka-Bielak et al. 2018; Patton-Lopez et al. 2018; Katsagoni et al. 2019), sinesmenak, ohiturak (Katsagoni et al. 2019), eta elikagaien aukeraketa (Perez-Cueto 2019) hobetzeko. 17-18 urteko ikasle espainiarretan egindako ikerketa batean sinesmen irrazionalen eskalan 42-47 inguruko balioak jaso ziren (Jáuregi-Lobera et al. 2011). Beraz, unibertsitateko ikasleen elikadura sinesmen irrazionalen murrizketa handiagoak ikusteko komenigarria litzateke irakaskuntza-estrategia berriak bilatzea. Aurretiazko ikerlanek nutrizio-ezagutzek hezkuntza-mailarekin erlazioa dutela erakutsi dute (Carrillo, Varela, eta Fiszman 2012). Hala ere, elikadura-ezagutza arrazionalak dituzten ikasleek ez dituzte beti elikagai osasungarriak aukeratzen (Abraham, R. Noriega, eta Shin 2018). Nutrizio-ezagutza egokiak eduki arren, kanpo faktoreek osasungarriak ez diren erabakiak hartzera gidatu dezakete.

Gure ikerketaren emaitzak bat datoz aurretik egindako azterlanekin, non elikagai-aukeraketak ezagutza handiagoaren eta elikadura hobearekin lotu diren (Perez-Cueto 2019). Elikadura-ezagutzen eta -sinesmenen arteko harremana beste egile batzuek ere erakutsi dute (Chan et al. 2019). Gainera, nutrizio-ezagutzen hobekuntza GMI txikiagoarekin, jarduera fisikoaren praktika handiagoarekin (Jeruszka-Bielak et al. 2018) eta elikadura osasungarriagoarekin (Spronk et al. 2014; Barbosa et al. 2016) erlazionatu da.

Janari osasungarria aukeratzea lotuta dago elikadura osasungarriaren esanahiaren uste indibidualarekin (Sogari et al. 2018), eta, beraz, elikadura-sinesmen desegoki batzuek osasungarriak ez diren aukerak hartzera eraman dezakete. Hala, ikerketa honetan erakutsi da elikadura-sinesmen irrazionalek pisu handia dutela unibertsitateko ikasleengan. Aurrez egindako hainbat azterlanek ere horrelako ideiak deskribatu dituzte. Adibidez, "Elikagai batzuek mendekotasuna sortzen dute" eta "Janari batzuk tentagarriak dira" bezalako usteak adikzio-ahalmena duten elikagaiak daudela (azukre eta koipe erantsiekin prozesatutako janaria) frogatu duten ikerlanetan oinarritzen dira (Gordon et al. 2018). Badirudi pertsona batzuek mendekotasun-portaera bat garatu dezaketela (Gordon et al. 2018; Adams et al. 2019), eta hori zenbait elikadura-sinesmen irrazionalen bitartez irudikatu da, hala nola; "Elikagai batzuk lasaitzeko balio dute" eta "Momentu batzuetan elikagai jakin batzuk "behar" ditut". Hala ere, Buru Asalduren Diagnosi eta Estatistika Eskuliburua edo DSM-5 manualean agertzen den definizioa kontuan hartuta, zaila da "janariarekiko mendekotasuna" terminoa orokortzea (Adams et al. 2019).

Elikagai-aukeraketa osasungarria edo ez osasuntsua azaltzeko beste faktoreetako bat emozionalitatea da. Hala, tristura eta antzeko emozioek elikagai ez osasungarriak aukeratzera bultzatzen dute (Frayn, Sears, eta von Ranson 2016), baita kontsumitutako kantitatea handitzera ere (Strien et al. 2013). Estres-maila handiek jateko bultzada areagotu dezakete (Groesz et al. 2012; Reichenberger et al. 2021). Aspergarritasuna bezalako emozioek gehiago jatera eramaten dute, eta horrelako egoeretan osasungarriak ez diren elikagaiekiko arreta handitzen da (Moynihan et al. 2015). Plazer sentimendua ere janariarekin lotuta dagoela ematen du; izan ere, dieta osasuntsua jarraitzeko elikadura atsegingarria izan daitekeela sustatzen duten interbentzioak eraginkorragoak dira (Vaillancourt et al. 2019).

Erizainak pazienteentzako erreferenteak dira (Esposito eta Fitzpatrick 2011), eta erizainek gidatutako interbentzioek komunitatearen bizimodua eta osasuna hobetzen dutela frogatu da: pisua nabarmen murriztuz, dietaren kalitatea hobetuz eta jarduera fisikoaren maila handituz (Azami et al. 2018; Richards eta Cai 2016; Sargent, Forrest, eta Parker 2012). Egia da Giza Nutrizio eta Dietetikako graduatuek elikadura osasungarrian formakuntza sakonagoa dutela, baina oraindik Osasun Sisteman lan egitera sartzeko zailtasunak dituzte. Beraz, Erizaintzako ikasleen nutrizio-hezkuntza hobetzera bideratutako estrategiak sustatu behar dira, ez bakarrik haien osasunerako komenigarria delako, baizik eta etorkizuneko pazienteen, eta, azken finean, komunitate osoaren osasuna hobetzeko.

3.6.3. Ikerketa honen ekarpena

Ikerketa honekin Erizaintzako ikasleen elikadura-sinesmen arrazional eta irrazionalak zein diren ezagutu ahal izan da, eta lauhileko batean nola alda daitezkeen nutrizio-hezkuntza jasota. Unibertsitatera sartu bezain pronto ikasleen gehiengo elikadura-aukerak ez osasungarriak direla frogatu da. Azterlan honen emaitzek konfirmatu egiten dute elikadura-sinesmen irrazionalen eta elikagai-aukeraketa ez osasungarriaren artean lotura estua dagoela. Ikasle-talde honen elikatze-hautaketak hobetzeko lehen urratsa sinesmen horiei heltzea izan daiteke. Era berean, ikerketa honek erakutsi du nutrizioari buruzko irakasgaia lantzeak elikadura-sinesmen irrazionalak murriztea lor dezakeela, baina ez da nahikoa plateren aukeraketan aldaketarik nabarmentzeko.

3.6.4. Mugak

Ikerketa honek hainbat muga ditu. Hasteko, azterlan hau egiteko lehen mailako ikasle guztiak gonbidatu baziren ere, laginaren tamaina ez zen nahikoa izan homogeneotasuna eta banaketa normala lortzeko. Gainera, parte-hartzaile batzuek ez zituzten galdetegiak osorik bete, laginaren galera handiagoa ekarriz. Horregatik galdetegi osoa bete zuten parte-hartzaileen datuak hartu ziren kontuan, haien adina edozein izanda ere. Hala ere, komenigarria litzateke lagin homogeneoago bat izatea, ikasleek unibertsitatera sartzean duten elikadura-sinesmenen maila zehatzagoa bildu ahal izateko. Bigarrenik, erizaintzako ikasle gehienak emakumeak direnez ezin izan zen genero-perspektiba batetik konparaziorik egin. Hirugarrenik, interbentzioaren eragina ebaluatzeko ikerketaren diseinuak banakako konparazioa denboran zehar kontuan hartu badu ere, aldaketak interbentzioaren efektuagatik soilik gertatu direla ziurtatzeko beste aldagai batzuk kontrolatzea beharrezkoa da. Ikerketaren diseinuari dagokionez, kontrol-talde batekin lan egiteak interbentzioaren efektua zehatzago neurtzeko baliagarria izango litzake. Gainera, nutrizio-hezkuntza honen iraupena eskasa da ikasleengan aldaketa sakon bat emateko, eta gutxiago etorkizuneko osasun sisteman efektua nabarmentzeko. Azkenik, aldaketak epe luzera mantentzen diren ez da aztertu.

4. Ondorioak

Azterlan honen emaitzak ikusita, esan dezakegu unibertsitatera sartu berri diren Erizaintzako ikasleek elikagai osasuntsuetan aukera gutxi egiten dituztela eta elikadura osasungarriari buruzko sinesmen arrazionalak gehiago direla irrazionalak baino. Elikadura-sinesmen irrazionalen eta elikadura-aukeraketa osasungarrien artean alderantziz proportzionala den erlazioa existitzen da, baina Erizaintza Graduko 1. mailako lehen lauhilekoa igaro ostean harreman hori aldatu egiten da. Denbora-aldaketak egon arren, nutrizio-hezkuntzak elikadura-sinesmen irrazionalak murriztu ditzake, eta horrela, elikagai osasungarrien aukera hobetu. Kontuan izan behar da bestelako faktoreek ere eragina dutela norbanakoaren elikadura-sinesmen eta aukeraketetan, hala nola: baliabide fisiko eta ekonomikoak, ingurune soziala eta erlazionatzeko moduak, emozionalitatea eta osasun mentala… Horregatik hezkuntza interbentzioek unibertsitate ikasleen, eta bereziki osasun-zientzietan ari direnen, elikadura-portaeretan dituzten abantailak ebaluatzeko etorkizuneko ikerketak beharrezkoak dira oraindik.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Dieta osasungarria jarraitzea, beste ohitura onekin batera, ezinbestekoa da gaixotasunak eta ondoeza saihesteko eta sumatutako osasuna hobetzeko. Dieta orekatua lortzeko nutrizioari buruzko kontzeptu teorikoak eguneroko praktikara pasatu behar dira, eta helburu hori lortzeko kalitatezko hezkuntza beharrezkoa da. Hala ere, aurretiaz eskuratutako elikadura-sinesmen faltsuek eragin zuzena izan dezakete elikadura-eredu dietetikoan eta -aukeraketen gain. Ikasleek elikadura osasungarriari buruz dituzten ezagutzak eta sinesmenak ikertzea beharrezkoa da; horrela, elikagaiak behar bezala aukeratzeko irizpidea modu autonomoan sustatzen duten hezkuntza-interbentzio egokiak proposatu ahal izango dira. Gure ikerketen emaitzek erakutsi dute dute janariaren aspektu emozionalak tratatu behar direla. Izan ere, unibertsitate-aldiko hezkuntza-interbentzioak funtsezkoak dira ikasleen etorkizuneko elikadura orekatua eta osasungarriari buruzko oinarri iraunkorrak ezartzeko.

6. Erreferentziak

Abraham, S., Noriega, B. R., eta Shin, J. Y. (2018): College Students Eating Habits and Knowledge of Nutritional Requirements. *Journal of Nutrition and Human Health. 02*(01):13-17.

Aceijas, C., Waldhäusl, S., Lambert, N., Cassar, S., eta Bello-Corassa, R. (2017): Determinants of Health-Related Lifestyles among University Students. *Perspectives in Public Health*. *137*(4):227-236.

Adams, R. C., Sedgmond, J., Maizey, L., Chambers, C. D., eta Lawrence, N. S. (2019): Food Addiction: Implications for the Diagnosis and Treatment of Overeating. *Nutrients*. *11*(9):2086.

Antonopoulou, M., Mantzorou, M., Serdari, A., Bonotis, K., Vasios, G., Pavlidou, E., Trifonos, C., Vadikolias, K., Petridis, D., eta Giaginis, C. (2020): Evaluating Mediterranean Diet Adherence in University Student Populations: Does This Dietary Pattern Affect Students' Academic Performance and Mental Health? *The International Journal of Health Planning and Management. 35*(1):5–21.

Azami, G., Soh, K. L., Sazlina, S. G., Salmiah, M. S., Aazami, S., Mozafari, M., eta Taghinejad, H. (2018): Effect of a Nurse-Led Diabetes Self-Management Education Program on Glycosylated Hemoglobin among Adults with Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes Research. 2018*.

Barbosa, L. B., Vasconcelos, S. M., Correia, L.O., eta Ferreira, R. C. (2016): Avaliação Do Conhecimento Nutricional de Adultos: Uma Revisão Sistemática. *Ciencia e Saude Coletiva*. *21*(2):449-462.

Carrillo, E., P. Varela, eta S. Fiszman. (2012): Influence of Nutritional Knowledge on the Use and Interpretation of Spanish Nutritional Food Labels. *Journal of Food Science*. *77*(1):H1-H8.

Chan, C. Y., Subramaniam, S., Chin, K. Y., Ima-Nirwana, S., Muhammad, N., Fairus, A., Mohd Rizal, A. M., et al. (2019): Knowledge, Beliefs, Dietary, and Lifestyle Practices Related to Bone Health among Middle-Aged and Elderly Chinese in Klang Valley, Malaysia. *International Journal of Environmental Research and Public Health. 16*(10):1787.

De-Mateo-Silleras, B., Camina-Martín, M. A., Cartujo-Redondo, A., Carreño-Enciso, L., De-la-Cruz-Marcos, S., eta Redondo-del-Río, P. (2019): Health Perception According to the Lifestyle of University Students. *Journal of Community Health. 44*(1):74–80.

Esposito, E. M., eta Fitzpatrick, J. J. (2011): Registered Nurses' Beliefs of the Benefits of Exercise, Their Exercise Behaviour and Their Patient Teaching Regarding Exercise. *International Journal of Nursing Practice. 17*(4):351–56.

Frayn, M., Sears, C. R., eta von Ranson, K. M. (2016): A Sad Mood Increases Attention to Unhealthy Food Images in Women with Food Addiction. *Appetite*. *100*(May): 55–63..

Fundación Española de la Nutrición (2013): *Libro Blanco de La Nutrición En España*.

Gordon, Eliza L., Aviva H. Ariel-Donges, Viviana Bauman, eta Lisa J. Merlo. (2018): What Is the Evidence for 'Food Addiction?' A Systematic Review. *Nutrients. 10*(4):477.

Gravina, L., Jauregi, A., Estebanez, A., Fernández-Aedo, I., Guenaga, N., Ballesteros-Peña, S., Díez, J., eta Franco, M. (2020): Residents' Perceptions of Their Local Food Environment in Socioeconomically Diverse Neighborhoods: A Photovoice Study. *Appetite. 147*:104543.

Groesz, L.M., McCoy, S., Carl, J., Saslow, L., Stewart, J., Adler, N., Laraia, B., eta Epel, E. (2012): What Is Eating You? Stress and the Drive to Eat. *Appetite. 58*(2):717–21.

Jáuregui Lobera, I., eta Bolaños, P. (2010): Spanish Version of the Irrational Food Beliefs Scale. *Nutrición Hospitalaria. 25*(5):852–859.

Jáuregui Lobera, I., Bolaños, P., Santiago, M. J., Garrido, O., eta Sánchez, E. (2011): Perception of weight and psychological variables in a sample of Spanish adolescents. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy. 4*:245-251.

Jeruszka-Bielak, M., Kollajtis-Dolowy, A., Santoro, A., Ostan, R., Berendsen, A., Jennings, A., Meunier N., et al. (2018): Are Nutrition-Related Knowledge and Attitudes Reflected in Lifestyle and Health Among Elderly People? A Study Across Five European Countries. *Frontiers in Physiology. 9*:994.

Katsagoni, C. N., Apostolou, A., Georgoulis, M., Psarra, M., Bathrellou, E., Filippou, C., Panagiotakos, D. B. eta Sidossis, L. S. (2019): Schoolteachers' Nutrition Knowledge, Beliefs, and Attitudes Before and After an E-Learning Program. *Journal of Nutrition Education and Behavior. 51*(9):1088–98.

Microsoft Corporation. (2019): *Microsoft Excel*.

Moynihan, A. B., van Tilburg, W. A., Igou, E. R., Wisman, A., Donnelly, A. E., eta Mulcaire, J. B. (2015): Eaten up by Boredom: Consuming Food to Escape Awareness of the Bored Self. *Frontiers in Psychology. 6:* 369.

Osberg, T. M., Poland, D., Aguayo, D., eta MacDougall. S. (2008): The Irrational Food Beliefs Scale: Development and Validation. *Eating Behaviors. 9*(1):25–40.

Patton-Lopez, M. M., Manore, M. M., Branscum, A., Meng, Y., eta Wong, S. S. (2018): Changes in Sport Nutrition Knowledge, Attitudes/Beliefs and Behaviors Following a Two-Year Sport Nutrition Education and Life-Skills Intervention among High School Soccer Players. *Nutrients. 10*(11):1636.

Perez-Cueto, F. J.A. (2019): An Umbrella Review of Systematic Reviews on Food Choice and Nutrition Published between 2017 And-2019. *Nutrients*. *11*(10):2398.

Reichenberger, J., Pannicke, B., Arend, A. K., Petrowski, K., eta Blechert, J. (2021): Does Stress Eat Away at You or Make You Eat? EMA Measures of Stress Predict Day to Day Food Craving and Perceived Food Intake as a Function of Trait Stress-Eating. *Psychology and Health. 36*(2):129–47..

Richards, E. A., eta Cai, Y. (2016): Integrative Review of Nurse-Delivered Physical Activity Interventions in Primary Care. *Western Journal of Nursing Research*. *38*(4):484-507.

Rivera Medina, C., Briones Urbano, M., De Jesús Espinosa, A., eta Toledo López, A. (2020): Eating Habits Associated with Nutrition-Related Knowledge among University Students Enrolled in Academic Programs Related to Nutrition and Culinary Arts in Puerto Rico. *Nutrients. 12*(5):1408.

Rodrigo Vega, M., Ejeda Manzanera, J. M., González Panero, M. P., eta Mijancos Gurruchaga, M. T. (2014): Cambios En La Adherencia a La Dieta Mediterránea En Estudiantes de Los Grados de Enfermería y de Magisterio Tras Cursar Una Asignatura de Nutrición. *Nutrición Hospitalaria. 30*(5):1173–80.

Sánchez, V., Aguilar, A., González, F., Esquius, L., eta Vaqué, C. (2017): Evolución En Los Conocimientos Sobre Alimentación: Una Intervención Educativa En Estudiantes Universitarios. *Revista Chilena de Nutricion. 44*(1):19–27.

Sargent, G. M., Forrest, L. E., eta Parker, R. M. (2012): Nurse Delivered Lifestyle Interventions in Primary Health Care to Treat Chronic Disease Risk Factors Associated with Obesity: A Systematic Review. *Obesity Reviews*. *13*(12):1148-1171.

Sharma, T., Morassut, R. E., Langlois, C., eta Meyre, D. (2021): Effect of Sex/Gender on Obesity Traits in Canadian First Year University Students: The GENEiUS Study. *PLoS One.* 16(2):e0247113.

Sobal, J., eta Carole A. Bisogni. (2009): Constructing Food Choice Decisions. *Annals of Behavioral Medicine*. *38*(S1):37–46.

Sogari, G., Velez-Argumedo, C., Gómez, M. I., eta Mora, C. (2018): College Students and Eating Habits: A Study Using an Ecological Model for Healthy Behavior. *Nutrients. 10*(12):1823.

Spronk, I., Kullen, C., Burdon, C., eta O'Connor, H. (2014): Relationship between Nutrition Knowledge and Dietary Intake. *British Journal of Nutrition*. *111*(10):1713-1726.

van Strien, T., Cebolla, A., Etchemendy, E., Gutiérrez-Maldonado, J., Ferrer-García, M., Botella, C., eta Baños, R. (2013): Emotional Eating and Food Intake after Sadness and Joy. *Appetite.* 66:20–25.

Trinidad Rodríguez, I., Fernández Ballart, J., Cucó Pastor, G., Biarnés Jordà, E., eta Arija Val, V. (2008): Validación de Un Cuestionario de Frecuencia de Consumo Alimentario Corto: Reproducibilidad y Validez. *Nutrición Hospitalaria. 23*(3):242–52.

Vaillancourt, C., Bédard, A., Bélanger-Gravel, A., Provencher, V., Bégin, C., Desroches, S., eta Lemieux, S. (2019): Promoting Healthy Eating in Adults: An Evaluation of Pleasure-Oriented versus Health-Oriented Messages. *Current Developments in Nutrition.* 3(5).

Worsley, A. (2002): Nutrition Knowledge and Food Consumption: Can Nutrition Knowledge Change Food Behaviour? *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. *11*(S3):S579-S585.

Yahia, N., Wang, D., Rapley, M., eta Dey, R. (2016): Assessment of weight status, dietary habits and beliefs, physical activity, and nutritional knowledge among university students. *Perspectives in public health. 136(4):231-244.*

Yarrow, L., Remig, V. M., eta Higgins, M. M. (2009): Food Safety Educational Intervention Positively Influences College Students' Food Safety Attitudes, Beliefs, Knowledge, and Self-Reported Practices. *Journal of Environmental Health. 71*(6):30-35.

Garun traumatismoen epe luzeko eragina hipokanpoko CB_1 hartzailean

Bonilla-Del Río, I.[1,2], Egaña-Huguet, J.[1,2], Achicallende, S.[1,2], Soria-Gomez, E.[1,2,3], Ramos, A.[1,2], Terradillos, I.[1,2], Mimenza, A.[1,2], Serrano, M.[1,2], Lekunberri, L.[1,2], Anaut-Lusar, I.[1], Buceta, I.[1,2], Rico-Barrio, I.[1,2], Gerrikagoitia, I.[1,2], Neale, K.J.[4], Pinar, C.[4], Triviño-Paredes, J.[4], Nahirney, P.C .[4], Christie, B.R.[4], Puente, N.[1,2], Elezgarai, I.[1,2], Grandes, P .[1,2]

[1]Neurozientziak Saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, [2]Achucarro Basque Center for Neuroscience, UPV/EHUko Zientzia Parkea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, [3]IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, [4]Division of Medical Sciences, University of Victoria, Victoria, British Columbia, Canada

jon.egana@ehu.eus

Laburpena

Gaur egun, garuneko traumatismo (GT) arinak osasun arazo garrantzitsua bilakatu dira duten intzidentzia altua dela eta. GT arinaren ezaugarri nabarmenetako bat asaldura kognitiboak dira. Garuneko lesio errepikakor arinak asaldura neurokognitibo larriagoekin lotu daitezke, nahiz eta egiturazko patologiarik ez egon. Halaber, GT arin baten ondoren, beste hainbat patologietan deskribatu den moduan, sistema endokannabinoidean aldaketak gertatzen direla frogatu da. Hortaz, ikerketa honen helburua GT arin batek ikaskuntzarekin eta oroimenarekin erlazionatutako garuneko hipokanpo eremuko CB_1 hartzailearen banaketan eragin ditzakeen aldaketak zehaztea izan da.

Hitz gakoak: Garuneko traumatismoa; endokannabinoide-sistema; CB_1 hartzailea; mikroskopia elektronikoa

Abstract

Mild Traumatic Brain Injury (mTBI) is a significant health issue due to its high prevalence in the youth. Cognitive impairments are some of the most prominent features and repeated mTBI (r-mTBI) can be associated with neurocognitive deficits even without overt structural damage. Changes in the endocannabinoid system have been shown to occur after mTBI. Thus, the aim of this investigation was to study the effect of r-mTBI (awake closed-head injury model) on CB_1 receptor distribution in the rat hippocampus, brain structure involved in learning and memory processing.

Key words: Traumatic brain injury; Endocannabinoid system; CB_1 receptor, Electron microscopy

1. Sarrera eta motibazioa

Garuneko traumatismoa (GT), kanpo indar mekaniko batek igorritako indarraren ondorioz entzefaloan eragiten den lesioari deritzo (Frieden et al., 2015). Gaur egun, traumatismo mota hau, mundu mailako kezka sanitario eta sozioekonomiko nagusietako bat da, 45 urte edo gutxiagoko pertsonen artean heriotza-kausa nagusietakoa izanik (Cole, 2004). Mundu osoan, 57 milioi pertsonek gaixotasun honen aurrekariak dituztela kontutan izanik, urtero 10 milioi ospitaleratze eta/edo heriotza dira GT-aren ondorio zuzenak (Langlois et al., 2006). Lesio hauen eragile nagusiak ibilgailu motordunen erorketak eta istripuak badira ere, kontaktu-kiroletan gertatutako kolpeek bere garrantzia dutela ikusi da (Frieden et al., 2015). Kolpe hauen ondorioz, kalte estruktural eta funtzional iraunkorrak eragiten dira garunean. Aldaketa horiek gizabanakoaren portaeran eragina izan dezakete, hala nola ikaskuntzan eta oroimenean, antsietatean edo/eta erabakiak hartzeko zailtasunean. GT-ak, lesio sarkor edo buruko lesio itxi moduan sailka daitezke. Sarkorrak direnean, garezurrean, duramaterrean eta garuneko parenkiman agertzen dira lesioak; aldiz, GT itxi batean, normalean, garezurrak eta garuneko beste egitura horiek bere horretan jarraitzen dute edo ez dute ageriko aldaketarik erakusten (Cassidy et al., 2004). Lesioaren larritasuna honako hauen arabera zehazten da: kontzientzia-maila (iraupena eta larritasuna, konortea galduz gero), oroimen-galerak eta asaldura neurologikoak. GT motarik ohikoena GT arina da, "konmozioa" ere esaten zaiona. Besteak beste, GT-aren sintoma klinikoak honako hauek izan daitezke: buruko mina, nahasmena, goragalea, oreka-arazoak, arreta-gabeziak, loaren asaldurak, ikasteko eta oroitzeko arazoak eta asaldura emozionalak

(Caine et al., 2014). Sintomak iraupen laburrekoak izan ohi dira, eta berez, egun edo aste batzuen buruan desagertu egiten dira. Hala ere, oraindik argitu gabe dauden arrazoiengatik, gizabanako batzuetan, GT-aren sintomek urtebete baino gehiago iraun dezakete (Hall et al., 2005a). GT bakar batek agerikoak ez diren, eta izaera iraunkorra izan dezaketen egiturazko edo funtzionaltasuneko defizitak eragin ditzake ere, eta gainera, garuna ondorengo lesioekiko kaltebera izatea, eta sentikortasun-leiho bat sortzea, non konmozio-gertaera arin ugari pilatzeak metatze-kalte larriagoa eta epe luzeko disfuntzio kognitiboa eragin dezaketen (Fehily eta Fitzgerald, 2017). GT arinak buruko lesio guztien % 80 dira (Frieden et al., 2015), horrela, lesio horiek oinarri hartuta, mundu osoan GT-en intzidentzia 100-300 pertsonakoa 100.000 biztanleko dela baieztatu daiteke (Cassidy et al., 2004). Hala ere, GT ez da oso ezaguna, pairatzen duten pertsona askok ez baitute arreta medikorik bilatzen.

Kanpo indarren energia mekanikoa garunera nola transferitzen den eta estimulu fisiko horiek ehun bizian eta sare neural/glialean dituzten ondorioak ulertzea funtsezkoa da garuneko konmozioek eragindako lesioak ulertzeko. Garezurrak eta likido zefalorrakideoak ematen duten babesaren arabera, buruko lesioek, garezurraren haustura gabekoek ere, burmuin-ehuna kaltetu dezakete azelerazio- eta desazelerazio-indarren ondorioz, izan ere, ezaugarri fisikoak direla eta, burmuin-ehunak portaera ez-lineala erakusten du aplikatutako indarrei erantzunez (Prange-Kiel et al., 2003), hau da, indar ezberdinen aurrean burmuinak ez du era proportzionalean erantzuten. Erresonantzia magnetikoko irudiak erabiltzen dituzten azterketa klinikoek jakinarazi dutenez, GT moderatu edo larri baten ondoren kaltetutako garun egituren artean, hipokanpoa da sentikorrena (Serra-Grabulosa et al., 2005).

GT-aren indar biomekanikoek garezur barruan presio-gradienteak sortzen dituzte, neuronak, glia zelulak eta garuneko odol-hodiak kaltetzen dituztenak (Blennow et al., 2012). Beraz, GT-an gertatzen diren indar mekanikoek eragindako axoi-zuntzen kalteek, transmisio sinaptikoaren asaldurak eta zirkuitu neuronalaren disfuntzioa eragin ditzakete. Gainera, odol-hodiak indar hauen aurrean sentiberak diren egiturak dira, izan ere, oso ohikoak izaten dira axoi lesio hauekin batera mikro odol-ateratzeak (Pittella eta Gusmão, 2003). Hainbat kapilarren hausturari, petekia hemorragia fenomenoa deritzo, eta hauek, larritasun desberdineko GT pazienteetan behatzen direla deskribatu da (Mckee eta Daneshvar, 2015). Odol-fluxuaren etenaldi horiek, gertaera hipoxikoak sortarazten dituzte eta traumatismoaren osteko berehalako disfuntzioak eragin ditzakete. Gainera, GT baten ondoren, garuneko odol-hodietako erreaktibotasuna (garunak odol-fluxua oinarri-lerrotik gora eramateko duen ahalmena) galzorian jar lezake (Adams et al., 2018). Horren arabera, burmuinak jarduera neuronalak eragindako eskaera metabolikoa modulatzeko duen gaitasuna eta burmuinaren funtzionamendu normala kaltetuta egon daitezkeela ondorioztatu da. Horrek, besteak beste, disfuntzio mitokondriala eragiten du, eta ATP-aren ekoizpena murriztea dakar, ondorioz, egoera energetikoa okertu egiten delarik (Vagnozzi et al., 2007). Uste denez, hasierako lesioen ondorengo gertaera horiek guztiak, ondorengo defizit akutuen kausa dira (Barkhoudarian et al., 2016) eta, epe luzera, alterazio iraunkorrak eragin ditzakete inguruko zeluletan eta burmuineko gainerako sistemetan, hala nola, sistema endokannabinoidean (eKBS).

eKBS kannabinoide-hartzaileek eta horiekin elkar eragiten duten molekulek osatzen dute. Horien artean, ezagunena, 1. motako hartzaile kannabinoidea (CB_1) da, eta berari eragiten dioten ligando endogenoak, endokannabinoideak (eKBak), 2-arakidonoil glizerola (2AG) eta N-arakidonoiletanolamida (AEA) dira. Horrez gain, sistemaren barne eKBak sintetizatzeko eta degradatzeko entzimak dauzkagu (Howlet et al., 1990). CB_1 hartzaileak hainbat zelula motetan aurki daitezke, astrozitoetan, neuronetan edota mikroglian adibidez, eta zelula barneko konpartimentuetan ere kokatzen dira, hala nola, mitokondrietan. Azken urteetan egin diren hainbat teknika histologiko funtsezkoak izan dira CB_1 hartzailearen zelula-mailako adierazpena eta kokapena definitzeko. Hala ere, zelula horietan duten adierazpen maila txikia dela eta, oso zaila da CB_1 hartzaileen banaketa azpi zelularra zelula mota batzuetan (adibidez, astrozitoetan) identifikatzea. Garunean, eKBS transmisio sinaptikoaren eta plastikotasunaren funtsezko modulatzailea da eta hainbat prozesu fisiopatologikoetan parte hartzen eta erregulatzen dituela jakina da (Araque et al., 2017). Horregatik, GT bezalako egoera patologikoetan CB_1 hartzailearen adierazpena eta banaketa azpi zelularra ezagutzea funtsezko gaia da.

2. Ikerketaren Helburuak

Arestian aipatu bezala, GT eta garuneko konmozioak (edo GT arina) mundu mailako kezka soziosanitario nagusietako bat dira. Gazteen populazioan GT arin errepikakorrek, kontaktu kiroletan edota auto istripuetan gertatzen direnak adibidez, neuropatologiak eta ikaskuntza- eta oroimen-gabeziak eragin ditzakete helduaroan. Hala ere, gabezia horien irismena erakusten duten datu aurre kliniko gutxi daude. Honez gain, aurretiaz ikusi da antzeko gabeziak eragiten dituzten beste patologietan eKBS-an aldaketak gertatzen direla, nerabezaroko alkohol kontsumoan eragindako oroimen-asaldurak kasu (Peñasco et al., 2020).

Hori guztia kontutan izanik, ikerketa lan honetan arratoi gazteen GT arinaren ereduan CB_1 hartzailearen kokapenak pairatutako aldaketak aztertu dira, traumatismoa jasan eta 40 egunetara. Azterketa hori hipokanpoko bihurgune horzduneko geruza molekularreko (BHGM) neurona, astrozito eta konpartimentu azpi zelularretan egin da. Hartzaile honen adierazpena bukaera sinaptikoetan nagusi bada ere, azken urteetan deskribatu denez, aipatu bezala CB_1 hartzaileak astrozito eta mitokondrietan ere adierazten dira, non ezinbesteko funtzioak betetzen dituzten, besteak beste, transmisio sinaptikoan (Jimenez-Blasco et al., 2020). Azterketa honen bidez, garun konmozio arinak, epe luzera, eragiten dituen asaldura kognitiboen bilakaeran parte har dezaketen mekanismoen ezagutzan sakondu nahi da.

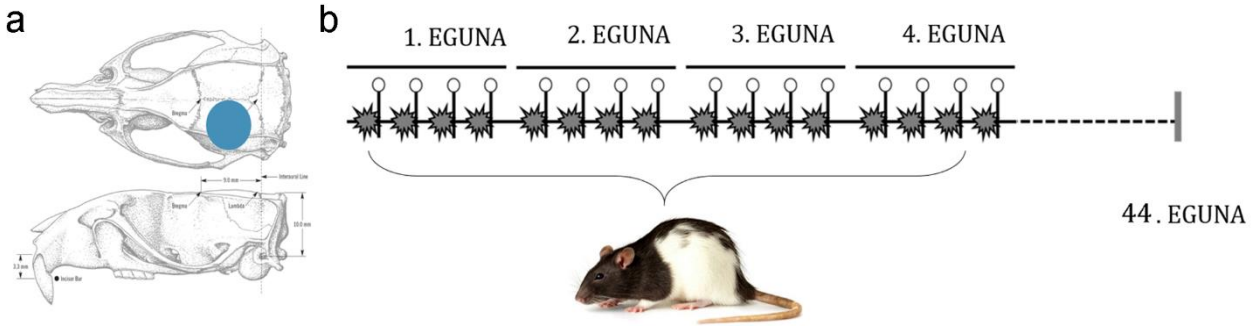
3. Ikerketaren muina

Garun traumatismo (GT) arinaren eredua:

Dagoeneko ezarria dagoen "Esna eginiko garun-lesio itxia" metodoa erabili zen "Awake closed head injury" ingelesez (ACHI) (Meconi et al., 2018; Pinar et al., 2019) GT eredu gisa. Eredu hori arratoi gazteetan buruko lesio arin bat sortzeko bereziki diseinatu zen eta hainbat kiroletan (boxeoan, errugbian, hockey-ean) gertatzen diren GT arin errepikakorren eredu gisa erabiltzen da.

Charles River laborategitik (St. Constant, Kanada) eratorritako Long-Evans arratoi gazteak (3-4 aste) erabili ziren. Hauek 2-3 animaliako taldeetan kaiolatu ziren, sexuaren arabera, eta 22 °C-tan mantentzen zen gela baten sartu ziren 12h:12h-ko argi eta iluntasun zikloetan, argiak goizeko 9-etan pizten zirelarik. Janaria eta ura *ad libitum* izan zuten une oro. Lesioa eragiteko, lehenik eta behin arratoiak immobilizatzen dira. Horretarako, aireztapen egokia ahalbidetzeko sudur zuloentzako irekidura bat duen plastikozko atxikitze-kono bigun bat erabili da (DC-200 eredua, Braintree Materials and methods 48 Scientific, Braintree, MA). Arratoiak ondo immobilizatuta daudenean, buruan 3D inprimatzaile baten bidez sortutako kasko bat jartzen zaie. Kono barruan, jarrera egokian kokatzeko eta burua behar zen tokian mantentzeko, gomazko banda elastiko bat eta bi aurpegiko zinta itsasgarri erabiltzen da, mugimendua ahalik eta gehien murrizteko. Jarraian, animaliak apar-sintetiko plataforma bigun batean jartzen dira (7.6 cm lodierako poliuretanozko xafla, McMaster-Carr, OH) eta lesio-aparatuaren azpialdean kokatzen dira. Kaskoaren goialdean kokaturiko disko biribil lau batek, talka, ezkerreko pareta kortexera desbideratzen du.

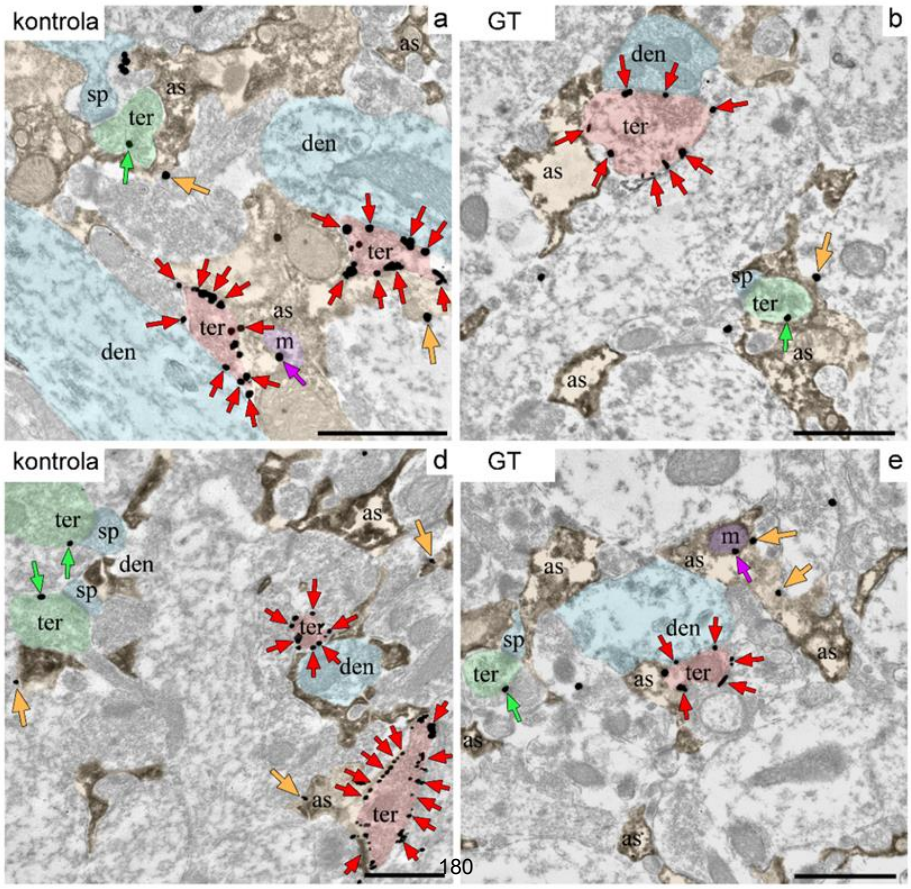
1. irudia: "Esna eginiko garun-lesio itxia" eragiteko eredua. (a) Inpaktuaren tokia ezkerreko pareta kortexaren eremura mugatzen da. Arratoiaren garezurreko diagrama (Paxinos eta Watson, 2005). (b) Jaio eta 25. egunetik aurrera, arratoiek 4 inpaktu jaso zituzten egunean, 4 egunez eta 40 eguneko biziraupena utzi zitzaien. Kontrol animalietan prozedura bera aplikatu zen, kolpea jaso gabe. Aurretik erabilitako metodo frogatua da



Lesioa eragiteko, animalia estereotaxi-marko batean kokatzen da “kontrolatutako kortex inpaktua” eragiteko erabiltzen den eraldatutako gailuaren azpian (Impact One, Leica Biosystems Inc., ON, Kanada). Talkarako punta ere eraldatzen da, 7 mm-ko diametroa duen goma zapal bat gehituta. Jarraian talka-punta kaskoarekin bertikalki lerrokatzen da, kolpea aukeratutako eremura bideratzeko. Lesioa eragiteko parametroak ondorengoak dira: 6 m/s-ko abiadura, 10 mm-ko sakonera eta 0.1 s-ko latentzia. Behin arratoia geldi dagoelarik, eta kaskoa eta talka-punta zuzen lerrokatuta daudenean, kolpea kontrol-kaxaren bidez eragiten da. Bukatzeko animaliak immobilizazio poltsatik atera eta 40 egunez bizirik mantentzen dira.

Arratoiak ausaz esleitu ziren bi multzoetako bati: lesiorik gabekoa (kontrola) edo lesioekin (kolpatua). Esperimentu guztietan bi sexuak sartu ziren. Jaio eta 25. eta 28. egunen artean, hauek barne, lesionatutako taldeko animaliek 4 inpaktu jaso zituzten egunean (4 egunez, 16 guztira). Kontrol arratoiak lesionatutako animalien prozedura bera jarraitu zuten, immobilizazio-poltsan eta lesio-plataforman jarriz, kaskoa jarriz eta pistoiaren soinua entzunez, baina kolpea jaso gabe. Animaliak lesioa jaso eta 40. egunean anestesiapeko bihotzean zeharreko perfusioari ekin zitzaion eta nerbio ehuna mikroskopio elektronikorako prestatu zen. Brian R. Christie doktorearen eta Patrick Nahirney doktorearen laborategiak (Medikuntza Zientzien Dibisioa, Victoriako Unibertsitatea, Victoria, BC, Kanada) burutu zuten GT arinak eragiteko protokolo hau eta baita perfusioa ere. Arratoi hauen garunak immunohistokimikarako prestatu ziren eta hauetan erretxinan murgildu-aurreko urre eta peroxidasa bidezko immunomarkaketa konbinatua aplikatu zen. Honen bidez, CB_1 hartzailearen topografia eta adierazpena, mikroskopio elektronikoan behatu eta aztertu zen. Hartzailea, bai arratoi-kontroletan (2a eta 2d irudiak) zein kolpatutako arratoietan, hots, GT-a pairatutako arratoietan (2b eta 2e irudiak) aurkitu zen garuneko zelula eta konpartimentu azpi-zelular garrantzitsuenetan.

2. irudia: Erretxinan murgildu-aurreko urre eta peroxidasa metodo konbinatua mikroskopio elektronikorako. Bihurgune horzduneko geruza molekularreko argazkiak. (a, d) Egoera kontrolean, CB_1 hartzailearen markaketa bukaera sinaptiko kitzikatzaileetan (ter, gezi berdeak) zein inhibitzaileetan (ter, gezi gorriak), astrozitoetan (as, gezi laranjak) eta mitokondrietan (m, gezi moreak) behatu daiteke. (b, d) Garun traumatismoan, CB_1 hartzaileak astrozitoetan (as, gezi laranjak) eta mitokondrietan (m, gezi moreak) daude, baina ez dira hain ugariak bukaera sinaptiko kitzikatzaileetan (ter, gezi berdeak) eta inhibitzaileetan. Eskala barrak: 1 µm.



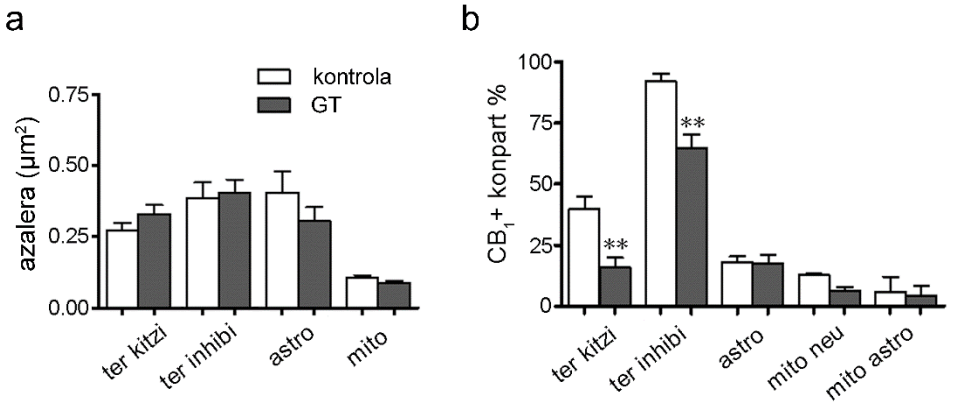
Emaitzak:

"Esna eginiko garun-lesio itxia" GT ereduan egitura aldaketak astrozito, neurona eta mitokondrien morfologian aztertzeaz gain, konpartimentu horietan CB_1 hartzailearen banaketa ere aztertu zen, lesioa izan eta 40 egunetara. Zehazki, ultra-egitura mailan, buruan jasotako kolpeek eragin ditzaketen moldaketa morfologikoak argitzeko, aipatutako konpartimentu zelularrek betetako azalera neurtu zen eta CB_1 hartzailearen adierazpenarekin erlazionatuta, hainbat konpartimentutan, hartzaile honekiko positiboak ziren bukaera sinaptikoen ehunekoa eta hauen dentsitatea aztertu ziren. Mitokondriei dagokienez, kanpo mintzean CB_1 hartzailea erakusten zuten ehunekoa zenbatu zen. Gainera, CB_1 hartzaile astrozitikoen urre partikulen eta sinapsi hurbilenaren arteko distantzia ere aztertu zen. Horiek guztiak FIJI sofwerra baliatuz eskuz zenbatu ziren.

Lehenik eta behin, aipatu beharra dago, bukaera sinaptiko kitzikatzaileen, inhibitzaileen, prozesu astrozitikoen eta mitokondrien tamaina ez zela nabarmen aldatu garun traumatismo arinen ondorioz. Horrela, konpartimentu hauetarako ondorengo azalerak neurtu ziren argazkiko (azalera osoa argazkiko 290 μm^2): bukaera sinaptiko kitzikatzaileak, arratoi kontroletan: 0.27 ± 0.02 μm^2 betetzen zuten eta kolpatutakoetan berriz: 0.33 ± 0.03 μm^2. Bukaera sinaptiko inhibitzaileei dagokionez, kontrol arratoietan: 0.38 ± 0.05 μm^2 betetzen zuten eta kolpatutakoetan: 0.40 ± 0.04 μm^2. Prozesu astrozitikoei dagokionez, kontroletan: 0.40 ± 0.07 μm^2 betetzen zuten eta kolpatutakoetan: 0.30 ± 0.05 μm^2. Azkenik mitokondriek, kontrol arratoietan: 0.10 ± 0.01 μm^2 betetzen zuten eta kolpatutakoetan: 0.08 ± 0.01 μm^2 ($p > 0.05$) (3a irudia).

CB_1 hartzailearen banaketaren azterketak berriz, hartzailearekin markatutako bukaera sinaptiko kitzikatzaileen (Kontrolak: % 39.80 ± 5.05 ; Kolpatutakoak: % 15.97 ± 3.93) zein inhibitzaileen proportzioak (Kontrolak: % 91.94 ± 3.40; Kolpatutakoak: % 64.56 ± 5.79) (** $p < 0.01$) nabarmen murriztu zirela agerian utzi zuen 16 kolpe jaso zuten animalietan. Hala ere, CB_1 hartzailerako positibo diren bai prozesu astrozitikoen zein mitokondrien ehunekoak ez ziren nabarmen aldatu kolpeak jaso eta 40 egunetara. Horrela, prozesu astrozitikoen ehunekoari dagokionez, kontrol arratoietan % 18.13 ± 2.171 positiboa zen bitartean, kolpatutako arratoietan % 17.44 ± 3.13-koa zen ($p > 0.05$). Mitokondria CB_1 positiboei dagokionez, neuronetan eta astrozitoetan kokatutako mitokondrien artean bereiztu zen, eremu azpi zelular hauen artean ezberdintasunik zegoen edo ez argitzeko. Horrela bada, animalia kontroletan, mitokondria neuronalen % 12.06 ± 0.43 CB_1 hartzailerako positibo ziren eta kolpatutakoen artean % 6.44 ± 1.58 ($p > 0.05$). Astrozitoetan kokaturiko mitokondriei dagokionez, kontrol-arratoietan % 6.00 ± 6.00 CB_1 hartzailerako positibo ziren bitartean, kolpatutako arratoietan % 4.167 ± 4.167 ziren positibo ($p > 0.05$) (3b irudia).

3. irudia: 40 egunetara bihurgune horzduneko geruza molekularraren burututako azterketa estatistikoa kolpatutako zein kolpatu gabeko kontrol arratoietan. (a) Bataz besteko konpartimentuen azalera (μm^2). (b) CB_1 positiboak diren konpartimentuen ehunekoa. Datuak batezbestekoa ± SEM adierazten dira. $p > 0.05$; ** $p < 0.01$. Proba ez-parametrikoen bidez aztertu ziren (Mann-Whitney proba).

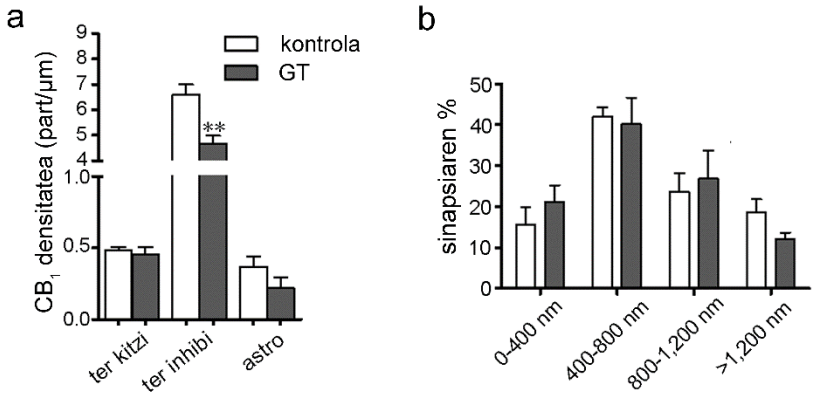


Gainera, CB_1 hartzailearen dentsitatean ere aldaketak behatu ziren. Dentsitateak, bukaera sinaptiko inhibitzaileetan nabarmen egin zuen behera kolpatutako animalietan, non kontrolek 6.58 ± 0.42 partikula/µm agertzen zituzten euren mintzean eta kolpatutakoek berriz 4.66 ± 0.32 partikula/µm (** p <

0.01). Gainerako konpartimentu zelularretan ez zen aldaketa nabarmenik aurkitu. Horrela, bukaera sinaptiko kitzikatzaileetan CB_1 hartzailearen dentsitatea kontrol-arratoietan 0.480 ± 0.027 partikula/µm zen bitartean, kolpatutakoetan 0.455 ± 0.052 partikula/µm izan zen ($p > 0.05$). Astrozitoetan CB_1 hartzaileen dentsitatea berriz kontrol-arratoietan 0.37 ± 0.068 partikula/µm zen eta kolpatutakoetan 0.217 ± 0.073 partikula/µm ($p > 0.05$) (4a irudia).

Horrez gain, CB_1 hartzaile astrozitikoen kokapenaren eta sinapsi hurbilenaren arteko distantzia ez zen nabarmen aldatu kolpeak jaso eta 40 egunetara. Horrela, kontrol arratoietan, aztertutako sinapsien (n = 70) % 15.60 ± 4.26 CB_1 hartzailetik 0-400 nm-ra zeuden; % 42.09 ± 2.23 CB_1 hartzailetik 400-800 nm-ra zeuden; % 23.72 ± 4.48 800-1.200 nm-ra; eta % 18.59 ± 3.21 1.200 nm baino gehiagoko distantziara zeuden. Kolpatutako arratoietan berriz, sinapsi guztien (n = 70) % 21.01 ± 4.20 hartzailetik 400 nm baino gutxiagora zeuden; % 40.18 ± 6.50 400-800 nm bitartean; % 26.81 ± 6.81 800-1.200 nm-ra; eta % 11.99 ± 1.65 1.200 nm-tik haratago kokaturik ageri ziren. Balio horien azterketa estatistikoak agerian utzi zuen ez zegoela alderik astrozitoetan CB_1 hartzailearen banaketan, kolpatu gabeko zein lesionatutako arratoien artean ($p > 0.05$) (4b irudia).

4. irudia: 40 egunetara bihurgune horzduneko geruza molekularraren burututako azterketa estatistikoa kolpatutako zein kolpatu gabeko kontrol arratoietan. (a) CB_1 hartzaileen dentsitatea (partikulak/µm). (b) CB_1 partikula astrozitikoetatik distantzia ezberdinetara dauden sinapsi hurbilenaren ehunekoa. Datuak batezbestekoa ± SEM adierazten dira. $p > 0.05$; ** $p < 0.01$. Proba ez-parametrikoen bidez aztertu ziren (Mann-Whitney proba).



4. Ondorioak

Emaitzen atalean xehetasunez deskribatzen den bezala, arratoi gazteengan, ezkerreko kortexean jasotako garun traumatismo arinek (16 kolpe), CB_1 hartzailearen adierazpenean aldaketak eragiten dituzte hipokanpo helduan. 40 egun igaro ondoren aldaketa esanguratsuak azaleratu ziren CB_1 hartzaileen banaketan, izan ere, CB_1 hartzaileekin markatutako bukaera sinaptiko kitzikatzaile zein inhibitzaileen proportzioa txikiagoa izan zen kolpeen ondorioz eta hartzailearen partikulen dentsitatea nabarmen murriztu zen bukaera sinaptiko inhibitzaileetan.

Aurretiaz, traumatismoak eragiteko beste eredu bat erabiliz, "pisu-jauste" moduan ezaguna, frogatu da kolpeak jaso eta 24 h-ra eta 72 h-ra, CB_1 hartzailearen ARNm-aren eta proteinaren adierazpena nabarmen murrizten direla garun traumatismo itxi baten ondoren, nahiz eta 2 aste geroago maila fisiologikoak berreskuratzen diren (López-Rodríguez et al., 2015). Halaber, CB_1 hartzaileen adierazpenean gertatzen diren aldaketa horiek, korrelazio negatiboa adierazi dute edema eraketarekin eta jokabide-asaldurekin (López-Rodríguez et al., 2015). Horrez gain, eredu horretan, inpaktuaren ondorengo lehen 5 minutuetan, kolpearen ondorioz gabezia funtzionalak eta hilkortasuna (% 5-15) eragin daitezkeela ikusi da, lesio mota horrek hainbat asaldura ezberdin eragin ditzakela berretsiz.

Garun traumatismoak aztertzeko eredu asko existitzen badira ere, gaur egun gehiago erabiltzen dira inpaktu mekaniko ez sarkorrak eragiten dituztenak. Ikerketa honetan erabilitako ereduaren antzera, kalte fokalak erabili ordez, indar lineal eta birakariak erabiltzen dituztenak (Shultz et al., 2017). Ohikoa bihurtzen ari da GT arin baten ondoren garezurreko hausturarik, barne hemorragiarik eta heriotza zelular esanguratsurik agertzen ez dituzten ereduak erabiltzea (Shultz et al., 2017; Meconi et al., 2018). Brian R.

Christie doktorearen laborategiak duela gutxi sartu du ACHI eredua GT arinen ikerketetarako eredu gisa, lan hau, eredu horretan egon daitezkeen ultra-egitura mailako aldaketak deskribatzen lehenetarikoa delarik. Eredu horrek indar lineal eta birakariak sortzen ditu, eta garun traumatismo arinak modu fidagarrian ekoizteko gaitasuna frogatu du (Meconi et al., 2018).

Emaitza hauek argi eta garbi erakusten dute CB_1 hartzaileak aldaketa nabarmenak pairatzen dituela GT arinak pairatu eta 40 egunetara, bai bukaera sinaptiko kitzikatzaile zein inhibitzaileen ehunekoa nabarmen jaisten delako eta baita ere hartzaile dentsitatea nabarmen jaisten delako bukaera inhibitzaileetan. Beste faktoreen artean, aldaketa horiek garun osoko mikro odoleztatze txikiekin lotzen dira, eta ez hori bakarrik, berriki egindako ikerketetan mikrogliarekin duten lotura ere aztertzen hasia da, hain zuzen ere, sukar mekanismoek abiarazitako prozesuen partaidetzan duten garrantzian zentratu dira (Triviño-Paredes JS, argitaratu gabeko behaketak). Ez da aztertu CB_1 hartzailearen adierazpena mikroglian, baina baditugu zenbait ultra egitura mailako ebidentzia non CB_1 hartzaileak zelula horietan, baldintza normaletan, oso maila baxuetan adieraz daitezkeela erakusten dutenak. Horrela, prozesu mikroglialen % 9 inguruk CB_1 hartzailea adierazten dutela ikusi dugu.

Bihurgune horzduneko geruza molekularrean, CB_1 hartzailearen epe luzeko aldaketak, plastikotasun sinaptikoaren aldaketen oinarria izan daitezkeela deskribatu da (Peñasco et al., 2019; Castillo et al., 2012). Hipokanpoan plastikotasun hori ikaskuntzaren eta oroimenaren oinarrian dagoela jakina da (Monday et al., 2018). Horrekin loturik, Brian R. Christie doktorearen laborategian aldez aurretik frogatu dute GT arin bakar batek epe luzeko plastikotasunaren indartzean (ingelesez log-term potentiation edo LTP moduan ezaguna) eragin esanguratsua duela hipokanpoko eremu horretan (White et al., 2017), eta horrez gain behatu dute, GT arin batek kalte egin diezaiokeela epe luzeko depresioaren (ingelesez log-term depresion edo LTD moduan ezaguna) indukzioari (900 pultsu @ 1 Hz), lesioa izan eta 7 egunetara (Pinar et al., 2020).

CB_1 hartzailea BHGMko bukaera sinaptiko kitzikatzaileetan murrizteak, eKB-ek bideratutako plastikotasun sinaptikoan aldaketak eragin ditzkeela iradokitzen du. Aurretiaz, eremu horretan nerabezaroan alkohol kontsumoak eragindako CB_1 hartzailearen galerak, plastikotasunaren desagerpenarekin lotura duela ere frogatu da (Peñasco et al., 2020). Ikerketa horretan, CB_1 hartzaileak eragindako transmisio kitzikatzailearen etena eta eKB-LTD plastikotasun sinaptikoa desagertu egiten dira nerabezaroan alkohol-betekaden ereduan eta galera horiek helduaroko ezagutza-oroimenaren asaldurarekin lotura zutela deskribatu zen. Horrela, oraindik frogatu gabe badago ere, gure emaitzek GT arinen ostean behatutako CB_1 hartzailearen aldaketek plastikotasun sinaptikoaren moldaketak eta asaldura kognitiboak eragin ditzaketela iradokitzen dute.

5. Etorkizunerako norabidea

Aipatu bezala, CB_1 hartzaileak GT arinen ostean pairatutako aldaketak deskribatu dira lan honetan. Etorkizunerako helburuetako bat aldaketa horiek arratoien portaeran zer nolako eragina duten deskribatzea da, bai oroimena, ikaskuntza eta antsietate-mailak ebaluatuz. Honez gain, zelula mikroglialetan CB_1 hartzaileek pairatutako aldaketak aztertzea interesgarria dela deritzogu, egoera patologikoetan erakutsi duten partaidetza aktiboa kontutan izanik. Horrekin batera, kolpatutako arratoietan hantura erantzuna aztertuko da, inplikaturiko molekula pro eta anti inflamatorien mailak aztertuz, epe luzera egon daitezkeen aldaketetan hauen partaidetza berresteko.

6. Erreferentziak

Adams, C., Bazzigaluppi, P., Beckett, T. L., Bishay, J., Weisspapir, I., Dorr, A., ... eta Stefanovic, B. (2018), Neurogliovascular dysfunction in a model of repeated traumatic brain injury. *Theranostics* 8, 4824–4836.

Araque, A., Castillo, P. E., Manzoni, O. J. eta Tonini, R. (2017), Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology*, 124, 13-24.

Barkhoudarian, G., Hovda, D. A. eta Giza, C. C. (2016), The Molecular Pathophysiology of Concussive Brain Injury – an Update. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 27, 373–393.

Blennow, K., Hardy, J. eta Zetterberg, H. (2012), The Neuropathology and Neurobiology of Traumatic Brain Injury. *Neuron* 76, 886–899.

Caine, D., Purcell, L. eta Maffulli, N. (2014), The child and adolescent athlete: a review of three potentially serious injuries. *Sports Science, Medicine and Rehabilitation*, 6, 22.

Cassidy, J. D., Carroll, L., Peloso, P., Borg, J., Von Holst, H., Holm, L., ... eta Coronado, V. (2004), Incidence, risk factors and prevention of mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. *Journal of Rehabilitation Medicine*, 28–60.

Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E. eta Hashimotodani, Y. (2012), Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 76(1), 70-81.

Christie, B. R., Triviño-Paredes, J., Pinar, C., Neale, K. J., Meconi, A., Reid, H. eta Hutton, C. P. (2019), A Rapid Neurological Assessment Protocol for Repeated Mild Traumatic Brain Injury in Awake Rats. *Current protocols in neuroscience*, 89(1).

Cole, T. B. (2004), Global Road Safety Crisis Remedy Sought. *Journal of the American Medical Association*, 291, 2531.

Fehily, B. eta Fitzgerald, M. (2017), Repeated mild traumatic brain injury: potential mechanisms of damage. *Cell transplantation*, 26(7), 1131-1155.

Frieden, R. T., Houry, D. eta Baldwin, G. (2015), The Report to Congress on Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation is a publication of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), in collaboration with the National Institutes of Health (NIH). Atlanta, GA: CDC.

Hall, R. C. W., Hall, R. C. W. eta Chapman, M. J. (2005a), Definition, Diagnosis, and Forensic Implications of Postconcussional Syndrome. *Psychosomatics,* 46, 195–202.

Howlett, A. C., Bidaut-Russell, M., Devane, W. A., Melvin, L. S., Johnson, M. R. eta Herkenham, M. (1990), The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends in neurosciences*, 13(10), 420-423.

Jimenez-Blasco, D., Busquets-Garcia, A., Hebert-Chatelain, E., Serrat, R., Vicente-Gutierrez, C., ... eta Marsicano G (2020). Glucose metabolism links astroglial mitochondria to cannabinoid effects. Nature 583, 603–608.

Langlois, J. A., Rutland-Brown, W. eta Wald, M. M. (2006), The Epidemiology and Impact of Traumatic Brain Injury A Brief Overview. *Journal of Head Trauma Rehabilitation,* 21, 375–378.

López-Rodríguez, A. B., Acaz-Fonseca, E., Viveros, M. P. eta Garcia-Segura, L. M. (2015), Changes in cannabinoid receptors, aquaporin 4 and vimentin expression after traumatic brain injury in adolescent male mice. Association with edema and neurological deficit. *PloS one*, 10(6), e0128782.

Mckee, A. C. eta Daneshvar, D. H. (2015), "The neuropathology of traumatic brain injury," in *Handbook of clinical neurology*, 45–66.

Meconi, A., Wortman, R. C., Wright, D. K., Neale, K. J., Clarkson, M., Shultz, S. R. eta Christie, B. R. (2018), Repeated mild traumatic brain injury can cause acute neurologic impairment without overt structural damage in juvenile rats. *PLoS One 13*, e0197187.

Monday, H. R., Younts, T. J. eta Castillo, P. E. (2018), Long-term plasticity of neurotransmitter release: emerging mechanisms and contributions to brain function and disease. *Annual review of neuroscience*, 41, 299-322.

Paxinos, G. eta Watson, C. (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th ed., Academic Press. New York.

Peñasco, S., Rico-Barrio, I., Puente, N., Gómez-Urquijo, S. M., Fontaine, C. J., Egaña-Huguet, J., ... eta Grandes, P. (2019), Endocannabinoid long-term depression revealed at medial perforant path excitatory synapses in the dentate gyrus. *Neuropharmacology*, 153, 32-40.

Peñasco, S., Rico-Barrio, I., Puente, N., Fontaine, C. J., Ramos, A., Reguero, L., ... eta Grandes, P. (2020), Intermittent ethanol exposure during adolescence impairs cannabinoid type 1 receptor-dependent long-term depression and recognition memory in adult mice. *Neuropsychopharmacology*, 45(2), 309-318.

Pinar, C., Trivino-Paredes, J., Perreault, S. T., eta Christie, B. R. (2020), Hippocampal cognitive impairment in juvenile rats after repeated mild traumatic brain injury. *Behavioural brain research,* 387, 112585.

Pittella, J. E. eta Gusmao, S. N. (2003), Diffuse vascular injury in fatal road traffic accident victims: its relationship to diffuse axonal injury. *Journal of forensic sciences*, 48(3), 626-630.

Prange-Kiel, J., Wehrenberg, U., Jarry, H. eta Rune, G. M. (2003), Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus,* 13, 226-234.

Serra-Grabulosa, J. M., Junque, C., Verger, K., Salgado-Pineda, P., Maneru, C., eta Mercader, J. M. (2005), Cerebral correlates of declarative memory dysfunctions in early traumatic brain injury. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 76(1), 129-131.

Shultz, S. R., McDonald, S. J., Haar, C. V., Meconi, A., Vink, R., van Donkelaar, P., ... eta Christie, B. R. (2017), The potential for animal models to provide insight into mild traumatic brain injury: translational challenges and strategies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 76, 396-414.

Vagnozzi, R., Tavazzi, B., Signoretti, S., Amorini, A. M., Belli, A., Cimatti, M., ... eta Lazzarino, G. (2007), Temporal window of metabolic brain vulnerability to concussions. *Neurosurgery,* 61, 379–389.

White, E. R., Pinar, C., Bostrom, C. A., Meconi, A. eta Christie, B. R. (2017), Mild traumatic brain injury produces long-lasting deficits in synaptic plasticity in the female juvenile hippocampus. *Journal of neurotrauma*, 34(5), 1111-1123.

7. Eskerrak eta aipamenak:

Lan honek hainbat erakunderen diru laguntza izan du: Eusko Jaurlaritza (IT1230-19); Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III (ISC-III) eta Europar Batasunaren Europako Eskualde Garapenerako Funtsa (ERDF-EU; RD16/0017/0012); MINECO/FEDER, UE (SAF2015-65034-R); Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-107548RB-I00); JEH doktorearen kontratua (PIC 280/20), eta IBDR doktorearena (BES-2016-076766); ESG doktoreak Ikerbasque eta MINECO funtsa (MICIU/AEI/FEDER-EU; PGC2018-093990-A-I00); MS, LL, IT eta SA-ren Euskal Herriko Unibertsitateko doktoratu aurreko ikertzaileen kontratuak (PIF 19/164; PIF 18/315; PIF 17/292 eta PIF 16/251) eta AM-ren Eusko Jaurlaritzako doktoratu aurreko ikertzaile kontratua.

Proteinetan oinarritutako biomaterialen biobateragarritasunaren eta egokitasunaren azterketa kornearako ordezkoen edo matrizeen hautagai potentzial gisa

Romo-Valera, C.[1], Arluzea, J.[1], Andollo, N.[1,2]

[1]Zelulen biologia eta Histologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU)
[2]Begiker, Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketa Institutua

cristinaromo1@gmail.com

Laburpena

Azterketa honetan kornearako matrizeak garatzeko baliagarriak izan daitezkeen proteinetan oinarritutako lau biomaterialen egokitasun optikoa, biodegradagarritasuna eta biobateragarritasun zelularra ebaluatu ditugu. Kolagenoa, soja proteina isolatua (SPI) eta laktosa edo azido zitrikoarekin erretikulatutako gelatinak izan dira aztertutako filmen lehengaiak. Propietate optikoen eta degradagarritasunaren ebaluazioek kornea ehunaren eskakizunak bete daitezkeela eta biomaterialek degradazio profil progresiboa dutela erakutsi dute. Gainera, 3T3 fibroblastoekin eta HCE korneako zelula epitelialekin egindako bideragarritasun, atxikipen eta migrazio azterketek zelulen portaera egokia baieztatu dute. Hala, material hauek korneako inplanteak zein korneako zelulentzako euskarriak garatzeko etorkizun handiko materialak izan daitezkeela frogatu dugu.

Hitz gakoak: Kornearako matrizeak, Kolagenoa, Gelatina, Soja proteina isolatua (SPI)

Abstract

The current study has focused on the in vitro assessment of protein-based biomaterials that could be a potential source for corneal scaffolds. Collagen, soy protein isolate (SPI) and gelatin films cross-linked with lactose or citric acid were prepared and transmittance and degradation measurements were carried out. In vitro cytotoxicity, cell adhesion and migration studies were performed with human corneal epithelial cells (HCE) and 3T3 fibroblasts to assess the biocompatibility of the films. Transmittance values met the needs of the cornea and the degradation profile revealed a progressive decomposition of the biomaterials. Cell viability at 72 h was above 70% when exposed to SPI and gelatin films. Adhesion analysis demonstrated the adhesion of both cell types to the films, with a similar arrangement to that observed in controls. Besides, both cell lines were able to proliferate and migrate over the films. These results demonstrated that the studied biomaterials could be potential alternatives applicable in corneal bioengineering.

Keywords: *Corneal scaffolds; Collagen; Gelatin; Soy protein isolate (SPI)*

1. Sarrera eta uneko egoera

Lesio edo traumatismo handi bat jasaten dugunean, ehunei eragiten zaien kalteak hauek duten sendatze-gaitasuna gainditzen du zenbait kasutan. Ondorioz, transplanteak egitea beharrezkoa bilakatzen da ehunek beren funtzioa berrezartzeko. Hala ere, eskatzaileen eta emaileen arteko desoreka handiek eta ehun-mentuen errefusatzearekin erlazionatutako arazo posibleek irtenbide alternatiboak bilatzea ekarri dute. Ehunen ordezko berrien bilaketa honetan biomaterialen merkatua eta potentziala sartzen dira jokoan, 2021erako 150 mila milioi dolarretik hurbil daudela estimatzen delarik (Chawla, 2018).

Ehun-ingeniaritzaren alorra biomaterialen aplikagarritasunak emaitza kliniko baliotsuak ekar ditzakeen eremuetako bat da, non osagai natiboen eta zelulaz kanpoko matrizearen egitura antzeratzea helburu duten, zelulen hazkuntza eta ondorengo ehunen birsorkuntza sustatzeko. Hala, proteinetan oinarritutako materialak dira eskuragarri dauden aukeretako batzuk. Kolagenoa ehun iturri batetik eratorritako proteina interesgarrienetako bat da,

zelulaz kanpoko matrizeko proteina ugariena baita (Cen *et al.*, 2008). Ikerketa honetan txerri-larruazaletik ateratako kolagenoa erabili dugu. Biodegradagarriak, biobateragarriak, oso moldagarriak edo erraz eskuratzeko modukoak izateagatik, kolagenoa eta kolagenotik eratorritako materialen erabilera asko handitu da ehun-ingeniaritzako aplikazioetan (Matthyssen *et al.*, 2018).

Gelatina kolagenoaren desnaturalizazio partzialetik eratorritako proteina bat da, animali espezie guztien larruazal, hezur edo ehun konektibotik lortu daitekeena (Kariduraganavar *et al.*, 2014). Bere biobateragarritasunak, filmen formakuntza-gaitasunak eta biodegradagarritasunak medikuntza birsortzailean biomaterial gisa erabiltzeko aukera egokia bihurtzen dute. Era berean, polimero honen arginina-glizina-aspartiko sekuentziek zelulen atzematea errazten dute eta aminoazidoen talde funtzionalek material honen eraldaketa estrukturala ahalbidetzen dute, baita hidrogelen eraketa erraztu eta ur-bolumen handiak xurgatzeko gaitasuna ere. Gainera, erabilitako erretikulazioagenteen arabera, propietate mekaniko bereziak dituen material bat lortu daiteke. Lan honetan, gelatina bi osagairekin erretikulatu dugu: laktosarekin, Maillard erreakzioaren bitartez (Etxabide *et al.*, 2018), edo azido zitrikoarekin, zeinek amino loturak sortzen dituen gelatinaren talde aminoen eta azidoaren talde karboxilikoen artean (Najafpour, 2007).

Landareetatik eratorritako materialak ere badaude. Soja-proteinak adibidez ezaugarri onberak ditu arlo biomedikoan aplikatzeko. Zehazki, soja-proteina isolatua (SPI), soja-irinetik lortutakoa, fisikoki eta kimikoki eralda daiteke edo beste polimero batzuekin konbinatu amino eta hidroxilo taldeen bidez (Tansaz eta Boccaccini, 2016). Gainera, soja-proteinak dituen isoflabonen kopuru altuak efektu antiinflamatorio eta antioxidatzaileak ditu zauriak sendatzeko (Santin *et al.*, 2007).

Ehun-ingeniaritzaren alor honetan, korneako inplanteen garapena gaur egungo ikerketa askoren helburu bihurtu da (Hancox *et al.*, 2020) (Isaacson *et al.*, 2018)(Jumelle *et al.*, 2021) (Rico-Sánchez *et al.*, 2019) (Wang *et al.*, 2017) (McTiernan *et al.*, 2020). Jatorrizko kornea-ehuna ordeztuko luketen biomaterialen diseinuek arreta handia jaso dute azken urteotan, kornea emaileen eskasia, itxarote-zerrenda luzeak zein mentuen errefusa gainditzeko iturri izan baitaitezke.

2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa honen helburu nagusia ehun eta landare-jatorriko material ezberdinen (kolagenoa, soja proteina isolatua (SPI), gelatina-laktosa (GEL-LAC) eta gelatina-azido zitrikoa (GEL-CA)) egokitasun optikoa, biodegradagarritasuna eta biobateragarritasun zelularra ebaluatzea izan da, korneako zelulen euskarri gisa erabili daitezen.

Horretarako, zelulen ugaltze, atxikidura eta migrazio prozesuak *in vitro* aztertu dira HCE korneako zelula epitelial zein 3T3 fibroblastoekin.

3. Ikerketaren muina

3.1. Materialak eta metodoak

3.1.1. Filmen ebaluazio fisiko-kimikoa

Propietate optikoen ebaluazioa filmek argia transmititzeko duten gaitasunaren eta hauen gardentasunaren bitartez gauzatu dugu. Alde batetik filmen argi xurgapena neurtu dugu espektro ikusgarrian (400-800 nm) eta bestetik, filmeetatik 12 cm-ko distantziara kokaturiko eredu fotografiko zehatzak analizatu ditugu gardentasuna kualitatiboki neurtzeko.

Biomaterialen degradazio maila degradazio hidrolitiko eta entzimatikoaren ondorioz film bakoitzak jasandako pisu galera erregistratuz neurtu dugu. Filmak kolagenasa entzima, PBS edo ur destilatuko soluzioetan mantendu ditugu denbora tarte desberdinetan (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h eta 24 h). Ondoren, laginak soluzioetatik atera, liofilizatu eta pisatu ditugu.

3.1.2. Filmen ebaluazio biologikoa

Materialen zitotoxikotasuna frogatzeko MTT entsegu kolorimetroan oinarritu gara. 3T3 fibroblastoak eta HCE korneako zelula epitelialak film ezberdinekin kultibatu ditugu 0, 24, 48 eta 72 orduz.

Zelulen atxikidura eta filmen egokitasuna 3T3 eta HCE zelulak filmen gainean 24, 48 eta 72 orduz kultibatuz aztertu dugu. Hala, 3 metodo ezberdinetan oinarritu gara: alde batetik fase kontrasteko mikroskopioaren bitartez; bestetik Kaltzeina- Etidio 1 homodimero testaren bitartez, zeinak zelula bizi (berdez) eta hilak (gorriz) bereizteko

aukera ematen duen fluoreszentziako mikroskopioa erabiliz; eta azkenik ekorkuntz mikroskopia erabiliz, zelula eta filmen gainazalaren arteko atxikidura zehaztasunez ikusteko.

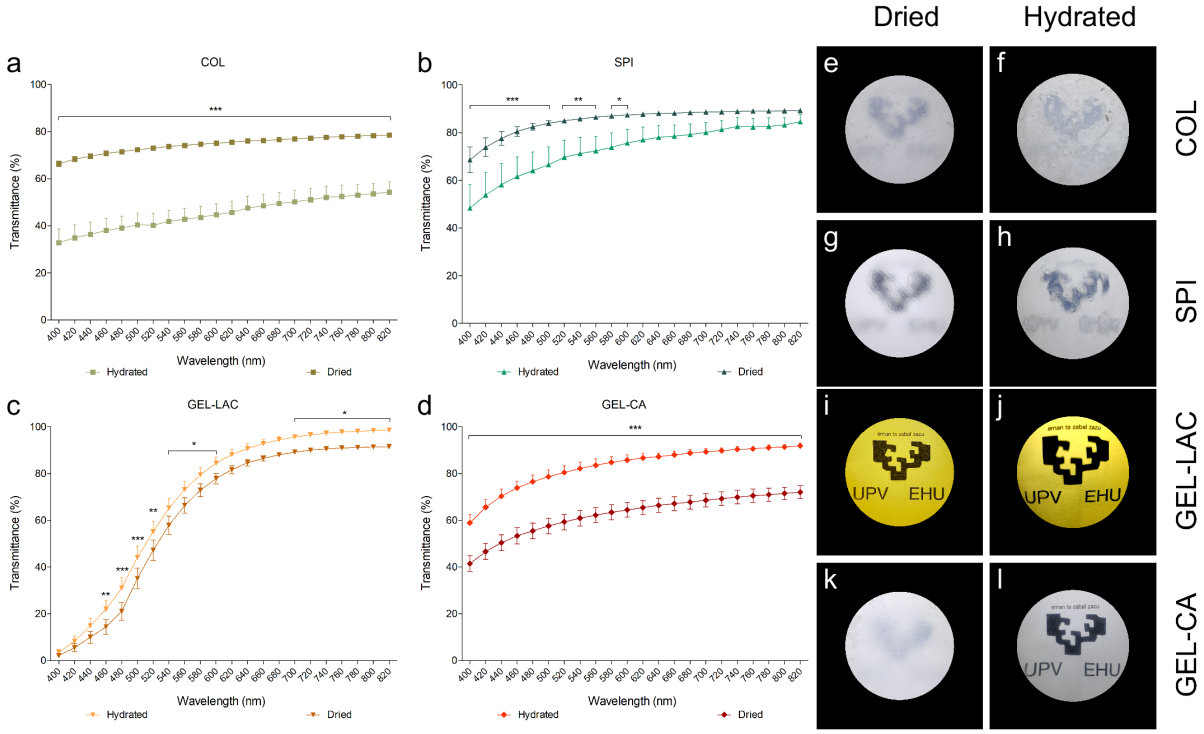
Azkenik, bi zelula motek filmen gainean migratzeko eta mugitzeko gaitasuna 24, 48 eta 72 orduz ere aztertu dugu. Proba hau filmetan zelulaz estali gabeko hutsune bat utziz eta zelulek hutsune hori betetzeko behar duten denbora erregistratuz gauzatu dugu.

3.2. Emaitzak

3.2.1. Filmen ebaluazio fisiko-kimikoa

Espectro ikusgarri osoa kontuan hartuz, kolageno eta SPI-z egindako filmek transmisio-balio baxuenak erakutsi zituzten, hidratatutako filmak zeharrargiagoak zirelarik. Nahiz eta kolageno eta SPI-z egindako lagin hidratatuak argiaren %60-80 a trasmititu espektro ikusgarrian, ez zuten gardentasun egokirik aurkeztu ez forma hidratatuan ezta forma lehorrean, distantzia batera kokatutako objektuak ezin baitziren ondo bereiztu. Gelatinaz egindako filmek, buztiek zein lehorrek, transmisio balio altuagoak eta gardentasun egokiagoa aurkeztu zuten. GEL-LAC materialak gainera, UVA izpien aurkako efektu babeslea erakutsi zuen, eskualde honetako argi erradiazioa xurgatzeko gai baitzen (400-500 nm). Material berdinean, forma lehor eta hidratatuaren arteko argi-transmisio eta gardentasunaren hobekuntzarik handiena GEL-CA filmak aurkeztu zuen (1 irudia).

1. irudia: Film ezberdinen argi transmisioa (a, b,c eta d grafikoak) eta gardentasun ezberdintasunak (e-l irudiak). Datuek argi transmisio portzentaia adierazten dute. Estatistikoki esanguratsuak diren desberdintasunak film bakoitzaren forma hidratatu eta lehorraren arteko desberdintasunei dagokie (*p $<$0.05,p $<$0.01, ***p $<$0.001; n $\geq$ 3). Gardentasuna aztertzeko erabilitako irudiak eredu berera egokituta eta baldintza berdinekin ateratakoak dira.**

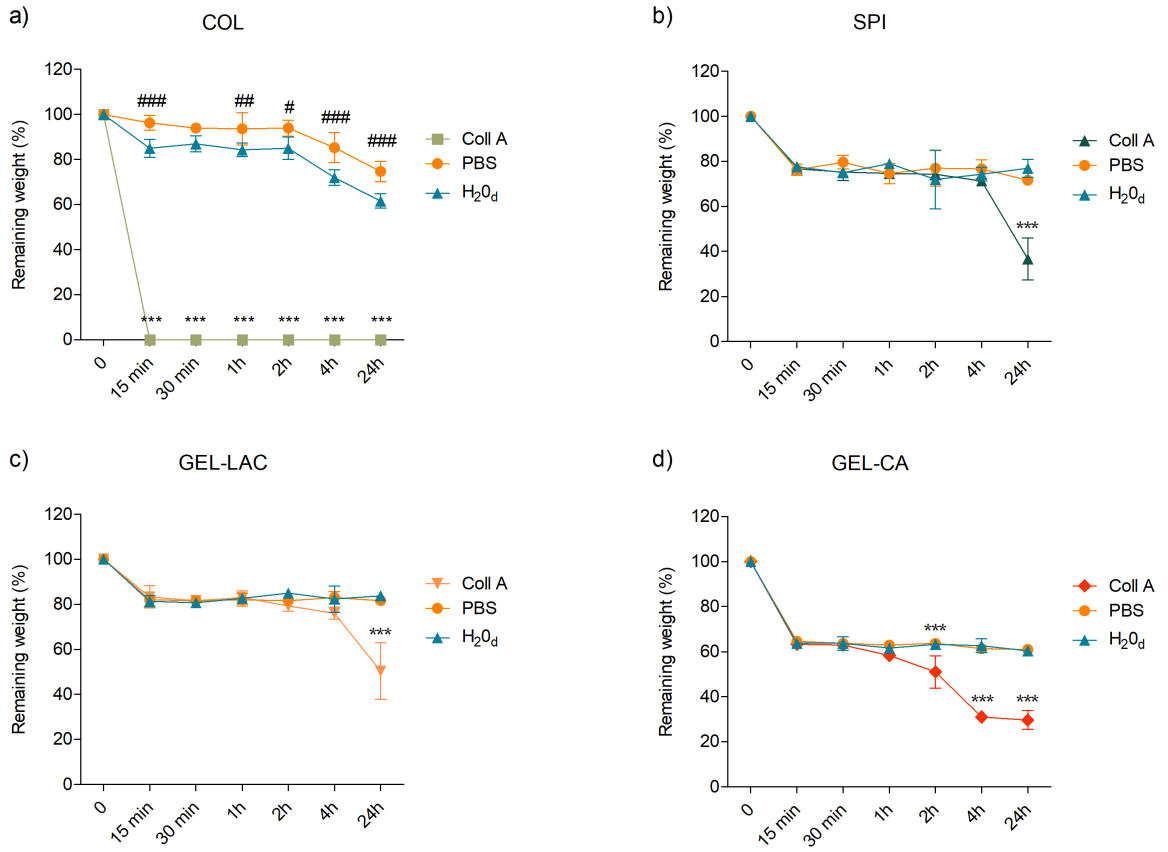


Beraz, gardentasuna izango balitz kezkarik handiena, gelatina filmak izango lirateke hautagai egokienak, laktosarekin erretikulatutakoak bereziki eguzki izpien aurkako babes gehiagarri bat eskeiniko ligukeelako.

Degradagarritasunaren haritik, erretikulazio motaren efektua argi ikusi genuen: fisikoki erretikulatutako filmak, kolagenoz eta SPI-z egindakoak kasu, azkarrago degradatu ziren kimikoko erretikulatutako gelatinak baino. Erreakzio kimikoen bidez erretikulatutako gelatinetan arreta jarriz, erreakzio kimiko motak gelatina filmeetan ere

eragina izan zuen. 24 orduren ostean, GEL-LAC filmaren %50 a degradatu gabe mantendu zen, GEL-CA filmean ordean hasierako pisuaren %40 baino gutxiagok egin zion aurre degradazioari (2 irudia). Emaitza hauek agerian jarri zuten erretikulazio agenteen garrantzia, filmen degradazio tasak neurtzeko modua eta denbora.

2. irudia: Film ezberdinen degradazio entzimatiko (kolagenasa A entzima) eta hidrolitikoen (PBS eta ur destilatua) profilak 37°C-tan. Ur destilatuan utzitako filmak kontrol gisa erabili genituen. Estatistikoki esanguratsuak diren desberdintasunak soluzio entzimatiko edo PBS eta ur destilatuaren arteko desberdintasunei dagokie (*p <0.05,p <0.01, ***p <0.001; #p <0.05, ##p <0.01, ###p <0.001; n ≥ 3).**

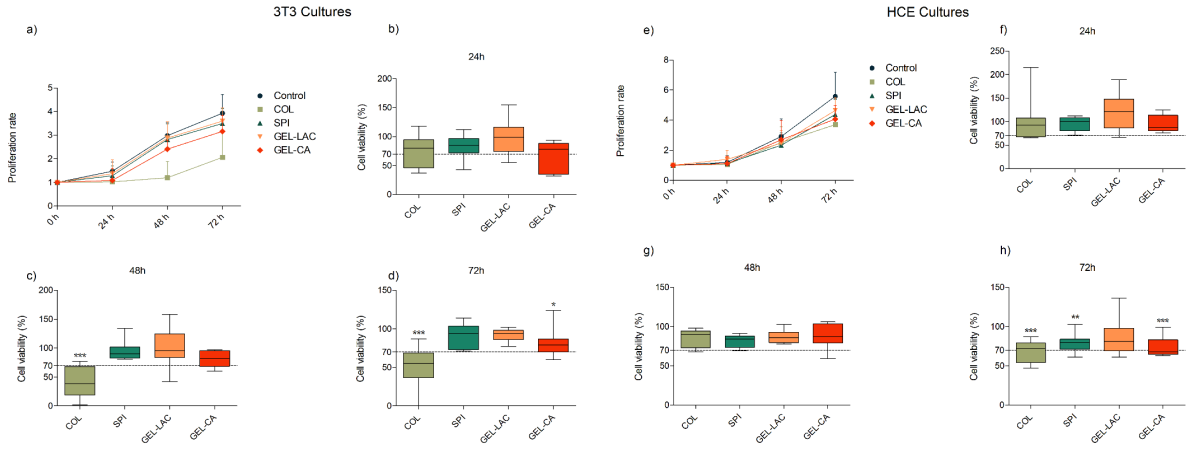


Kasu honetan, kornea-ehuna ordezteko material egoki batek begiko entzimen degradazio mekanismo progresiboei aurre egin beharko lieke ehuna birsortu eta ehun osasuntsuarekin integratzeko behar duen denboran.

3.2.2. Filmen ebaluazio biologikoa

MTT analisien bidez SPI eta gelatina filmen biobateragarritasuna frogatu genuen bi zelula motekin. Kolagenozko filmak ordea zelulentzat kaltegarritzat jo ziren, %70 baino baxuagoko bideragarritasun balioak lortu baitziren. Kontrolekin alderatuta, 72 ordutara egindako erregistroek estatistikoki alde esanguratsuak erakutsi arren, kontuan eduki behar dugu kultibo-inguruneak ez genituela denbora-tarte horretan aldatu. Baldintza hau ez litzateke egoera erreal batean gertatuko, non malkoak eta begien kliskak ingurunea etengabe berrituko luketen (3 irudia).

3. irudia: Material ezberdinek 3T3 (a-d) eta HCE (e-h) zelulen biobideragarritasunean eta proliferazioan izandako eragina 24, 48 eta 72 ordutan. Materialik gabeko kultibo zelularrak kontrol gisa jarri genituen. Estatistikoki esanguratsuak diren desberdintasunak material bakoitzarekin kultibatutako zelulen eta kontrolen arteko desberdintasunei dagokie (*p <0.05,p <0.01, ***p <0.001; n ≥ 3).**



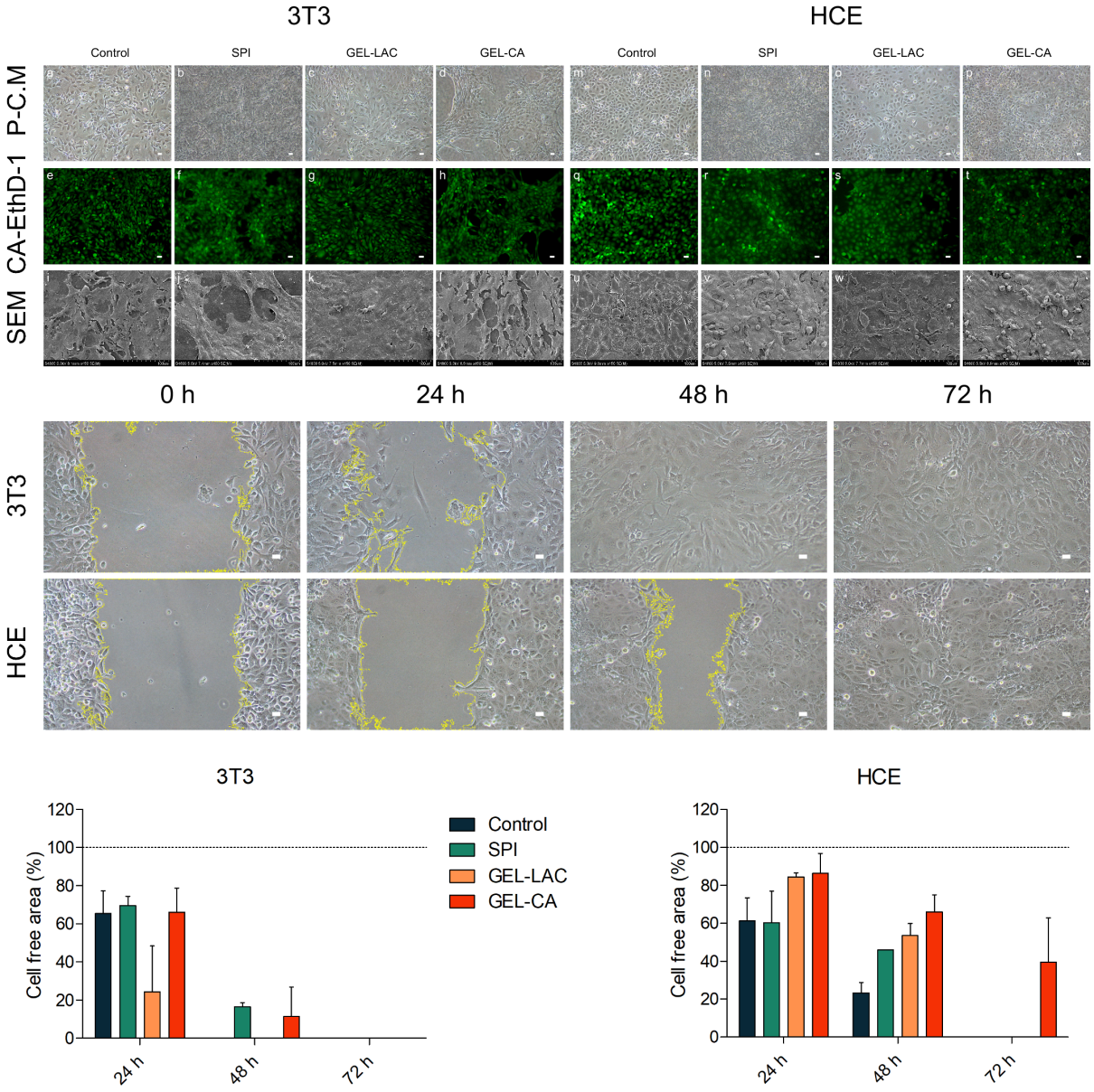
SPI eta gelatinazko filmetan ereindako 3T3 zelulek kontrolaren antzeko morfologia adarkatu eta bi/multipolarra erakutsi zuten. Halaber, HCE-en ohiko morfologia GEL-LAC filmetan erregistratu zen. SPI eta GEL-CA filmeetan hazitako HCE zelulek ordea, forma biribilagoa eta estuagoa aurkeztu zuten (a-d eta m-p 4 irudia).

Kaltzeina-Etidio 1 homodimero probari dagokionez, hildako zelula gutxi ikusi genituen 24, 48 eta 72 orduz filmen gainean ereindako bi zelula moten kultiboetan (e-h eta q-t 4 irudia). Ekorkuntz mikroskopia elektronikoko irudietan 3T3 zelulen antolaketa oso laua ikusi genuen, HCE zelulak antolaketa estratifikatu bat aurkezten zutelarik. Lagin ezberdinen artean ez zen alde morfologiko esanguratsurik hauteman (i-l eta u-x 4 irudia).

Migrazioari erreparatuz, bi zelula motek film ezberdinetan migratzeko gaitasuna erakutsi zuten. Bi kasuetan, GEL-CA filmen gaineko zelulek denbora gehiago behar izan zuten filmetako hutsuneak ixteko, dena den, kultibo zelular guztiak zelula libreko eremuak bete zituzten 72 ordutan (4 irudia).

Bi zelula-motetako bat bera ere ez zen kolageno filmetan itsatsi eta ondorioz, ezin izan genuen bideragarritasun testik eta migrazio testik egin ezta mikroskopiotik irudiak atera.

4. irudia: 3T3 eta HCE zelulen atxikidura eta migrazio proben emaitzak. a-x irudiek frogatutako filmen gaineko kultibo zelularrak erakusten dituzte (a-d eta m-p fase-kontrasteko mirkoskopiotik ateratako irudiak; e-h eta q-t Kaltzeina- Etidio 1 homodimero testaren emaitzen irudiak; i-l eta u-x ekorkuntz mikroskopia erabiliz ateratako irudiak). Bestetik, 3T3 eta HCE zelulek GEL-LAC filmaren gaineko migrazioaren eboluzioa ikus daiteke. Azkenik, grafikek zelula mota bakoitzak film mota bakoitzean egindako hutsuneak ixteko izandako eboluzioa adierazten dute.



4. Ondorioak

Azterketa honetan egindako *in vitro* ebaluazio biologikoak baiteztatu duenez, azterketapean egondako 4 film ezberdinetatik 3-k korneako zelulaz kanpoko matrizeak zein korneako zelulen euskarri diren egiturak garatzeko material gisa balio dute.

Kolagenozko filmekin lorturako emaitza desegokiek kolageno zuntzen aurre tratamenduarekin dute zerikusia, emaitza hauek ez zaizkio lehengaiari berari egotzi.

Nahiz eta propietate biologiko egokiak erakutsi, soja proteina isolatuz egindako filmak ez lirateke kornea zentralean txertatzeko aukerarik egokiena izango, ez baitute argitasun eta definizio optiko egokia aurkeztu. Hala ere, kornea periferikorako edo beste ehun baten euskarriak garatzeko balio lezakete.

Laburbilduz, gelatinazko filmek aurkeztu dituzte propietate egokienak kornea ehuna ordeztuko lituzketen euskarriak garatzeko, laktosarekin erretikulatutako filmek bereziki, propietate optiko eta biologiko onak erakutsi baitituzte.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Azterketa honek lehen ebaluazio biologiko gisa balio izan badu ere, biomaterial hauek kornea-ehuna ordezteko erakutsi duten potentzialak hauen inguruko azterketa sakonago bat egitera bultzatzen dute. Hala, azken helburua biomaterial hauek korneako inplante zein matrizeetan erabili ahal izatea da.

6. Erreferentziak

Cen, Lian, Wei Liu, Lei Cui, Wenjie Zhang, eta Yilin Cao. 2008. Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. *Pediatric Research* 63.492–496.

Chawla, Kanika. 2018. *Biomaterials for Tissue Engineering*, volume 1758 of *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York.

Etxabide, A, R D C Ribeiro, P Guerrero, A M Ferreira, G P Stafford, K Dalgarno, K de la Caba, eta P Gentile. 2018. Lactose-crosslinked fish gelatin-based porous scaffolds embedded with tetrahydrocurcumin for cartilage regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules* 117.199–208.

Hancox, Zoe, Saeed Heidari Keshel, Safiyya Yousaf, Morvarid Saeinasab, Mohammad-Ali Shahbazi, eta Farshid Sefat. 2020. The progress in corneal translational medicine. *Biomaterials Science* 8.6469–6504.

Isaacson, Abigail, Stephen Swioklo, eta Che J Connon. 2018. 3D bioprinting of a corneal stroma equivalent. *Experimental eye research* 173.188–193.

Jumelle, Clotilde, Ehsan Shirzaei Sani, Yukako Taketani, Ann Yung, Fanny Gantin, Sunil K Chauhan, Nasim Annabi, eta Reza Dana. 2021. Growth factor-eluting hydrogels for management of corneal defects. *Materials Science and Engineering: C* 120.111790.

Kariduraganavar, Mahadevappa Y, Arjumand A Kittur, eta Ravindra R Kamble. 2014. Chapter 1 - Polymer Synthesis and Processing. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, ed. by Sangamesh G Kumbar, Cato T Laurencin, eta Meng Deng, 1–31. Oxford: Elsevier.

Matthyssen, Steffi, Bert Van den Bogerd, SorchaÑí Dhubhghaill, Carina Koppen, eta Nadia Zakaria. 2018. Corneal regeneration: A review of stromal replacements. *Acta Biomaterialia* 69.31–41.

McTiernan, Christopher D, Fiona C Simpson, Michel Haagdorens, Chameen Samarawickrama, Damien Hunter, Oleksiy Buznyk, Per Fagerholm, Monika K Ljunggren, Philip Lewis, Isabel Pintelon, David Olsen, Elle Edin, Marc Groleau, Bruce D Allan, eta May Griffith. 2020. LiQD Cornea: Pro-regeneration collagen mimetics as patches and alternatives to corneal transplantation. *Science Advances* 6.

Najafpour, Ghasem D. 2007. CHAPTER 12 - Production of Citric Acid. In *Biochemical Engineering and Biotechnology*, ed. by Ghasem D Najafpour, 280–286. Amsterdam: Elsevier.

Rico-Sánchez, Laura, Ingrid Garzón, Miguel González-Andrades, Antonio Ruíz-García, Miriam Punzano, Antonio Lizana-Moreno, Jose Ignacio Muñoz-Ávila, Maria Del Carmen Sánchez-Quevedo, Juliana Martínez-Atienza, Luis Lopez-Navas, Rosario Sanchez-Pernaute, Roke Iñaki Oruezabal, Santiago Medialdea, Maria Del Carmen Gonzalez-Gallardo, Gloria Carmona, Sara Sanbonmatsu-Gámez, Matías Perez, Pilar Jimenez, Natividad Cuende, Antonio Campos, eta Miguel Alaminos. 2019. Successful development and clinical translation of a novel anterior lamellar artificial cornea. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 13.2142–2154.

Santin, Matteo, Christopher Morris, Guy Standen, Luigi Nicolais, eta Luigi Ambrosio. 2007. A New Class of Bioactive and Biodegradable Soybean-Based Bone Fillers. *Biomacromolecules* 8.2706–2711.

Tansaz, Samira, eta Aldo R Boccaccini. 2016. Biomedical applications of soy protein: A brief overview. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 104.553–569.

Wang, Siran, Chiara E Ghezzi, Rachel Gomes, Rachel E Pollard, James L Funderburgh, eta David L Kaplan. 2017. In vitro 3D corneal tissue model with epithelium, stroma, and innervation. *Biomaterials* 112.1–9.

7. Eskerrak eta oharrak

- BIOMAT (Biopolymeric Materials) taldeari (Gipuzkoako Ingeniaritza eskola EHU) filmen produkzio eta karakterizazioagatik.
- Egileek, SGIkerren (UPV/EHU/ FEDER, EU) mikroskoskopia analitikoan eta elektronikoan emandako laguntza teknikoa eta giza babesa eskertzen dituzte.

Nutrizio irakasgaiaren eragina Erizaintzako ikasleen elikadura-lehentasun eta -ezinikusietan

Ayesta, I.[1], Caballero, S.[1], Fernández, J.[1], Lamas, M.M.[2,3], San Juan, A.[1], Gravina, L.[1,2]
1 Erizaintza Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, UPV/EHU
2 Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketa Institutoa
3 Osakidetza, Bilbo-Basurtuko Erakunde Sanitario Integratua, Basurtuko Unibertsitate Ospitalea
irati.ayesta@ehu.eus

Laburpena

Ikasleek elikadura txarra jarraitzen dutela erakutsi dute unibertsitatean egindako ikerketek, baita Osasun Zientzien arloko ikasleen kasuan. Karreran zehar, dieta osasungarria jarraitzeko ezagutzak eskuratzen dituzte. Hala ere, oraindik ez dakigu nutrizio ikasketek elikadura-zaletasunak/-gustuak aldatzen dituzten ala ez. Azterlan honen helburua Erizaintzako lehen mailako ikasleen elikagai-lehentasunetan eta abertsioetan Nutrizio irakaskuntzaren eragina ebaluatzea izan zen. Ikasturte hasieran ikasleek haragia, gozoak eta arrainak kontsumitzea hobetsi zuten. Lehen lauhilekoaren ondoren, haragi kontsumoaren lehentasunak % 11,6 egin zuen behera, gozokienak % 9,7 eta aperitiboenak % 8,6. Aldiz, arrautzen kontsumo lehentasunak % 1,2 egin zuen gora, eta zerealen kontsumoak % 16,5. Ondoriozta dezakegu lehen lauhilekoaren amaieran ikasleek elikadura-lehentasunak aldatu zituztela, osasungarriagoak izan baitziren Nutrizio irakasgaia jaso ondoren.

Hitz gakoak: elikadura-lehentasunak, elikadura-ezinikusiak, ikasleak, erizaintza, nutrizioa.

Abstract

Previous research in university students has observed that students follow a low-quality diet, even students of Health Sciences. During their period in university, they acquire knowledge to follow a healthy diet. However, it is still unknown whether teaching nutrition causes a real change in their food preferences/tastes. This study aimed to evaluate nutrition education's impact on food preferences/aversions in first-year nursing students. At the beginning of the course, students showed a greater preference for meat, sweets, and fish. After the first term, the preferred consumption decreased by 11.6% in meat, 9.7% in sweets and 8.6% in fish. On the contrary, eggs increased by 1.2% and cereals by 16.5%. We can conclude that after studying the subject of nutrition, the students changed their food preferences, making them healthier.

1. Sarrera eta motibazioa (Formatu orokorra eta bibliografia)

Erizaintzako ikasleek nutrizioari buruzko kontzeptuak ulertu behar dituzte, pazienteei kalitatezko nutrizio arreta eta heziketa emateko (Boeykens eta Van Hecke, 2018). Erizaintzako profesionalen eginkizunetako bat osasuna sustatzeko programetan esku hartzea da, herritarren artean dieta osasungarriak (Gormley eta Melby, 2020) eta bizitza osasungarria (Fontaine et al., 2019) sustatzeko helburuarekin. Unibertsitateko lehen urtean, Erizaintzako ikasleek elikadura osasungarriari buruzko oinarrizko ezagutzak eskuratzen dituzte. Nutrizio ikasgaia barneratu ondoren, ikasleek gizabanakoen egoera fisiologikoaren arabera nutrizio-beharrak identifikatzeko gaitasuna eskuratzen dute, haien elikadura-ohiturak interpretatuz.

Hala ere, zenbait egilek adierazi dute Erizaintzako ikasketa planek ez dituztela nutrizioaren kontzeptuak behar bezala argitzen (Buxton eta Davies, 2013; Van Horn et al., 2019). Horrek esan nahi du, karreran zehar, nutrizio ikasgaiak jasotzeak ez duela ziurtatzen etorkizunean Erizaintzan jardungo dutenek pazienteen nutrizio-osasunarekin lotutako zenbait zeregin egiteko behar besteko

ulermena lortu dutenik. Horregatik, beharrezkoa da ikertzea nola eragiten dion unibertsitateko irakaskuntzak ikasleek kontzeptuak bereganatzeko gaitasunari , eta baita teoria praktikan jartzeko gaitasunari ere.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Unibertsitaterako sarrera bizitzako garai kritikoa izan daiteke, nerabeek heldu gisa hasten baitute bizitza, etxea utzi eta unibertsitate ikasketak hasi ondoren (Arnett, 2014). Unibertsitaterako trantsizioari elikadura-nahasmenduen intzidentzia handia (Slane et al., 2014) eta pisua handitzea (Cluskey eta Grobe, 2009) lotu zaizkio. Ordutegi akademikoei loturiko portaera sedentarioen ondorioz (Chim et al., 2020) eta atsedenaldi edo otorduetan elikadura-jokabide osasungarriak mantendu ordez janari lasterra eta freskagarri karbonatatuen kontsumoa leheneztearen ondorioz, obesitate-maila eta diabetes arrisku handiagoak hauteman dira unibertsitateko ikasleen artean (Santos et al., 2016).

Frogek iradokitzen dute gazteen obesitateak eta osasungarriak ez diren portaerek beste ondorio kaltegarri batzuk eragiten dituztela osasunean. Hala nola errendimendu akademiko txikiaz gain (Odlaug et al., 2015), depresioa (Odlaug et al., 2015), gaixotasun kardiobaskularrak (Carvalho et al., 2015) eta elikadura-nahasmenduak (Lipson eta Sonneville, 2017). Gizenak diren gazteak helduaroan ere hala izaten jarraitzeko joera dutela ere badakigu (Singh et al., 2008). Ondorioz, unibertsitate garaia aukera paregabea da elikadura-jokabideak birbideratzeko (El Ansari et al., 2012), etorkizunean osasun-arazoak agertzea prebenituz.

Dieta orekatua eta egokia izateko, elikagai-taldeak behar bezala konbinatu behar dira dietan, makronutrienteen, bitaminen eta mineralen beharretara egokituz. Dieta mediterraneoa patroi dietetiko orekatu eta osasungarriaren adibide bat da (Galbete et al., 2018), eta dieta osasuntsu bati egotz dakiokeen kalitate-maila ematen digu. Hala ere, aurretik egindako azterlanek erakutsi dute dietak kalitate txarra duela unibertsitateko biztanleen artean (Sogari et al., 2018), eta nabarmentzekoa da loditasuna garatzeko arrisku handiagoa dakarten azukre, koipe eta sodio asko kontsumitzen direla (Shan et al., 2019). Horregatik guztiagatik, unibertsitateko ikasleak biztanleria zaurgarria dira, eta elikadura-ohitura txarrak izateko arrisku handia dute. Ondorioz, pisua handitu eta (Vadeboncoeur et al., 2015), batez beste 4 kilo irabaz ditzaketelarik (Vella-Zarb eta Elgar, 2009).

Elikadura-lehentasunak elikagai batekiko gustu gisa definitzen dira psikologian. Zentzu zabalagoa ere izan dezakete, hala nola zer jan, zer kantitatetan eta zer maiztasunekin adierazten duten elikadura-patroi jakin batzuekiko joera (Coral, 2015). Elikadura-lehentasunak erabakigarriak dira jateko elikagai bat aukeratzeko orduan; beraz, jaki jakin batzuekiko zaletasuna eta beste batzuekiko ezinikusia ezagutzea oso garrantzitsua da ikasleen elikadura-portaera azaltzeko.

Aurrez buruturiko azterlanek unibertsitate sarbidearekin batera elikadura-jokabidean izan daitezkeen aldaketak aztertu badituzte ere (Hilger et al., 2019; Lupi et al., 2015), oraindik ez dakigu unibertsitateko irakaskuntzak nutrizioan izan dezakeen hezkuntza-eragina ikasleen elikadura-portaeran. Hori interesgarria izan liteke Osasun Zientzietako ikasleentzat ere; izan ere, aurretik egindako ikerketek azaldu dutenez, Medikuntza eta Erizaintzako ikasleek atxikidura txikia dute dieta mediterraneoarekiko (Antonopoulou et al., 2019), graduan nutrizioari buruzko informazioa jaso arren.

Horregatik, unibertsitateko ikasleen elikadura egokiena ez dela ikusirik, eta gainera Osasun zientzietako ikasleen kasun horrek haien osasunean ez ezik, lanbidean ere eragin dezakeela ikusirik: Interes berezia du ikasleen elikadura-lehentasunak (gehien gustatzen zaizkien elikagaiak) eta elikadura-ezinikusiak (gutxien gustatzen zaizkien elikagaiak) zein diren aztertzea.

Informazio honek haien elikadura-portaerak azal ditzakete, bai eta ikaskuntza prozesuaren ondorioz egindako aldaketak behatzeko aukera eman.

Ikerketa honen helburua erizaintzako lehen mailako ikasleen nutrizio irakaskuntzak elikagaien lehentasunetan/abertsioetan duen eragina ebaluatzea izan zen. Horretarako, honako helburu espezifiko hauek zehaztu ziren.

2.1 Helburu ezpezifikoak

1) Unibertsitatearen hasieran Erizaintzako ikasleei gehien eta gutxien gustatzen zaizkien elikagaiak esploratzea.

2) Ikasturte hasieran Erizaintzako ikasleei gehien eta gutxien gustatzen zaizkien jakiak zeintzuk diren aztertzea.

3) Lehenengo lauhilekoaren hasieran eta amaieran, elikagaien hobespenetan eta ezinikusietan eta plater gogokoenetan eta gaitzetsietan izandako aldaketak ebaluatzea.

3. Ikerketaren muina

3.1. Material eta metodoak

Ikerketan, Euskal Herriko Unibertsitateko (EHU) 2019-20 ikasturteko Medikuntza eta Erizaintza Fakultateko Erizaintza Graduko lehen urteko 193 ikaslek parte hartu zuten. Parte-hartzaile guztiei azterlanaren berri eman zitzaien eta borondatez parte hartu zuten. Ikerlana EHUko Gizakien Ikerketarako Etika Batzordeak onartu zuen (CEISH, M10_2019_175).

Parte-hartzaileek galdeketa autoinformatu bat osatu zuten on-line, "Giza Gorputzaren Egitura eta Funtzioa II" irakasgaiaren hasieran (EFII) eta amaieran (15 aste geroago). Galdetegi horretan datu antropometrikoak (adina, sexua, pisua, neurria) eta elikadura-lehentasunei eta -abertsioei buruzko galdera irekiak jaso ziren (Martínez-Portillo, 2011). Lehentasunak 3 puntuko Liker eskalarekin ebaluatu ziren "zerrendatu 1etik 3ra gustukoen dituzun elikagaiak" galderaren bidez. Horrela, ikasleek 13 elikagai-talde aukeratu behar zituzten: haragia, hestebeteak, arrainak, arrautzak, esnekiak, zerealak, frutak, barazkiak, lekaleak, gozogintza, freskagarriak, alkohola eta aperitiboak. Abertsioak "hautatu gutxien gustatzen zaizkizun elikagaiak" galderaren bidez ebaluatu ziren, aurreko sailkapenetik aurrera. Plater kozinatuen lehentasunak/ezinikusiak galdera honen bidez lortu ziren: "Oro har, gehitu gehien/gutxien gustatzen zaizkion hiru platerak". Kasu honetan, gehitutako platerak, ondoren, 13 elikagai taldeetan sailkatu ziren, euren osagai nagusiaren arabera. Sailkapen hori USDAko elikagaien konposizio-taulan oinarrituta egin zen (2017-2018).

EFII irakasgaiak mantenugaiei, mantenugaien digestioari, mantenugaien metabolismoari eta elikadura osasungarriari buruzko gai-zerrenda du. Ikasgaia ikasi ondoren, ikasleek nutrizio-beharrak identifikatzeko gaitasuna jasotzen dute, pertsonaren egoera fisiologikoaren arabera, eta elikadura-ohiturak interpretatzen dituzte. Ikasgai hau ikasi ondorengo ikaskuntzaren emaitzak honako hauek izan ziren: 1) Funtsezko mantenugaiak dituzten elikagai-taldeak lokalizatzea; 2) Biztanleriaren elikadura-ohitura txarrak ezagutzea banakako dietaren analisiaren bidez; 3) Biztanleriarentzako dieta orekatuaren kontzeptua azaltzea; 4) Biztanleria orokorrarentzat gomendatzen diren gomendio dietetikoak ezagutzea.

Gorputz-masaren indizea (GMI) kalkulatu zen, ezarritako pisua (kg)/neurria (m2) formula aplikatuta (Curilem et al. 2016). Beraz, 18,5 baino gutxiagoko balioek gutxiegitasuna adierazten dute, 18,5 eta 24,9 artean normopesoa, 15 eta 29,9 artean gehiegizko pisua eta 30 baino gehiagoko balioek obesitatea.

Erantzunak jaso ondoren, SPSS (V.23) estatistika-programa erabiliz aztertu ziren. Aldagai kategorikoen deskribapena maiztasun eta ehunekoetan adierazi zen, eta aldagai kuantitatiboak batez bestekoan eta desbiderapen estandarrean. Chi-Cuadradoko proba estatistikoa egin zen, unibertsitateko karreraren hasieran jakien eta plateren lehentasunen arteko aldeak ezartzeko. McNemar proba estatistikoa erabili zen irakaskuntzaren hasieran eta amaieran elikagai-talde bakoitzean gertatutako aldaketak aztertzeko, eta $p < 0,05$ean ezarri zen adierazpen-maila.

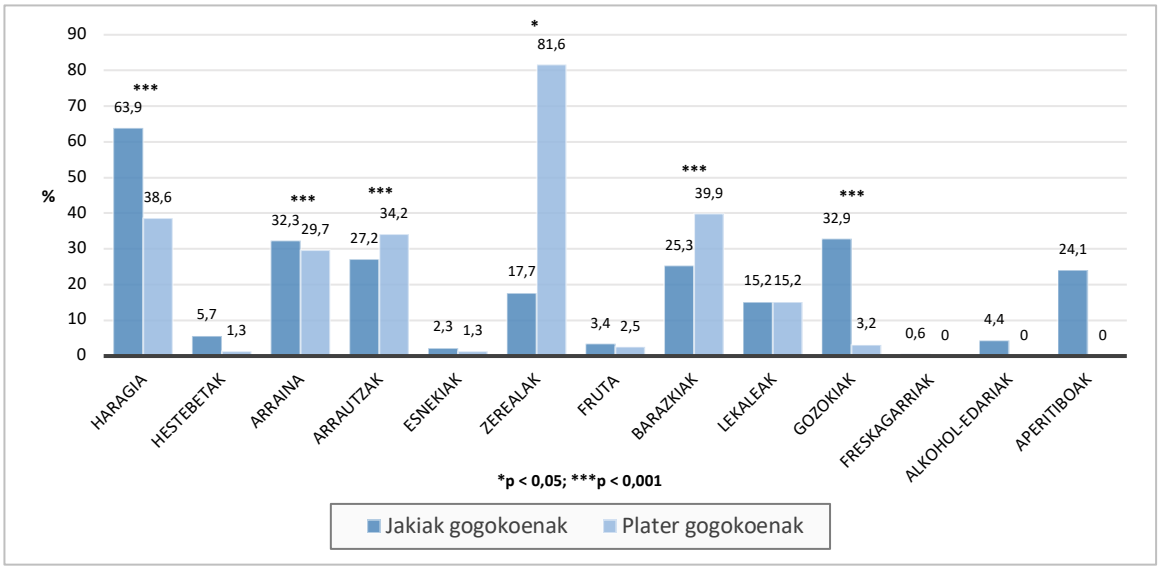
3.2. Emaitzak

180 emakumek eta 16 gizonek, 19,27 urteko batez besteko adinarekin, bete zuten galdetegia. Unibertsitateko ikasleen% 86,6 normopisua zen, % 4,9k gehiegizko pisua zuen,% 0,6k obesitatea eta% 7,9k gutxiegitasun ponderala zuen.

3.2.1. Elikadura-lehentasunak ikasturtearen hasieran

Elikadura-lehentasunei dagokienez, haragia (% 63,9), gozoak (% 32,9) eta arraina (% 32,3) izan ziren Erizaintzako ikasleen elikagai gogokoenak. Haragien artean, haragi gorria (% 22,2) eta oilasko/indioilar/untxi haragia (% 11,7) izan ziren gustukoenak. Gainera, plater gogokoenetatik gehienek (% 81,6) zerealak zituzten, % 39,9k barazkiak eta% 38,6k haragia. Ikasleek nahiago zituzten zerealak ($p < 0,05$), barazkiak ($p < 0,001$) eta arrautzak ($p < 0,001$) plater prestatu baten zati gisa, elikagai gisa baino. Aldiz, haragia ($p < 0,001$), arraina ($p < 0,001$) eta gozokiak ($p < 0,001$) elikagai gisa hobesten ziren, eta neurri txikiagoan, plater prestatu baten zati gisa.

1. Irudia. Erizaintzako ikasleen elikagai-lehentasunak (jakiak eta plater gogokoenak) unibertsitatearen hasieran.

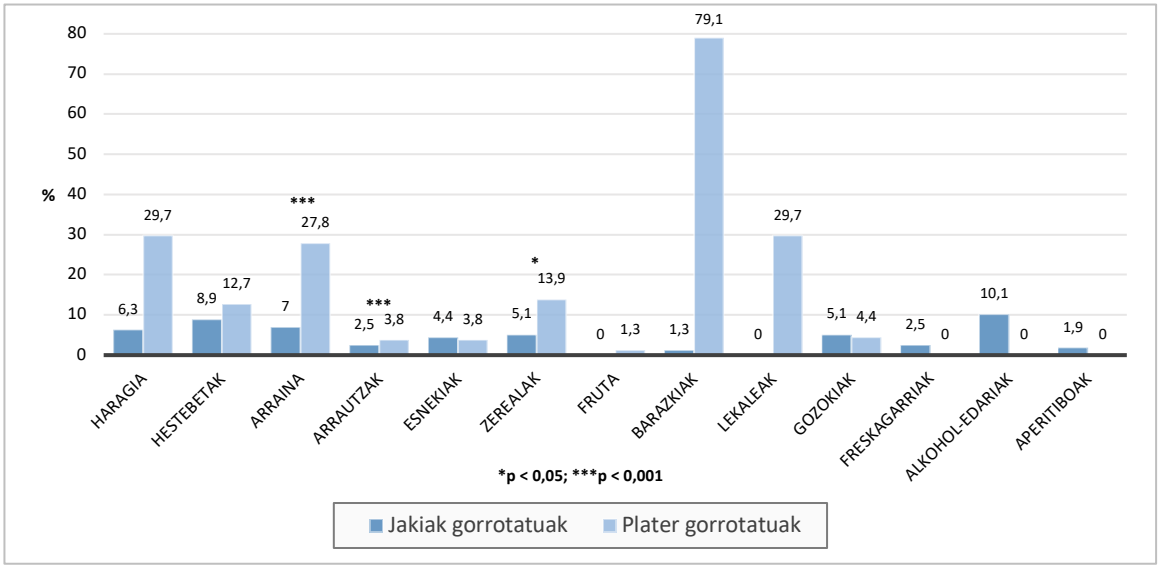


*Estatistikoki esanguratsuak diren ezberdintasunak Chi-Karratu probako.

3.2.2. Elikadura-abertsioak ikastaroaren hasieran

Ikasleek elikagai jakin batzuk gutxiago lehenezten zituzten, hala nola edari alkoholdunak (% 10), hestebeteak (% 8,9) edo arraina (% 7). Gainera, gustuko ez zituzten prestatutako plateretan barazkiak (% 79,1), haragia (% 29,7) edo lekaleak (%) zeuden. Arraina ($p < 0,001$), arrautzak ($p < 0,001$) eta zerealak ($p < 0,05$) elikagai gisa baino gutxiago lehenezten zituzten plater prestatu baten zati gisa.

2. irudia. Unibertsitatearen hasieran erizaintzako ikasleen elikagai-ezinikusiak (jakiak eta plater gorrotatuak).

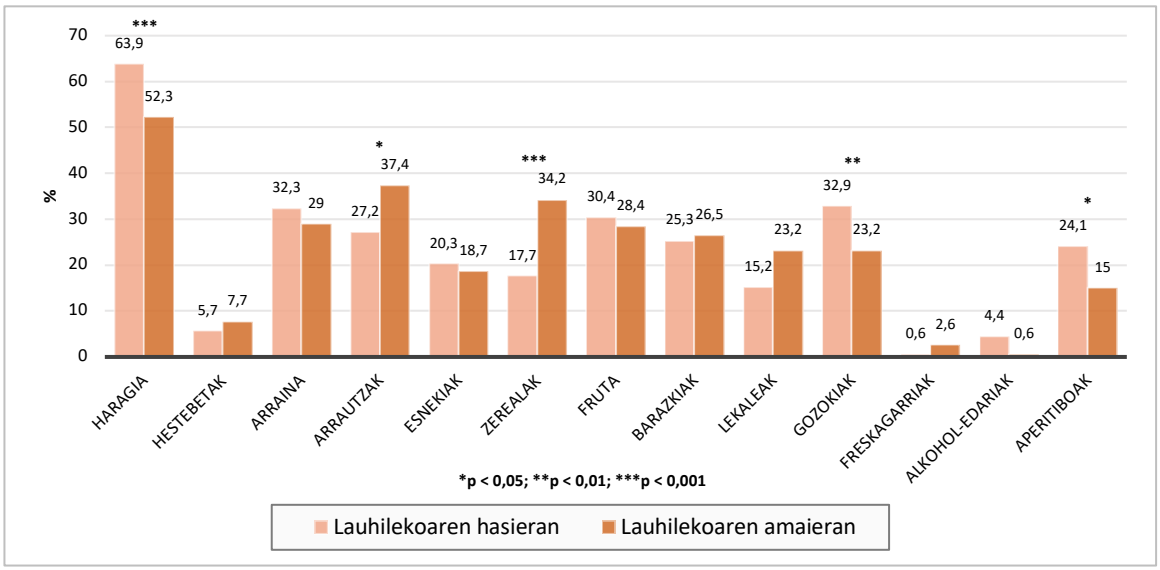


*Estatistikoki esanguratsuak diren ezberdintasunak Chi-Karratu probako.

3.2.3. Ikastaroaren amaieran izandako aldaketak

Lauhilekoaren amaieran eta nutrizio irakasgaia jaso ondoren, %11,6 egin zuten behera okelaren kontsumoak ($p < 0,001$),% 9,7 gozokien kontsumoak ($p < 0,01$) eta% 8,6 aperitiboenak ($p < 0,05$). Gainera, arrautzen kontsumoa% 10,2 igo ($p < 0,05$) eta zerealena% 16,5 ($p < 0,001$). Hala ere, ez zen aldaketarik aurkitu elikagaien abertsioetan lauhilekoaren amaieran.

3. irudia. Elikadura-lehentasunen aldaketak lauhilekoaren hasieran eta amaieran, nutrizioa irakasgaia jaso ondoren.



*Estatistikoki esanguratsua McNemar probaren ondoren

3.3. Eztabaida

3.3.1. Ikerketaren emaitza nagusia

Ikerketa honetan, Erizaintzako ikasleek unibertsitateko karreraren hasieran dituzten elikadura-lehentasunak eta -ezinikusiak deskribatu dira. Gainera, elikadura-lehentasun horiek lehen lauhilean nutrizio eta elikadura osasungarriari buruzko irakaskuntza jaso ondoren izandako aldaketak ebaluatu ditu. Emaitzen arabera, unibertsitateko irakaskuntzak eragina du ikasleek gogokoen dituzten jaki eta plateretan. Gainera, badirudi lehentasun horiek dieta mediterraneotik hurbilago daudela; izan ere, haragia, gozo eta zizka-mizken lehenesteak behera egiten du, eta, aldi berean, arrautza eta zerealak lehenesteak gora.

3.3.2. Gai honi buruz ezagutzen dena

Dietaren kalitatea asko aztertu da, Europako unibertsitate-ikasleekin ez ezik (Hadjimbei, 2016; Teodoridis, 2018), maila nazionalean ere (Pastor, 2017; Zurita-Ortega, 2018). Ikerketa horien ondorioek agerian uzten dute Espainiako unibertsitateko ikasleek ez dutela dieta osasungarria jarraitzen eta horrek eragina izan dezakeela emaitza akademikoetan (Gianfredi, 2018), osasunaren pertzepzioan (Barrios-Vicedo, 2014), estresaren mailan (El Ansari, 2012), lo zikloan (Gianfredi, 2018) eta osasun mentalean (Sanchez-villegas, 2009). Horregatik, dieta mediterraneoarekiko atxikidura txikia duten ikasleak goiz detektatzea oso lagungarria izan daiteke unibertsitatean dauden bitartean albo ondorio guztiak saihesteko eta beren elikadura-lehentasunak alda ditzaketen estrategia berriak proposatzeko.

Osasungarriak ez diren elikagaiak, azukreetan edo koipeetan aberatsak direnak, maiz kontsumitzen dituzte estresatutako pertsonek larritasun-aldi horri aurre egiteko (Macht, 2008), eta, gainera, elikagai osasungarrien kontsumoa murriztu egiten da garai hauetan. Unibertsitateko ikasleek estres-maila handiak izaten dituzte (Beiter et al., 2015), eta horrek aldaketak ekar ditzakeela beren bizimoduan eta elikagaien kontsumoaren aukeraketan.

Ikerketa ugari egin dira gazteekin, eta ikertzaileek hainbat nutrizio-esku-hartze proposatu dituzte, jarduera fisikoarekin konbinatuta edo konbinatu gabe, ikasleen bizi-kalitatea hobetzeko. Horietako askok bizimoduan aldaketak sustatzea lortu dute osagai anitzeko esku-hartzeetatik abiatuta (dietan, jarduera fisikoan eta pisuan esku hartuz) (Duan et al., 2017; Brace et al., 2018). Elikaduraren arloko emaitzarik onenak 12 asteko gehieneko iraupeneko nutrizio-esku-hartzeetan lortu ziren (Plotnikoff et al., 2015). Horregatik, aldez aurretik frogatuta geratu da nutrizio-esku-hartzeak beharrezkoak direla unibertsitateko elikadura-ereduetan jokabide-aldaketak eragiteko.

Erizaintzako graduan etorkizuneko profesionalek beren lanbidean jarduteko ezagutza eta gaitasun egokiak eskuratzen dituzten. Hala ere, autore batzuek Erizaintzako ikasketa-planek ez dutela nutrizioaren kontzeptuen ulermen argirik eskaintzen identifikatu dute (Buxton eta Davies, 2013; Van Horn, 2019), eta ez dutela ziurtatzen pazienteei kalitatezko arreta ematea ahalbidetuko dien ezarpen praktikorik (Boeykens, 2018). Ondorioz, arlo honetan ezagutza sendorik ez izatea oztopo izan daiteke, ez bakarrik nutrizio-kalitatera bideratutako erizaintzako zaintzetarako, hala nola dieta osasungarrien sustapenerako (Gormley & Melby, 2020) eta bizitza osasungarrirako (Fontaine et al., 2019), baita osasun-arloko etorkizuneko profesional eta agente horien osasunerako ere. Horregatik, erizaintzako irakasleek zeregin garrantzitsua dute ezarritako ikaskuntza-emaitzak lortzeko balio duten irakaskuntza eta ikaskuntza metodologiak aukeratzeko orduan (Hagler & Morris, 2018).

3.3.3. Ikerketa honen ekarpena

Ikerketa honen emaitzek erakusten dutenez, unibertsitatearen hasieran, ikasleek osasungarriak ez ziren eta haragi eta gozoak jateko gogo handiagoa zuten, baita barazkiak edo lekaleak zituzten platerak jateko joera txikiagoa ere. Hala ere, osasungarria ez den joera hori murriztu egin zen Erizaintza Graduko

lehen lauhileko akademikoan nutrizioari buruz ikasitako kontzeptu berriei esker. Beraz, ikerketaren arabera, unibertsitate-karreran nutrizioari buruz eskainitako irakaskuntzak eragin positiboa du ikasleen elikadura-lehentasunetan. Elikadura-abertsioetan alderik ez aurkitzeak gustoko ez diren jaki/plateren aukeraketan elikadura osasungarriari buruzko ezagutza areagotzeak eraginik ez duela adierazten du.

3.4. Mugak

Azterlan honek zenbait muga ditu. Lehenik eta behin, ezin izan da genero-azterketarik egin, Erizaintza arloko ikasle gehienak emakumezkoak direlako. Bigarrenik, lortutako emaitzak kontu handiz hartu behar dira kontuan, urte eta une berean ezin izan baita kontrol-talderik izan, ikasle guztiek irakaskuntza bera jasotzen baitute lehen lauhilekoan. Horregatik, elikadura-lehentasunen eta -ezinikusien aldaketak orientagarriak dira, eta ezin da esan unibertsitateko hezkuntza-esku-hartzeak bakarrik eragiten dituenik.

4. Ondorioak

Unibertsitatea hastean, ikasleek jaki osasungarriak nahi izaten dituzte, eta, gainera, abertsioak izaten dituzte plater kozinatu osasuntsuengatik. Hobespen horiek urrun daude gomendatutako dieta orekatu bati jarraitzetik. Unibertsitatean elikadurari buruzko oinarrizko kontzeptuak irakasteak, elikadura orekatua izateko, badirudi eragin onuragarria duela ikasleen elikadura-lehentasunetan. Horrela, elikagaien aldeko lehentasunak Diet Mediterraneoko piramidearekin bat etortzea lortu da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Heldu gaztearen etapan nutrizio-lehentasunak aldatzea oso garrantzitsua da osasun-egoera ezin hobeari eusteko, batez ere erizaintzako etorkizuneko profesionalen kasuan, horiek funtsezko zeregina baitute elikadura eta bizitza osasungarria sustatzeko. Etorkizunean beharrezkoak izango dira ikerketa gehiago elikadura-aldaketa horiek helduaroan mantentzen diren aztertzeko.

6. Erreferentziak

Antonopoulou, M., Mantzorou, M., Serdari, A., et al (2020): Evaluating Mediterranean diet adherence in university student populations: Does thispatter affect students´academic performance and mental health? *Int J Heallth Plann Mgmt*. 35:5-21.

Arnett, J.J. (2014): Emerging adulthood: The winding road from the late teens through the twenties. Oxford University Press. 88 p. [http://www.jeffreyarnett.com/Arnett new website/Articles/EAsecondedition.pdf]

Barrios-Vicedo, R., Navarrete-Muñoz, E.M., García de la Hera, M., González-Palacios, S., Valera-Gran, D., Checa-Sevilla, J.F, Gimenez-Monzo, D., Vioque, J. (2014): Una menor adherencia a la dieta Mediterránea se asocia a una peor salud auto-percibida en población universitaria [A lower adherence to Mediterranean diet is associated with a poorer self-rated health in university population]. *Nutr Hosp*. Sep 15;31(2):785-92. Spanish.

Beiter, R., Nash, R., McCrady, M., Rhoades, D., Linscomb, M., Clarahan, M., et al. (2015): The prevalence and correlates of depression, anxiety, and stress in a sample of college students. *J Affect Disord*. 173:90–6.

Boeykens K, Van Hecke A. (2018): Advanced practice nursing: Nutrition Nurse Specialist role and function. *Clin Nutr ESPEN*. Aug;26:72-76.

Brace, A. M., De Andrade, F. C., Finkelstein, B. (2018): Assessing the effectiveness of nutrition interventions implemented among US college students to promote healthy behaviors: A systematic review. *Nutr Health*. 24(3):171–81.

Castro, O., Bennie, J., Vergeer, I., Bosselut, G., Biddle, S.J.H. (2018): Correlates of sedentary behaviour in university students: A systematic review. *Prev Med (Baltim)*.

116(September):194–202.

Chim, H.Q., Oude Egbrink, M.G.A., Van Gerven, P.W.M., de Groot, R.H.M., Winkens, B., Savelberg, H.H.C.M. (2020): Academic schedule and day-to-day variations in sedentary behavior and physical activity of university students. *Int J Environ Res Public Health*. 17(8):1–16.

Cluskey, M., Grobe, D. (2009): College Weight Gain and Behavior Transitions: Male and Female Differences. *J Am Diet Assoc*. Feb 1;109(2):325–9. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002822308020385]

Coral S, Gómez C, López C, López B. (2015): *Manual de alimentación: planificación alimentaria*. Madrid. Ed. Universidad Nacional de Educación a Distancia.

Curilem Gatica C, Almagià Flores A, Rodríguez Rodríguez F, Yuing Farias T, Berral de la Rosa F, Martínez Salazar C, Jorquera Aguilera C, Bahamondes Ávila C, Soís Urra P, Cristi Montero C, Bruneau Chávez J, Pinto Aguilante J, Niedmann Brunet L. (2016): Evaluación de la composición corporal en niños y adolescentes: directrices y recomendaciones. *Nutr Hosp*. Jun 30;33(3):285. Spanish.

D'Alessandro, A., De Pergola, G. (2018): The Mediterranean Diet: its definition and evaluation of a priori dietary indexes in primary cardiovascular prevention. *Int J Food Sci Nutr.* Aug 18;69(6):647–59.

de Carvalho, C.A., Fonseca, P.C. de A., Barbosa, J.B., Machado, S.P., Dos Santos, A.M., Da Moura Silva, A.A. (2015): The association between cardiovascular risk factors and anthropometric obesity indicators in university students in São Luís in the state of Maranhão, Brazil. *Cienc e Saude Coletiva*. 20(2):479–90.

Duan, Y.P., Wienert, J., Hu, C., Si, G.Y., Lippke, S. (2017): Web-based intervention for physical activity and fruit and vegetable intake among Chinese university students: A randomized controlled trial. *J Med Internet Res*. 19(4):1–15.

El Ansari, W., Stock, C., Mikolajczyk. R.T. (2012): Relationships between food consumption and living arrangements among university students in four European countries - a cross-sectional study. *Nutrition Journal,* 11, p. 28

Galbete, C., Schwingshackl, L., Schwedhelm, C., Boeing, H., Schulze, M.B. (2018): Evaluating Mediterranean diet and risk of chronic disease in cohort studies: an umbrella review of meta-analyses. *Eur J Epidemiol*. 33(10):909–31.

Garcia-Meseguer, M.J., Burriel, F.C., Garcia, C.V., Serrano-Urrea, R. (2014): Adherence to Mediterranean diet in a Spanish university population. *Appetite*. 78:156-164.

Gianfredi, V., Nucci, D., Tonzani, A., Amodeo, R., Benvenuti, A.L., Villarini, M., Moretti, M. (2018): Sleep disorder, Mediterranean Diet and learning performance among nursing students: inSOMNIA, a cross-sectional study. *Ann Ig*. Nov-Dec;30(6):470-481.

Gormley N, Melby V. (2020): Nursing students' attitudes towards obese people, knowledge of obesity risk, and self-disclosure of own health behaviours: An exploratory survey. *Nurse Educ Today*. Jan;84:104232.

Hadjimbei, E., Botsaris, G., Gekas, V., Panayiotou, A.G. (2016): Adherence to the Mediterranean diet and lifestyle characteristics of university students in Cyprus: a cross-sectional survey. *Journal of nutrition and metabolism*. 2016:2742841

Hilger-Kolb, J., Diehl, K. (2019): 'Oh God, I Have to Eat Something, But Where Can I Get Something Quickly?'—A Qualitative Interview Study on Barriers to Healthy Eating among University Students in Germany. *Nutrients*. 11(10).

Kelly, N.R., Mazzeo, S.E., Bean, M.K. (2013): Systematic review of dietary interventions with college students: Directions for future research and practice. *J Nutr Educ Behav.* 45(4):304–13.

Lăcătușu, C.M., Grigorescu, E.D., Floria, M., Onofriescu, A., Mihai, B.M. (2019): The mediterranean diet: From an environment-driven food culture to an emerging medical prescription. Int J Environ Res Public Health.16(6).

Lipson, S.K., Sonneville, K.R. (2017): Eating disorder symptoms among undergraduate and graduate students at 12 U.S. colleges and universities. *Eat Behav*. 24:81–8.

Lupi, S., Bagordo, F., Stefanati, A., Grassi, T., Piccinni, L., Bergamini, M., et al. (2015): Assessment of lifestyle and eating habits among undergraduate students in northern Italy. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità,* 51, pp. 154-161

Macht, M. (2008): How emotions affect eating: A five-way model. *Appetite.* 50(1):1–11.

Martinez Alvarez, J.R., Garcia Alcon, R., Villarino Marin, A., Marrodan Serrano, M.D., Serrano, M.L. (2015): Eating habits and preferences among the student population of the Complutense University of Madrid. *Public health nutrition*. 18(14):2654-2659.

Odlaug, B.L., Lust, K., Wimmelmann, C.L., Chamberlain, S.R., Mortensen, E.L., Derbyshire, K., et al. (2015): Prevalence and correlates of being overweight or obese in college. *Psychiatry Res*. 227(1):58–64.

Ojeda-Brito, R., Brito-Ojeda, M., Ruano, C., Nissensonh, M., Ruiz-Caballero, J., Serra-Majem, L. (2015): Drinking habits in a sample of university students. Relationship between the adherence to the Mediterranean Diet and BMI. *Nutricion hospitalaria*. 32(Suppl 2):10326.

Pastor, R., Bibiloni, M.D.M., Tur Mari, J.A. (2017): Food consumption patterns among university students in Zamora. *Nutricion hospitalaria*. 34(5):1424-1431.

Plotnikoff, R.C., Costigan, S.A., Williams, R.L., Hutchesson, M.J., Kennedy, S.G., Robards, S.L., et al. (2015): Effectiveness of interventions targeting physical activity, nutrition and healthy weight for university and college students: A systematic review and meta-analysis. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 12(1):1–10.

Santos, S.J., Hurtado-Ortiz, M.T., Armendariz, M., Vantwist, V., Castillo, Y. (2016): Obesity-Related Dietary Patterns and Health Status of Diabetes Among At-Risk Latino College Students. [http://10.0.4.153/1538192716653504]

Shan, M-J., Zou, Y-F., Guo, P., Weng, J-X., Wang, Q-Q., Dai, Y-L., et al. (2019): *Systematic estimation of BMI. Medicine* (Baltimore). 98(21).

Singh, A.S., Mulder, C., Twisk, J.W.R., Van Mechelen, W., Chinapaw, M.J.M. (2008): Tracking of childhood overweight into adulthood: A systematic review of the literature. *Obes Rev.* 9(5):474–88.

Slane, J.D., Klump, K.L., McGue, M., Iacono, W.G. (2014): Developmental trajectories of disordered eating from early adolescence to young adulthood: A longitudinal study. *Int J Eat Disord*. 47(7):793–801.

Sogari, G., Velez-Argumedo, C., Gómez, M.I., Mora, C. (2018): College students and eating habits: A study using an ecological model for healthy behavior. *Nutrients*. 10(12):1–16.

US Department of Agriculture, Agricultural Research Ser- vice. Nutrient Data Laboratory. USDA National Food and Nutrient Database for Standard Dietary Studies, FNDDS 2017-2018. [https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/food-surveys-research-group/docs/fndds-download-databases/].

Vadeboncoeur, C., Townsend, N., Foster, C. (2015): A meta-analysis of weight gain in first year university students: Is freshman 15 a myth?. *BMC Obes*. 2(1):1–9.

Vella-Zarb, R.A., Elgar, F.J. (2009): The 'Freshman 5': A Meta-Analysis of Weight Gain in the Freshman Year of College. *J Am Coll Heal*. Sep 30;58(2):161–6.

Zurita-Ortega, F., San Roman-Mata, S., Chacon-Cuberos, R., Castro-Sanchez, M., Muros, J.J. (2018): Adherence to the Mediterranean diet is associated with physical activity, self-concept and sociodemographic factors in university student. *Nutrients.* 10(8).

Hipokanpoaren mendeko portaeren eta endokannabinoide sistemaren aldaketak loki-lobuluko epilepsiaren animalia-eredu batean

Anaut-Lusar, I.[1], Egaña-Huguet, J.[1,2] , Terradillos, I.[1,2], Soria-Gómez, E.[1,2,3] Lekunberri, L.[1,2], Gómez-Urquijo, S.M.[1,2], Serrano, M.[1,2], Bonilla-Del Río, I.[1,2], Mimenza, A.[1,2], Achicallende, S.[1,2], Puente, N.[1,2], Ramos-Uriarte, A.[1,2], Buceta, I.[1,2], Rico-Barrio, I.[1,2], Gerrikagoitia, I.[1,2], Elezgarai, I.[1,2], Grandes, P.[1,2]

[1]Neurozientziak Saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU), [2]Achucarro Basque Center for Neuroscience, UPV/EHUko Zientzia Parkea (UPV/EHU)
[3]Ikerbasque, Basque Foundation for Science
ianaut002@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Loki-lobuluko epilepsia (LLE) askotan epilepsiaren aurkako medikamentuekin trataezina den epilepsia partzial mota bat da. LLEn gehiegizko neurona-jarduera hipokanpoan gertatzen da, besteak beste. LLEdun pertsonek oroimen arazoak pairatzen dituztela deskribatu da. Bestalde, euren endokannabinoide (eKB) sisteman ere aldaketak gertatzen direla ikusi da, hala nola, CB_1 hartzailearen adierazpenaren murrizketa. eKB sistema, eta bereziki CB_1 hartzailea, oroimen-prozesuetan parte hartzen duela frogatu da. Horrez gain, CB_1 hartzaileek epilepsia-krisien larritasunean erantzukizun handia izan lezakete. Gure helburua, LLEren animalia-eredu batean portaera mailan nahiz maila zelularrean gertatzen diren aldaketak aztertzea da, CB_1 hartzailean arreta jarriz.

Hitz gakoak: Loki-lobuluko epilepsia, hipokanpoa, endokannabinoide sistema, oroimena.

Abstract

Temporal lobe epilepsy (TLE) is a type of partial epilepsy which is often resistant to anti-epileptic drugs. In TLE, unconventional neuronal activity takes place in the hippocampus, among other brain areas. TLE patients frequently show memory disorders. Moreover, they usually present alterations in the endocannabinoid (eCB) system, such as a reduction in the expression of the CB_1 receptor. It has been shown that the eCB system, and specially the CB_1 receptor, participates in memory processes. Furthermore, CB_1 receptors could be directly connected with the severity of the epileptic seizures. Our aim is to study the behavioural and the cellular changes that occur in an animal model of TLE, focusing on the CB_1 receptor.

Keywords: Temporal lobe epilepsy, hippocampus, endocannabinoid system, memory.

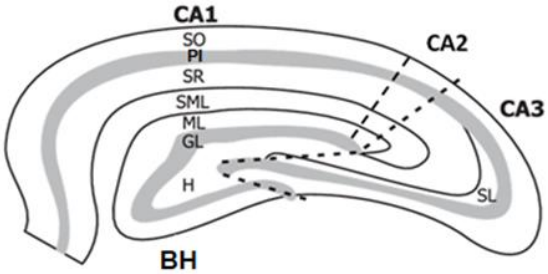
1. Sarrera eta motibazioa

Epilepsia adin guztietako pertsonei eragiten dien asaldura neurologiko kronikoa da. Munduko Osasun Erakundeak (MOE) estimatu du mundu osoan zehar 50 milioi pertsona inguruk pairatzen dutela gaitz hau. Krisi epileptiko errepikakorrak dira epilepsiaren bereizgarri, eta gutxienez bi epilepsia-krisi pairatu behar dira epilepsia bezala diagnostika dadin. Krisi epileptiko deritze garuneko neurona-jarduera gehiegizkoa eta sinkronikoa denean sortzen diren keinu edota sintoma iragankorrei (Fisher et al., 2014). Burmuineko eskualde desberdinetan gerta daiteke neuronen gehiegizko kitzikapena, loki-lobuluan edo bekoki-lobuluan, kasu. Lan honetan loki-lobuluko epilepsian (LLE) zentratuko gara. LLE epilepsia partzial mota bat da, maiz epilepsiaren aurkako farmakoekin trataezina dena. Alabaina, kirurgia egiten den epilepsia mota ohikoena da, kasuen %50-73 suposatzen baitu (Téllez-Zenteno eta Hernandez-Ronquillo, 2012). LLE gehienek anormaltasun epileptogenetikoak loki-lobuluaren erdialdean aurkezten dituzte, hau da, hipokanpoan, amigdalan eta hipokanpo alboko bihurgunean (Engel, 2001).

Ikerketa honetan hipokanpoan zentratuko gara. Izan ere, krisiekiko bereziki sentikorra den eremua da (Walker, 2015). Gizakietan eta karraskarietan kokapen desberdina duen arren, bietan lau eskualde

bereizten dira: *cornu ammonis* (CA) 1, CA2, CA3 eta bihurgune horzduna (BH) (Knierim, 2015) (1. irudia). Hipokanpoa oroimen jardueran parte hartzen duen garunaren eskualdea da (Walker, 2015). LLEdun pazienteek oroimen arazoak aurkeztu dituztela deskribatu da. Adibidez, Butler eta lankideek (2012) ikusi zuten epilepsiak eta hipokanpoaren kalte arinek epe luzera finkatzen den oroimenean eragina dutela.

1. irudia. Karraskarien hipokanpoaren egituraren irudikapena. Hipokanpoaren lau eskualdeak: CA1, CA2, CA3 eta bihurgune horzduna (BH). CA1aren geruzak: SO, stratum oriens; PI, neurona piramidalen geruza; SR, stratum radiatum; SML, lacunosum moleculare geruza. BHaren geruzak: ML, molekula-geruza; GL, pikor-geruza; H, hilusa. Jiang eta Swann-en (1997) lanetik eraldatua.



Epilepsiadun pertsonen endokannabinoide (eKB) sisteman ere aldaketak gertatzen direla ikusi da. eKB sistema nerbio-sistema zentralean (NSZ) zehar banatuta dagoen eta sinapsiaren transmisioaren modulazioan laguntzen duen seinaleztapen-sistema konplexua da. Bere jarduera oso espezifikoa eta lokalizatua da (Lutz et al., 2015). eKB sistema hurrengoez osatuta dago: 1 motako kannabinoide hartzailea (CB_1R) eta 2 motako kannabinoide hartzailea (CB_2R); horiek kitzikatzeko gai diren lipido endogenoak (eKB), horien artean ezagunenak: anandamida (AEA) eta 2-arakidonoilglizerola (2-AG); eta endokannabinoideen sintesi- eta degradazio-entzimak. Gantz-azido amidohidrolasa (FAAH) eta monoazil glizerol lipasa (MAGL) dira AEA eta 2-AG degradatzen dituzten entzimak, eta N-azilfosfatidiletanolamida-fosfolipasa D (NAPE-PLD) eta α diazilglizerol lipasa (DAGLα) entzimak dira horiek sintetizatzen dituztenak. Arestian esan bezala, sistema honek aldaketak pairatzen ditu epilepsiadun pertsonetan. Adibidez, ikusi da pertsona horien hipokanpoan murrizten direla 2-AGren sintesi entzima (DAGLα), CB_1 hartzailearen mRNA eta CB_1 hartzaileak bukaera kitzikatzaileetan duen immunoerreaktibotasuna (Ludanyi et al., 2008).

Epilepsia-krisietan zehar neuronek jasaten duten gehiegizko kitzikapenak askotan neurona horien funtzio galera edota zelula heriotza zitotoxikoa dakar (Walker, 2018). Aldi berean, neurona-heriotzak astrogliosi erreaktiboa eragiten du. Hau da, neuronak kaltetzen diren eskualdeetan, astrozitoen hipertrofia eta hiperplasia gertatzen da (Escartin et al., 2019). Astrozitoak funtzio estruktural, metaboliko eta homeostatiko anitzetan parte hartzen duten glia zelula mota bat dira. Astrozitoek ere CB_1 hartzaileak aurkezten dituzte eta horien bidez neuronen arteko sinapsian modu aktiboan parte hartzen dute, sinapsi tripartitoa deritzon mekanismoaren bitartez (Perea et al., 2009; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018). Coiret eta lankideek (2012) ikusi dute astrozitoen CB_1 hartzaileen aktibazioak neurona kitzikatzaileen erantzuna emendatzen duela, epilepsia-krisiak denbora luzeagoan zehar mantentzen direlarik. Haatik, oraindik ez dago oso argi astrozitoek epilepsian duten erantzukizuna.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Arestian esan den moduan, epilepsian gertatzen den gehiegizko neurona-jarduerak zelula heriotza zitotoxikoa eragin dezake. eKB sistemak gehiegizko kitzikapen neuronal hori saihestu lezake. Izan ere, azido kainikoaren (KA) animalia-eredu batean ikusi da eKBek babes funtzioa betetzen dutela: hipokanpoko CB_1R aurresinaptikoa aktibatzen dute glutamatoaren gehiegizko askapena inhibitzeko eta, horrela, horrek dakarren heriotza zitotoxikoa ekiditeko (Monory et al., 2006). Are gehiago, beste animalia-eredu batean ikusi da bektore biralen bidez CB_1 hartzailearen adierazpen mailak areagotuz, KAk hipokanpoan eragindako konbultsioen larritasuna eta zelulen heriotza murrizten direla

(Guggenhuber et al., 2010). Beraz, CB_1 hartzaileek krisi epileptikoak kontrolatu eta neuronak ondorengo heriotzatik babes litzakete.

Babes funtzioa ez ezik, hainbat ikerketek erakutsi dute eKB sistemak ikaskuntza- eta oroimen-prozesuetan parte hartzen duela. Esaterako, alzheimer gaixotasunaren animalia-ereduekin egindako ikerketa batean ikusi da CB_1 hartzailea adierazten ez duten saguek ikasketa- eta oroimen-urritasunak dituztela (Stumm et al., 2013). Gainera, ikusi da kannabisarekiko esposizio akutua zein kronikoa ezagutza-urritasunekin lotuta daudela animalietan, eta gizakietan, batez ere arretarekin, lan-oroimenarekin, ikaskuntza berbalarekin eta oroimen funtzioekin (Puighermanal et al., 2012). Horrez gain, zenbait ikerketek frogatu dute astrozito-seinalizazioak oroimen-prozesuetan parte hartzen duela. Adibidez, astrozitoen CB_1 hartzaileen delezioak identifikazio-oroimena kaltetzen duela ikusi da (Santello et al., 2019). Bestalde, frogatu da marihuanak eragiten duen lan-oroimenaren galera astrogliako CB_1 hartzailearen aktibazioaren ondorioz gertatzen dela (Han et al., 2012). Hala ere, eKB sistemak ezagutzan duen eginkizun fisiologikoa ez dago oso argi oraindik. Izan ere, sistema neuromodulatzailea denez, ezagutzan parte hartzen duten garuneko eremuetan jarduera espezifiko eta lokalizatua izango du eta, beraz, mekanismo desberdinak aurkeztuko ditu.

Ikerketa honen helburua, alde batetik, loki lobuluko epilepsiaren animalia-eredu batean hipokanpoaren mendekoak diren portaeren aldaketak aztertzea da. Horrela, oroimenean eta habia egiteko gaitasunean dituen eraginak neurtuko dira. Beste alde batetik, maila zelularrean gertatzen diren aldaketak aztertuko dira, CB_1 hartzailearen adierazpenean arreta jarriz.

3. Ikerketaren muina

Azterlan honen helburuak gauzatzeko 8 asteko 27 C57BL/6j sagu ar heldu erabili ziren. Krisi exzitotoxikoen azido kainikoaren (KA) eredua erabili zen LLE ikertzeko. Kainatoa AMPA eta KAren glutamato hartzaileen agonista da eta kitzikapenaren eta inhibizioaren arteko desoreka eragiten du (Nirwan et al., 2018). KAk animalietan eragindako konbultsioek giza LLEren ezaugarrien antzekoak diren neurona galera, astrogliosia eta hipokanpo esklerosia eragiten dituzte (Nirwan et al., 2018).

Saguak, ausaz, bi taldetan bereizi ziren: kontrol taldea eta KAren taldea. Kontrol taldeari, soluzio fisiologikoa injektatu zitzaion. KAren taldeari, ordea, azido kainikoa (25mg/kg) gatz-soluzioan diluituta eman zitzaion. KA jaso zuten animaliek intentsitate-maila desberdineko krisiak pairatu zituztenez, eta laborategiko aurretiko beste ikerketa batzuetako esperientzian oinarrituz, animalia horiek bi taldetan banatu ziren: Racineren eskalan 3tik beherako krisiak izan zituztenak (RE < 3) eta 3tik gorakoak izan zituztenak (RE > 3) (1. taula). Beraz, esperimentuak 3 animalia talderekin burutu ziren: kontrolak (N = 10), RE < 3 kainatoak (N = 7) eta RE > 3 kainatoak (N = 10).

1. taula. Krisi epileptikoen intentsitate-maila neurtzeko erabilitako Racineren eskala (RE).

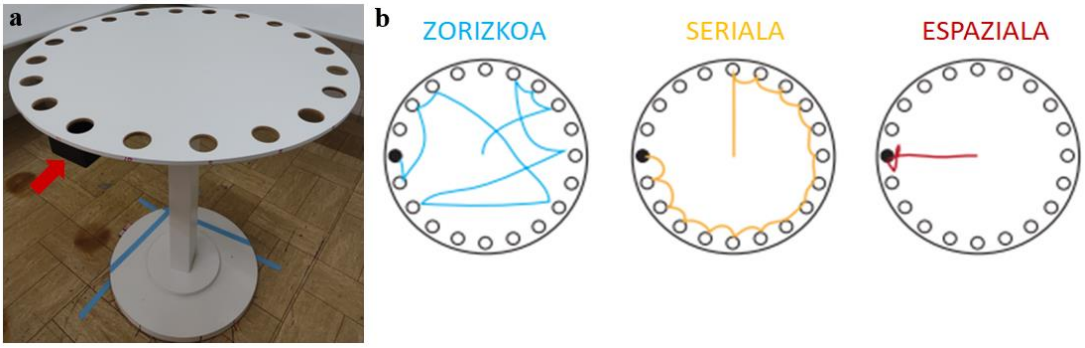
Intentsitate-maila	Sintomak
1	Mugiezintasuna eta begirada finko mantentzea
2	Buztanaren tentetzea eta aurreko gorputz-adarren klonusa
3	Altxatzea eta mugimendu errepikakorrak erakustea
4	Altxatzea eta erortzea
5	Etengabe altxatzea eta erortzea
6	Krisi tonikoklonikoak gorputz-jarrera galerarekin, korrika basatia eta saltoak ematea
7	Heriotza

3.1. Barnesen labirintoa: oroimen- eta estrategia- espazialaren testa (BL)

Barnesen labirintoa (BL) saguen oroimen espaziala aztertzeko ingurune lehorreko portaera-proba da (Bach et al., 1995) (2a. irudia). Oroimen mota hori hipokanpoaren mendekoa da. Saguek ihes-kutxa finko baten eta inguruan kokaturiko ikusmen-seinaleen arteko lotura ikasten dute. Sagu bakoitzarekin egunero 4 proba egin ziren 5 egunetan zehar. Saguek ihes-kutxa aurkitzeko hiru bilaketa-estrategia

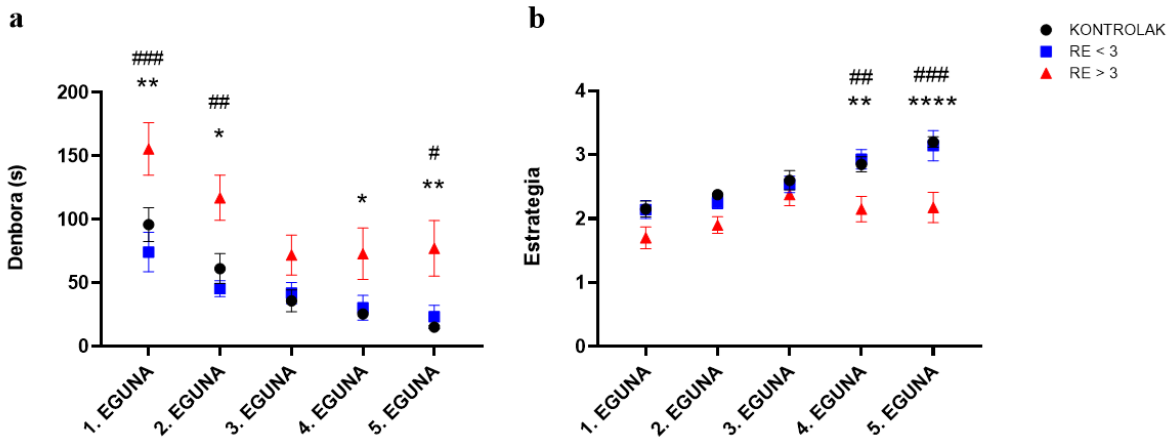
sekuentzia erabili ohi dituzte: zorizkoa, seriala eta espaziala (2b. irudia). Ihes-kutxa aurkitu ezean, aintzat hartzen da saguek ez dutela bilaketa-estrategiarik erabili (estrategiarik gabe). Proba bakoitzean, kutxan sartzeko beharrezkoa izan zitzaien denbora eta erabilitako estrategia neurtu ziren.

2. irudia. Barnesen labirintoa: a) BLren egitura eta ihes-kutxaren kokapenaren adibide bat (gezi gorria); eta b) saguek erabili ohi dituzten bilaketa-estrategiak.



BL proban sagu taldeen artean desberdintasun adierazgarriak ikusi ziren. Alde batetik, RE > 3 kainatoek kontrolek eta RE < 3 kainatoek baino denbora gehiago behar izan zuten ihes-kutxa aurkitzeko (3a. irudia). Beste alde batetik, krisi epileptiko larriak izan zituzten saguek ez zuten bilaketa-estrategiarik garatu, oro har ihes-kutxa zoriz aurkitzen baitzuten (3b. irudia). Gainera, bi grafikoetan ikus daitekeen moduan, 3. egunetik aurrera RE > 3 saguek ez zuten hobera egin. Guzti horrek aditzera ematen du krisi larriak jasan zituzten saguek oroimen espaziala kaltetuta dutela.

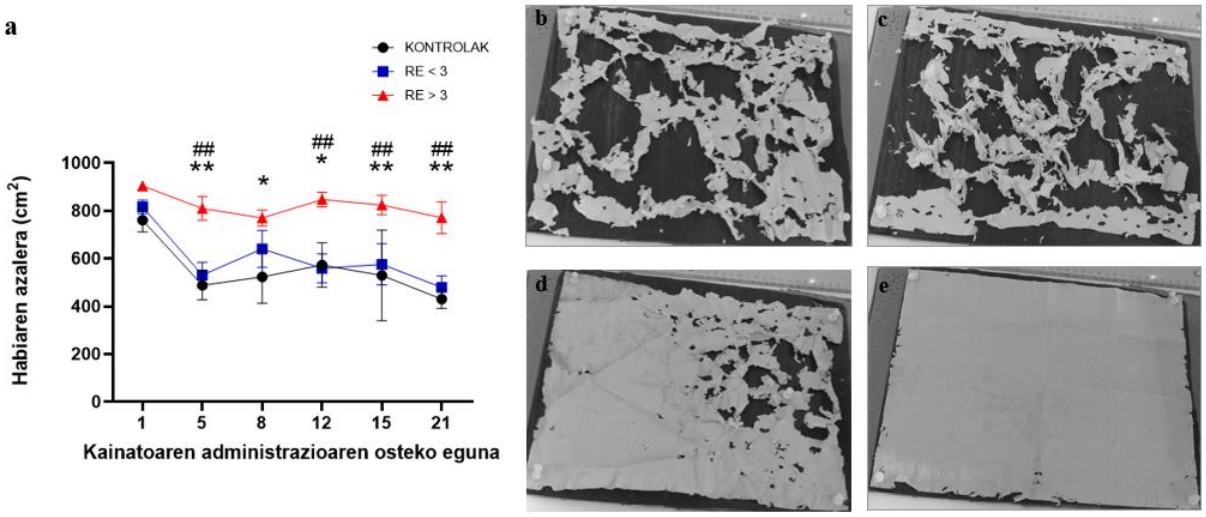
3. irudia. a) Egun bakoitzean ihes-kutxa aurkitzeko behar izandako denbora eta b) egun bakoitzean erabilitako bilaketa-estrategia: 1) estrategiarik gabe, 2) zorizkoa, 3) seriala eta 4) espaziala. Bi bideko Anova testa. * RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa kontrol taldearekin konparatuz (*p<0.05, **p<0.01,****p<0.0001). # RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa RE < 3 taldearekin alderatuz (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001).



3.2. Habia egiteko gaitasuna

Habien eraikuntza hipokanpoaren mendekoa da; izan ere, ikusi da hipokanpoko kalteak habia egiteko gaitasuna murrizten duela saguetan (Jirkof, 2014). Habien eraikuntzarako erabilitako paperezko zapien azaleran ezberdintasun nabarmenak behatu ziren sagu taldeen artean (4a. irudia). Grafikoan zein irudietan ikus daitekeen bezala, RE > 3 kainatoek paperezko zapia nekez eraldatzen zuten habia eraikitzeko (4. irudia). Bestalde, egunak pasa ahala ez zuten habia egiteko gaitasuna berreskuratu. Beraz, emaitzek iradokitzen dute krisi epileptiko larriek hipokanpoaren mendekoa den gaitasun hau kaltetu dutela.

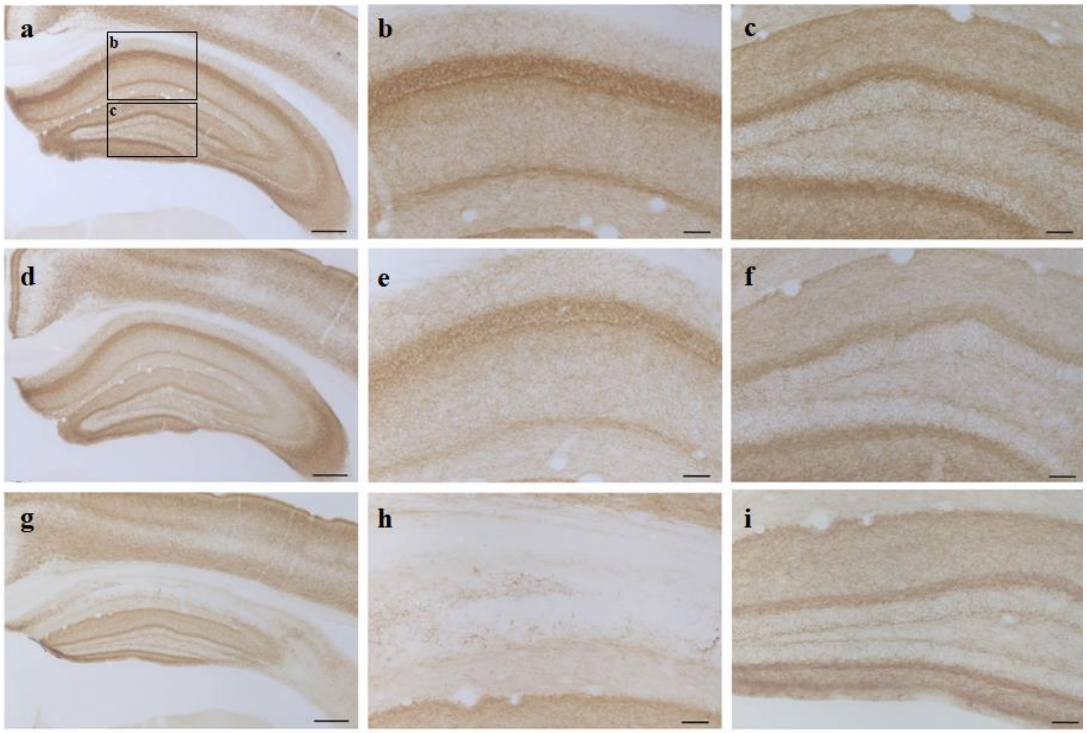
4. irudia. a) Habiaren azaleraren neurketa kainatoaren injekziotik egun batera, 5, 8, 12, 15 eta 21 egunetara. Bi bideko Anova testa. * RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa kontrol taldearekin konparatuz (*p<0.05, **p<0.01). # RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa RE < 3 taldearekin alderatuz (#p<0.05, ##p<0.01). b-e) Animalia desberdinen habien adibideak KAren administraziotik 12 egunetara: b) kontrola, c) RE < 3 kainatoa eta d) eta e) RE > 3 kainatoak.



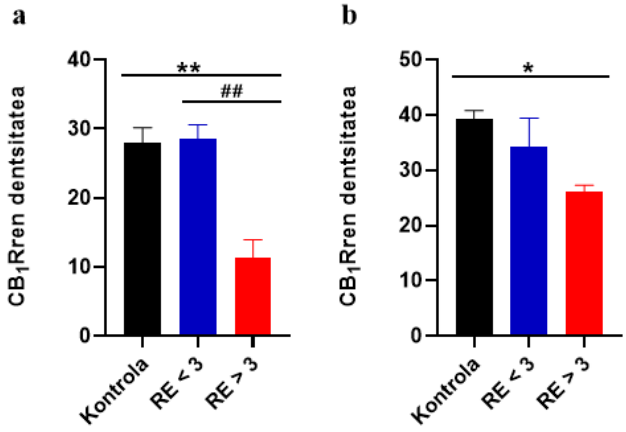
3.3. CB_1 hartzailearen adierazpenaren azterketa

Azido kainikoaren administrazioaren egunetik 30 egunetara saguen hipokanpoa maila zelularrean aztertu zen teknika immunohistokimikoen bidez. Lehenik eta behin, CB_1 hartzailearen adierazpena mikroskopio optikoaren bidez analizatu zen. 5. irudian ikus daitekeen bezala, RE > 3 kainatoek CB_1 gutxiago adierazten dute hipokanpoan. Are gehiago, hartzailearen dentsitate optikoa modu esangarrian murriztuta dago CA1 eremuan eta bihurgune horzdunean (6a. eta 6b. irudiak hurrenez hurren).

5. irudia. CB_1 hartzailearen immunotindaketa sagu talde desberdinen hipokanpoan: a-c kontrola (gatz-seruma), d-f RE < 3 kainatoa eta g-i RE > 3 kainatoa. a, d, g: CB_1Rren immunotindaketa hipokanpo osoan. b, e, h: immunotindaketa CA1 eskualdean. c, f, i: immunotindaketa bihurgune horzdunean. Eskala barrak: 1000 µm a, d eta g-n; 200 µm gainerakoetan.

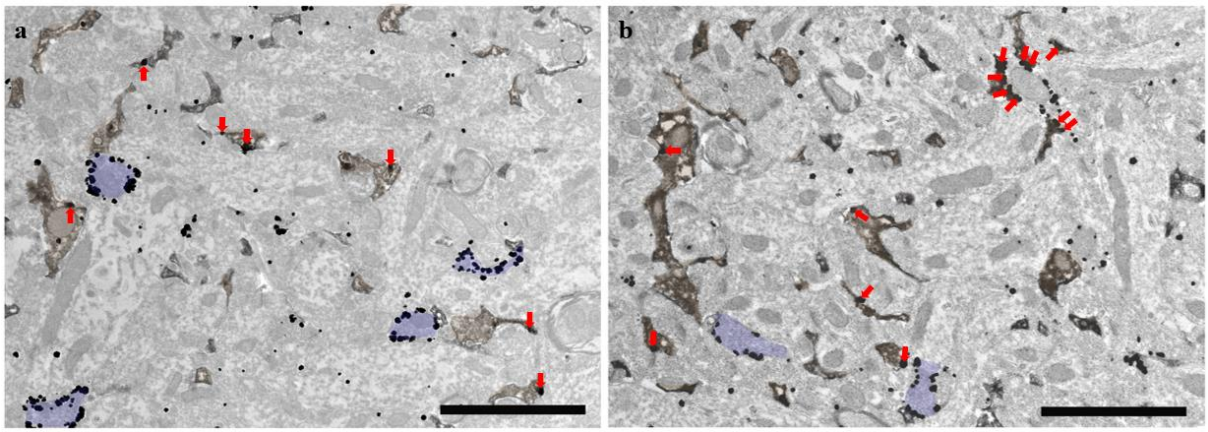


6. irudia. CB_1 hartzailearen dentsitate optikoaren neurketa: a) CB_1R dentsitatea 26 μm^2-ko, CA1 eskualdean eta b) CB_1R dentsitatea 12,5 μm^2-ko, bihurgune horzdunean (BH). Kruskal-Wallis testa. * RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa kontrol taldearekin konparatuz (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) . # RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa RE < 3 taldearekin alderatuz; (## $p < 0,01$).



Epilepsiadun saguen hipokanpoan maila zelularrean gertatutako aldaketak ikusirik, laginak mikroskopio elektronikoaren bidez aztertu ziren ondoren, erretxinan murgildu-aurreko urre eta peroxidasa bidezko immunomarkaketa konbinatua aplikatuta (Puente et al., 2019). Bertan CB_1 hartzaileen konpartimentu arteko aldaketa behatu dugu. Izan ere, CB_1 hartzailerako positiboak diren bukaera inhibitzaile gutxiago eta daudenak hartzaile dentsitate gutxiagorekin ageri dira. Aldi berean, astrozitoek CB_1 hartzaile gehiago adierazten dituzte. Horrez gain, krisi epileptiko larriak jasan dituzten saguek astrozitoen hipertrofia eta hiperplasia erakusten dituzte, proiekzio gutxiago eta lodiagoak baitituzte (7a. eta 7b. irudiak).

7. irudia. CB_1 hartzailearen kokapena bukaera inhibitzaileetan (urdinez) eta astrozitoetan (marroiez). a) Kontrola. b) RE > 3 kainatoa. Gezi gorriak: astrozitoen CB_1 hartzaileak. Eskala barrak: 2 µm.



4. Ondorioak

Erabilitako LLEren animalia-ereduaren hipokanpoan eta hipokanpoaren mendekoak diren portaeretan gertatutako aldaketak ikusita hainbat ondorio atera ditzakegu. Alde batetik, esperotakoaren aurka, RE < 3 kainatoek kontrolen antzeko portaerak eta antolaketa zelularra erakusten dituzte. Horrek aditzera ematen du indibiduoen artean desberdintasunak egon litezkeela eta sagu batzuk KArekiko sentikortasun handiagoa izatea Bestalde, gerta liteke KA sisteman barrena modu desberdinean zabaltzea, RE < 3 saguen garunera KA kantitate gutxiago iritsiko zelarik. Haatik, oraindik ezezaguna zaigu zergatik KAren dosi berak larritasun ezberdineko krisi epileptikoak eragin ditzakeen.

Beste alde batetik, krisi epileptiko larriek bai oroimen-espazialean bai eta habia egiteko gaitasunean ere kalte nabarmenak eragiten ditu. Gainera, RE > 3 saguek CB_1 hartzailearen adierazpen askoz txikiagoa erakusten dute, batez ere CA1 eskualdean. Horrez gain, bihurgune horzdunean CB_1 hartzailearen kokapen aldaketa gertatzen da, astrozitoen CB_1 hartzaileen adierazpena emendatzen delarik eta bukaera inhibitzaileena murrizten delarik. Azkenik, epilepsia-krisi larriek astrozitoen morfologian ere aldaketak eragiten dituzte.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerlan honetan behatutako emaitzek aditzera ematen dute eKB sistema, eta bereziki CB_1 hartzaileak, epilepsiadun saguek erakutsitako memoria-urritasunarekin lotuta daudela. Gainera, baliteke CB_1 hartzailearen adierazpenaren murriztapena krisi epileptikoen larritasunaren erantzuleak izatea. Etorkizunari begira, LLE astrozitoetan CB_1 hartzailerik adierazten ez duten animalietan (GFAP CB_1-KO animalietan) ikertuko da. Horrela, astrozitoetako CB_1 hartzaileek epilepsian duten eragina ezagutu ahalko dugu. Bestalde, ikerketa honetan erabilitako animalia-ereduan azterketa elektrofisiologikoak burutuko dira, alde batetik, neuronen kitzikagarritasuna eta plastikotasuna ikertzeko; eta beste alde batetik, eKB sisteman eragiten duten farmako ezberdinen efektuak aztertzeko, epilepsia-krisien larritasuna arintzeko asmoz.

6. Erreferentziak

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

Butler, C., Kapur, N., Zeman, A., Weller, R., eta Connelly, A. (2012). Epilepsy-related long-term amnesia: anatomical perspectives. *Neuropsychologia*, 50 (13), 2973-2980.

Coiret, G., Ster, J., Grewe, B., Wendling, F., Helmchen, F., Gerber, U., eta Benquet, P. (2012). Neuron to astrocyte communication via cannabinoid receptors is necessary for sustained epileptiform activity in rat hippocampus. *PLoS One*, 7 (5).

Engel Jr, J. (2001). Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned?. *The neuroscientist*, 7 (4), 340- 352.

Escartin, C., Guillemaud, O., eta Carrillo-de Sauvage, M. A. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia*, 67(12), 2221-2247.

Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., ... eta Hesdorffer, D. C. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55 (4), 475-482.

Guggenhuber, S., Monory, K., Lutz, B., eta Klugmann, M. (2010). AAV vector-mediated overexpression of CB1 cannabinoid receptor in pyramidal neurons of the hippocampus protects against seizure-induced excitoxicity. *PloS one*, 5 (12).

Gutiérrez-Rodríguez, A., Bonilla-Del Río, I., Puente, N., Gómez-Urquijo, S. M., Fontaine, C. J., Egaña-Huguet, J., ... eta Soria-Gómez, E. (2018). Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus. *Glia*, 66 (7), 1417-1431.

Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Xu, L., Georges, F., ... eta Liu, Q. (2012). Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*, 148 (5), 1039-1050.

Jiang, M., eta Swann, J. W. (1997). Expression of calretinin in diverse neuronal populations during development of rat hippocampus. Neuroscience, 81 (4), 1137-1154.

Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of neuroscience methods*, 234, 139-146.

Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25 (23), R1116-R1121.

Ludányi, A., Erőss, L., Czirják, S., Vajda, J., Halász, P., Watanabe, M., ... eta Katona, I. (2008). Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 28 (12), 2976-2990.

Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R., eta Hillard, C. J. (2015). The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nature Reviews Neuroscience*, 16 (12), 705-718.

Monory, K., Massa, F., Egertová, M., Eder, M., Blaudzun, H., Westenbroek, R., ... eta Long, J. (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*, 51 (4), 455-466.

Nirwan, N., Vyas, P., eta Vohora, D. (2018). Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Reviews in the Neurosciences*, 29 (7), 757-770.

Perea, G., Navarrete, M., eta Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences*, 32 (8), 421-431.

Puente, N., Bonilla-Del Río, I., Achicallende, S., Nahirney, P. C., eta Grandes, P. (2019). High-resolution immunoelectron microscopy techniques for revealing distinct subcellular type 1 cannabinoid receptor domains in brain. *Bio-protocol*, 9(2), e3145-e3145.

Puighermanal, E., Busquets-Garcia, A., Maldonado, R., eta Ozaita, A. (2012). Cellular and intracellular mechanisms involved in the cognitive impairment of cannabinoids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367 (1607), 3254-3263.

Santello, M., Toni, N., eta Volterra, A. (2019). Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nature neuroscience*, 22 (2), 154-166.

Stumm, C., Hiebel, C., Hanstein, R., Purrio, M., Nagel, H., Conrad, A., ... eta Clement, A. B. (2013). Cannabinoid receptor 1 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease leads to enhanced cognitive impairment despite of a reduction in amyloid deposition. *Neurobiology of aging*, 34 (11), 2574-2584.

Téllez-Zenteno, J. F., eta Hernández-Ronquillo, L. (2012). A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research and treatment*, 2012.

Walker, M. C. (2015). Hippocampal sclerosis: causes and prevention. *Seminars in neurology* (Vol. 35, No. 03, pp. 193-200). Thieme Medical Publishers.

Walker, M. C. (2018). Pathophysiology of status epilepticus. *Neuroscience letters*, 667, 84-91.

World Health Organization. (2019). Epilepsy: a public health imperative: summary (No. WHO/MSD/MER/19.2). World Health Organization.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan honek hainbat erakunderen diru laguntza izan du: Eusko Jaurlaritza (IT1230-19 eta Europar Batasunaren Europako Eskualde Garapenerako Funtsa (ERDF-EU; RD16/0017/0012); MINECO/FEDER, UE (SAF2015-65034-R); Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-107548RB-I00); JEH doktorearen kontratua (PIC 280/20), eta IBDR doktorearena (BES-2016-076766); ESG doktoreak Ikerbasque eta MINECO funtsa (MICIU/AEI/FEDER-EU; PGC2018-093990-A-I00); MS, LL, IT eta SA-ren Euskal Herriko Unibertsitateko doktoratu aurreko ikertzaileen kontratuak (PIF 19/164; PIF 18/315; PIF 17/292 eta PIF 16/251) eta AM-ren Eusko Jaurlaritzako doktoratu aurreko ikertzaile kontratua

Nerabezaroko gehiegizko alkohol kontsumoaren kalte iraunkorrak C57BL/6J sagu eme helduetan

Lekunberri, L.[1,2], Serrano, M.[1,2], Soria-Gomez, E.[1,2,3], Bonilla-Del Río, I.[1,2], Anaut-Lusar, I.[1], Mimenza, A.[1,2], Achicallende, S.[1,2], Egaña-Huguet, J.[1,2], Ramos-Uriarte, A.[1,2], Terradillos, I.[1,2], Gerrikagoitia, I.[1,2], Elezgarai, I.[1,2], Puente, N.[1,2], Rico-Barrio, I.[1,2], Grandes, P.[1,2]

[1]Neurozientziak Saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU
[2]Achucarro Basque Center for Neuroscience, UPV/EHUko Zientzia Parkea (UPV/EHU)
[3]KERBASQUE, Basque Foundation for Science
leire.lecumberri@ehu.eus

Laburpena

Betekadan oinarritutako alkohol kontsumoa da gehien ematen dena nerabeen artean. Kontsumo mota honek epe motzeko zein luzeko kalteak dakartza, nerabezaroan garunak garapen prozesu konplexua pairatzen baitu. Ondorioz, epe luzeko narriadura kognitiboa, CB1 hartzaile zelularraren galera eta honen menpeko epe luzeko plastikotasunaren asaldura ematen dira ar helduetan egindako ikerketen arabera. Ikerketa batzuen arabera emakumeak zaurgarriagoak diren arren alkoholaren kalteen aurrean, oraindik argitzeke dago epe luzera zehazki zein ondorio dituen nerabezaroko gehiegizko alkohol kontsumoak.

Hitz gakoak: alkohol-kontsumoa, emeak, sistema endokannabinoidea

Abstract

Binge drinking is the most common pattern of excessive alcohol consumption among adolescents. This habit causes short- and long-term damage as the brain goes through a complex developmental process during adolescence. Consequently, adolescence binge-drinking causes long-term cognitive disruption, as well as cannabinoid CB1 receptor density and CB1 receptor-mediated long-term plasticity loss in adult male mice. Although several studies have demonstrated females might be more vulnerable to alcohol, the long lasting effects of adolescence binge drinking in adult females, however, remain unknown.

Keywords: alcohol-consumption, females, endocannabinoid system

1. Sarrera eta motibazioa

Mundu mailan alkohol kontsumoa osasun arloko arrisku faktore garrantzitsuenetako bat da, gaixotasun larriekin erlazionaturik baitago. Alkohola gehien kontsumitzen den droga izateaz gain, beste substantzia psikoaktibo batzuen kontsumoarekin erlazionatzen da (Word Health Organization, 2018). Gure kulturan oso erroturik dagoen ohitura da alkohola ekitaldietan, ospakizunetan zein egunerokotasunean edatea eta ondorioz, drogen arriskuen pertzepzioaren eskalan, beheren agertzen dena da (Euskadi eta drogak, 2012). Nerabeen artean, botiloia edo betekadan oinarritutako kontsumoa hedatuen dagoen alkohol kontsumo patroia da. Eredu hau bi ordutan 4 edari edo gehiago, nesken kasuan eta 5 edari edo gehiago, mutilen kasuan edatean datza (Peñasco et al., 2020). Asteburuetan talde sozialetan batzen dira nerabeak eta irtenaldi bakoitzeko helduek baino 2-3 aldiz gehiago edaten dute (Crews et al., 2016).

Alkoholak kaltetzen dituen organoen artean garuna da itu zaurgarrienetako bat, honen egitura eta funtzioak asaldatu baititzake (Alfonso-Loeches eta Guerri, 2011). Nerabezaroan zehar burmuinak garapen prozesu konplexua jasaten du, trebetasun sozialak eta arrazoitze ahalmena garatuz, besteak beste. Ez da harritzekoa, hortaz, nerabezaroa aro oso kritikoa izatea drogen kontsumoari dagokionez. Izan ere, betekadan oinarritutako alkohol kontsumoak epe luzera mantentzen diren ondorio kaltegarriak eragin ditzake garunean, transmisio sinaptikoa eta neuroplastikotasuna asaldatuz, narriadura kognitiboa eta arazo emozionalak ekarriz eta helduaroan menpekotasun arazoak jasateko arriskua areagotuz (Peñasco et al., 2020).

Sistema kannabinoide endogenoa (SKE) ugaztunen seinalizazio sistema konplexu bat da, homeostasi funtzioa betetzen duena orokorrean eta alkoholaren kontsumoaren erregulazioan oso

garrantzitsua da. SKE hartzaile zelularrez, hauen ligandoez eta ligandoak sortu eta degradatzen dituzten entzimez osaturik dago. Bi hartzaile nagusi ditu: CB1 eta CB2, lehenengoa burmuineko hartzaile ugariena delarik. Hartzaile hauetara 2-AG eta AEA endokannabinoideak lotzen dira, seinalizazioa eman dadin. Sistema endokannabinoidea alkoholak nerbio-sistema zentralean dituen eraginen partaide dela frogatu da, bai maila zelular eta molekularretan baita portaera mailan ere (Naassila et al., 2003). Etanol esposizioak kannabinoide endogenoen emendioa bultzatzen du; honek CB1 hartzailearen gehiegizko estimulazioa eta ondoriozko saturazioa eragiten ditu, azkenik hartzaile hauen kontzentrazio eta funtzioaren murrizpena behatzen delarik (Ortiz et al., 2003; Naassila et al., 2003).

Alkoholismoa pairatzen duten helduetan oso karakteristikoa da espazio-memoriaren eta ikas-ahalmenaren galera. Izan ere, neuroirudi teknikei esker galera kognitibo hauen paraleloak diren anomalia estruktural, kimiko eta funtzionalak identifikatu ahal izan dira (Pfefferbaum et al., 2001a). Gainera, literaturaren arabera emakumeak garuneko kalte hauen aurrean zaurgarriagoak direla dirudi (Hommer et al., 1996, 2001; Jacobson, 1986), beste ikerketa batzuetan kontrakoa gertatzen dela aditzera ematen duten bitartean (Pfefferbaum et al., 2001b). Alkohol-kontsumo arazoak dituzten nerabeetan burututako ikerketetan genero desberdintasunak behatu dira aurreko bekokiaren bolumenari dagokionez, nesketan aberrazio funtzional okerragoak behatuz. Ildo beretik, generoarekiko espezifikoak diren neurogarapen patroiak identifikatu dira; adibidez, neska nerabeetan gai gris kortikalaren garapena goizago ematen da mutiletan baino, baita lan-memoriarekin erlazionatuta dagoen bekoki-paretaren eremua ere. Alkoholak neska eta mutil nerabeetan eragiten dituen kalteak desberdinak izatearen gakoa, nerabezaroko garunaren garapen kronologikoak generoen artean erakusten dituen desberdintasunen atzean egon daiteke, hain zuzen ere (Squeglia et al., 2011).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Betekadan oinarritutako alkohol kontsumoaren prebalentzia oso altua da nerabeen artean. Munduko Osasun Erakundearen (MOE) arabera, nerabezaroan eta helduaro goiztiarrean prebalentzia hau %45-55ekoa da Europako Mediterraneo aldean. MOEaren arabera, 2025 urterako 15 urtetik aurrerako alkohol edaleen kopurua %50a haziko da. Aldi berean, 2016an alkohol kontsumoak 3 milioi heriotza eragin zituela iragarri zuen, heriotza guztien %5,3a, beste gaixotasun batzuk baino askozaz eragin larriagoa duelarik hilkortasunean: tuberkulosia (%2,3), HIESa (%1,8), diabetesa (%2,8), hipertentsioa (%1,6), gaixotasun digestiboak (%4,5), biolentiza (%0,8) eta trafiko istripuak (%2,5). Alkohol kontsumoa gaixotasun larriekin erlazionatzen da, minbizia, diabetesa, alkohol-kontsumoaren desordenak, alkohol-sindrome fetala, epilepsia, gaixotasun neuropsikiatrikoak, gaixotasun kardiobaskularrak, digestiboak eta lesio edo traumatismo larriak, besteak beste. Hori gutxi balitz, alkoholaren ondoriozko lesio eta traumatismo hauek eragiten dituzten heriotzak emendatu egiten dira nerabezaroan, heriotza goiztiarren %7,2aren erantzule direlarik (World Health Organization, 2018).

Nerabezaroko alkohol kontsumo intentsiboak kalte iraunkorrak eragiten dituela frogatu da garunean. Sagu arretan burututako ikerketetan, nerabezaroan botiloi protokoloa ezarri zaiena 4 astetan zehar, narriadura kognitibo iraunkorra behatu da helduaro goiztiarrean (Rico-Barrio et al., 2019). Gainera, CB1 hartzailearen kontzentrazioaren murrizpena behatu da hipokanpoan, non memoria bezalako funtzio kognitiboak mamitzen diren (Eichenbaum et al., 1994). Halaber, eremu berean CB1 hartzailearen menpekoa den iraupen luzeko depresioa, hau da, plastikotasuna galtzen dute (Peñasco et al., 2020).

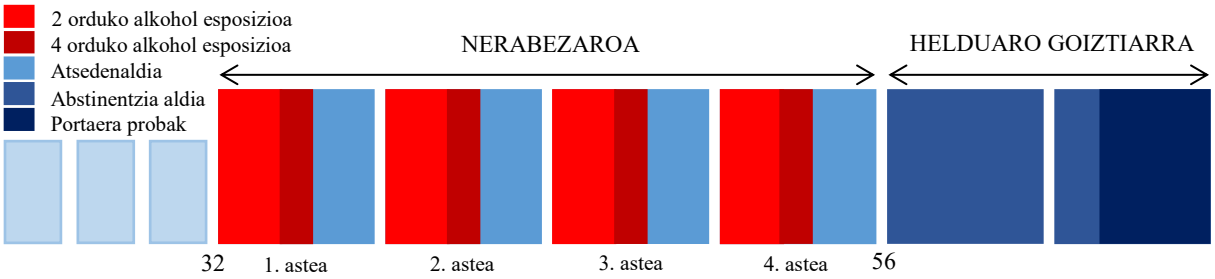
Generoaren arabera azaltzen diren desberdintasunak ikusirik batez ere nerabezaroan, arretan ondo deskribatuta dagoen arren, nabaria da emeetan argitzeke dauden nerabezaroko botiloiaren epe luzeko eraginak ikertzeko beharra. Hori da, preseski, ikerketa honen xedea.

3. Ikerketaren muina

Ikerketaren bermea nerabezaroko alkohol kontsumo intentsiboak epe luzera dituen ondorioak emeetan aztertzea izanik, C57BL6J sagu eme nerabeetan (jaio ondorengo 32-56 egunak) botiloi eredua

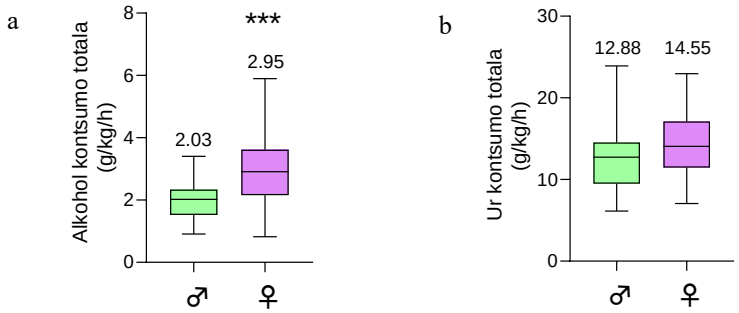
ezarri zen (1. irudia). Ilunpeko alkohol kontsumoa deritzo eta nerabezaroko lau asteetan zehar, astean lau egunetan %20an alkohola, alkohol taldeak edo ura, kontrol taldeak edatean datza; asteko lehen hiru egunetan 2 orduz eta laugarrenean 4 orduz. Asteko gainontzeko egunetan atsedena hartzen dute (1. irudia) (Rhodes et al., 2007).

1. irudia. Diseinu esperimentalaren eskema; nerabezaroko 4 astetako alkohol protokoloa (jaio ondorengo 32-56 egunak), atsedenaldia/abstinentzia fasea eta portaera probak.



Botiloi protokoloa borondatezko alkohol (edo ur) kontsumoan datzanez, alkohol esposizioa bukatzean edandako kantitatea neurtzen da, alde batetik alkohol kontsumoa ematen dela ziurtatzeko eta bestetik, aurrerago batzen diren emaitzen datuekin konparatu ahal izateko. Era horretan, bataz besteko alkohol kontsumo totala kalkulatzen da (g/kg/h). Ikerketan zehar batutako emaitzak arren emaitzekin konparatu ziren. Eme nerabeek arrek baino askoz alkohol gehiago kontsumitzen dutela behatu da (2a. irudia), nahiz eta ur kantitate bera edaten duten (2b. irudia).

2. irudia. Ikerketako botiloi protokoloan zehar sagu eme (n=48) eta arrek (n=32) edandako a) bataz besteko alkohol kontsumo totala (g/kg/h) (alkohol taldekoek) eta b) bataz besteko ur kontsumo totala (g/kg/h) (kontrol taldekoek) (*p<0,001 Students T-test).**



3.1. Antsietate maila eta ikas-ahalmena eta memoria espaziala neurtzeko portaera probak

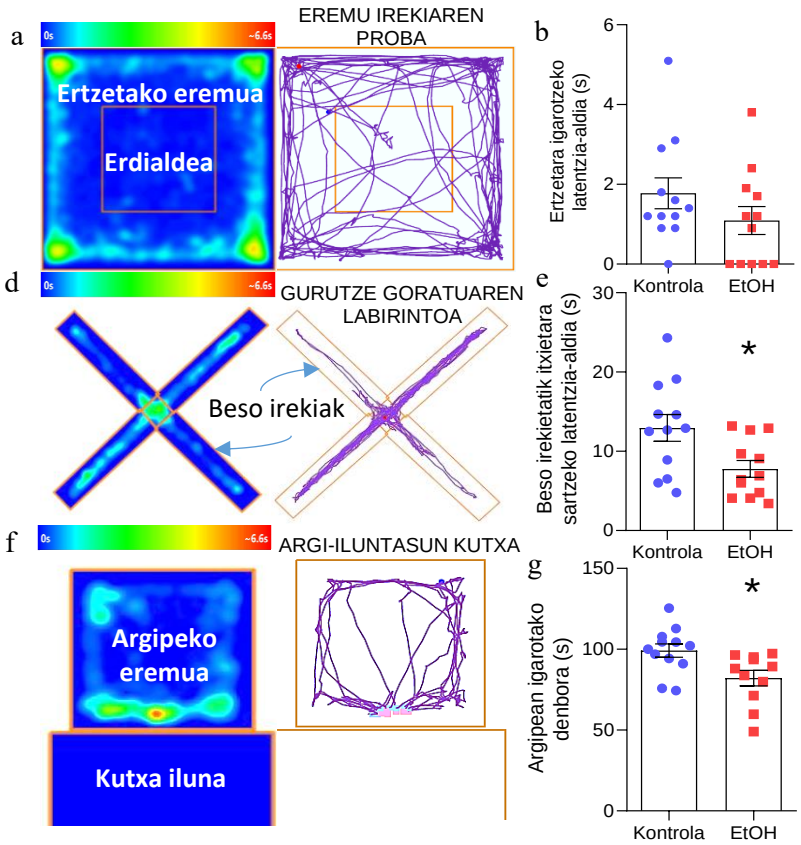
Abstinentzia fasearen bukaeran, helduaro goiztiarrean, alegia, sagu emeei portaera probak burutu zitzaizkien, antsietate maila eta ikas-ahalmena eta memoria espaziala ikertzeko asmoz.

Antsietate maila neurtzeko portaera probak

Antsietate maila neurtzeko hiru egun-hiru portaera probako protokoloa erabili zen. Hiruretan, saguak 5 minutuz aske esploratzeko aukera izan zuten eta aldagai desberdinak neurtu ziren. Lehen egunean, eremu irekiaren proba burutu zen (3a. irudia); honetan, horma altuko kutxa karratu zuri baten ertzetan eta erdialdean igarotzen den denbora neurtzen da, baita animalia erdialdean utzi ondoren ertzera igarotzeko latentzia-aldia. Bigarren egunean, gurutze goratuaren labirintoaren proba burutzen da, zeinak bi beso ireki eta beste bi beso itxi dituen (3d. irudia); beso ireki zein itxietan emandako denbora neurtzen da, baita lehen aldiz beso irekietara irten ondoren itxietara bueltatzeko latentzia-denbora. Azken egunean, argi-iluntasun kutxaren proba gauzatzen da, kutxa guztiz ilun batez eta eremu ireki argiztatu batez osatuta dagoena (3f. irudia); proba honetan animalia argiztatutako eremuan utzi ondoren ilunpera sartzeko behar izandako denbora neurtzen da, baita ilunpean eta argitan pasatutako denbora ere. Animaliak antsietate-portaera erakutsiz gero, ertzetan, eremu itxietan eta ilunpetan denbora gehiago pasatuko du, eremu irekiek, altuerak eta argi intentsitate altuek antsietatea eragiten baitie.

3. Irudiko emaitzetan ageria den moduan, proba hauetan oro har alkohol taldeko saguek (n=12 EtOH) kontrol taldekoek (n=12) baino antsietate-maila handiagoa erakutsi dute. Eremu irekiaren proban alkohol taldeko animaliak ertzetara lehen aldiz bizkorrago igarotzeko joera daukatela ikus daiteke (3b. irudia). Gurutze goratuaren labirintoan, lehen aldiz beso irekietara irten ondoren beso itxietara bueltatzeko latentzia-denbora askoz motzagoa izan zen (3e. irudia) eta talde bereko saguek denbora gutxiago iragan zuten argipean kontrol taldeko saguek baino (3g. irudia). Emaitza hauek bat datoz aurretik sagu arretan ikusitakoarekin, non, nerabezaroan alkohola kontsumitu ondoren, helduaroan antsietate motako portaerak ageri zituzten eremu irekiaren proban eta argi-iluntasun kutxan gauzatutako esperimentuetan (Rico-Barrio et al., 2019).

3. irudia. Antsietate-maila neurtzeko portaera probak: a) eremu irekiaren probaren bero-mapa eta jarraipen-mapa; b) lehen aldiz ertzetako eremura igarotzeko behar izandako denbora (s); d) gurutze goratuaren labirintoko bero-mapa eta jarraipen-mapa; e) lehenaldiz beso irekietatik itxietara sartzeko igarotako denbora (s); f) argi-iluntasun kutxaren bero-mapa eta jarraipen-mapa; g) argipean igarotako denbora (s) (*p<0,05 Students T-test).



Barnes labirintoaren proba

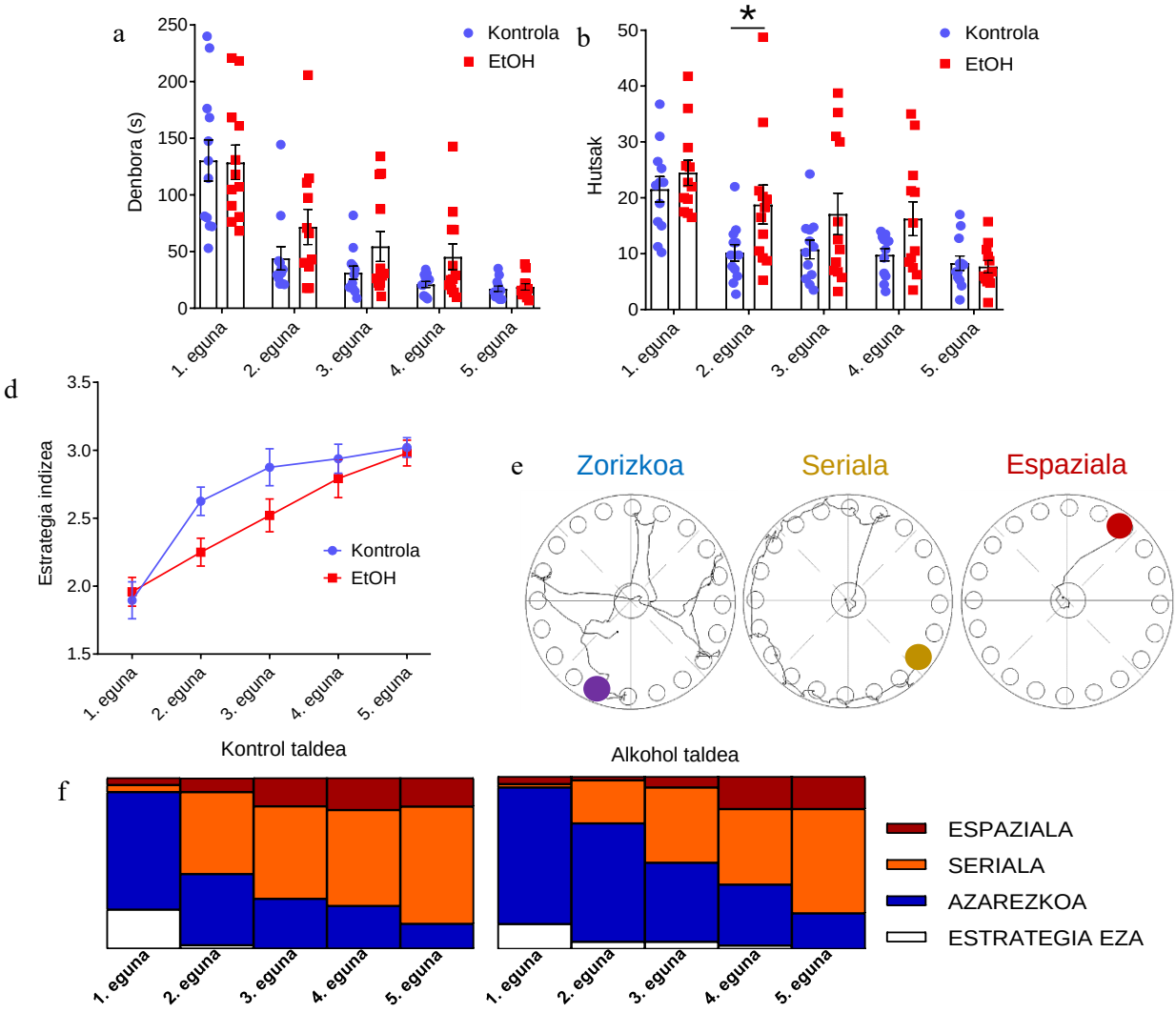
Animalien ikas-ahalmena eta espazio-memoria neurtzeko Barnes labirintoa erabili zen. Barnes labirintoa mahai borobil altu bat da, zeinen ertzetan 20 zulo borobil distantziakide dauden. Mahai hau paretetan ikusmen-pistak dituen gela batean kokatzen da. Proba hasi aurretik animalia bakoitzari zulo bat ezartzen zaio honek iraungo dituen 5 egunetarako. Zulo horretan, kutxa beltz ilun bat kokatzen da eta lehen saio-aldia baino lehen animalia kutxan minutu batez atseden hartzen uzten da, kutxari ohitu dadin. Esperimentua 5 egunez luzatzen da, egun bakoitzean 4 entrenatze saio burutzen direlarik, gehienez 4 minutukoak; hau da, saio bakoitza animalia kutxan sartzean bukatzen da, baina 4 minutu igaroz gero saioa bukatutzat ematen da eta animalia kutxan barneratzen da. Saio bakoitzaren ondoren animalia beste minutu batez atsedenaldian uzten da kutxan.

Portaera proba honetan aldagai desberdinak neurtzen dira: latentzia-denbora edo kutxara sartzeko animaliak behar izandako denbora; animaliak burututako hutsak edo kutxa aurkitu

aurretik animaliak ikuskatu dituen zuloen kontaketa; eta animaliak kutxa aurkitzeko erabilitako estrategia: random edo zorizko estrategia, zoriz aurkitzen duenean; estrategia seriala, zuloak bata bestearen atzetik ikuskatzen dituenean berea aurkitu arte; eta espaziala, gelako ikusmen-pistak erabiliz zuzenean aurkitzen duenean (4e. irudia). Lau minutuak igarota zuloa aurkitzen ez badu, estrategia-ezatzat hartzen da.

4. irudian agerikoa den bezala, nerabezaroan alkohola kontsumitu duten saguek defizit kognitiboa dute helduaroan, prozesamendu-memorian, ikas-ahalmenean eta oroimen espazialean, zehazki. Egunek aurrera egin ahala, kontrol taldeko saguek bizkorrago ikasten dutela dirudi, kutxa aurkitzeko behar izandako denbora (4a. irudia) eta topatu artean egindako hutsek nabarian utzi duten moduan (4b. irudia). Era berean, entrenatze-saioak pasatzen ziren heinean kontrol taldea estrategiak barneratzen joan ziren proba egunen hasiera-hasieratik, alkohol taldeak, aitzitik, saio gehiago behar izan zituen ikasketa maila bera erdiesteko (4d eta 4f. irudiak). Emaitza hauek protokolo bera jarraituz sagu arretan lortutako emaitzen ildo beretik doaz, nerabezaroan botiloi motako alkohol kontsumoak narriadura kognitibo iraunkorra eragiten duela frogatu baita.

4. irudia. Barnes labirintoaren proban kontrol (n=12) eta alkohol taldeetan (EtOH) (n=12) kutxa aurkitu artean neurtutako bataz besteko a) latentzia-denbora (s) eta b) huts kopurua; d) kutxa aurkitzeko erabilitako bataz besteko estrategia-indizea, 1: estrategia eza izanik, 2: zorizkoa, 3: seriala eta 4: espaziala, e) egunero bataz beste talde bakoitzak kutxa aurkitzeko erabili duen estrategiaren saio-kopurua zenbaki absolututan eta f) estrategia bakoitzaren jarraipen-mapa adibideak (*p<0,05 Sidak probaren arabera).



3.2. CB1 hartzaile zelularraren dentsitate optikoa hipokanpoan

Laginen prestaketa

Mikroskopio optikoan hipokanpoa aztertu zen (5. irudia), zehazki, CB1 hartzaile zelularraren dentsitate optikoa. Mikroskopioan analisia egin ahal izateko, lehendabizi laginen prestaketa zertu zen. Horretarako, animaliaren perfusioa gauzatzen da garuna fixatu dadin. Ondoren, garuna erauzi eta bibratomoan 45 µm-tako lodierako mozketak burutzen dira.

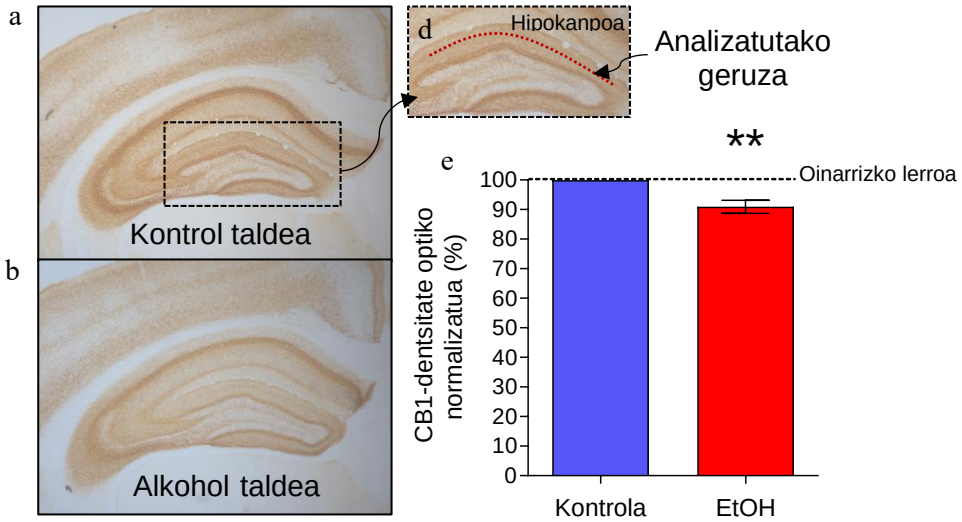
Immunozitokimika

Behin laginak prestatu ondoren, CB1 hartzailearekiko espezifikoa den antigorputz bat erabiliz immunozitokimika teknika burutu zen. Teknika honen funtsa interesezko proteina bat ikusgai egitean datza; horretarako, lagina antigorputz primario batekin inkubatzen da interesezko proteinari lotu dadin (CB1 ahuntz antigorputz poliklonal primarioa). Seinalea anplifikatzeko asmoz, lehenengo antigorputz primarioarekiko espezifikoa den antigorputz sekundarioarekin eta ondoren abidina-biotina konplexuarekin inkubatzen da. Azkenik, mikroskopio optikoan ikustea ahalbidetzeko diaminobentzidinarekin inkubatzen da, abidina-biotina konplexuari lotu eta erreakzio kimiko bati esker markaketa errebelatuko duena. Laginak, jada kolorea eskuratuta, gelatinaz blaitutako beirazko portetan jartzen dira, lehortu ondoren deshidratatu eta azkenik erretxinatan zopatuz estalkia ezartzen zaio. Teknika honi esker, kasuan kasuko interesezko proteina, honetan CB1 hartzailea markatzen da, zenbat eta proteina gehiago, orduan eta dentsitate optiko handiagoa behatuko da mikroskopioan.

CB1 hartzailearen dentsitate optikoa

Kontrol eta alkohol taldeko 3 garun, 8 hipokanpo garuneko analisia gauzatu zen mikroskopio optikoan ateratako argazkiez baliatuz (5a eta 5b. irudiak). Hipokanpoko erdiko geruza molekularreko dentsitate optikoa aztertu zen zehazki (5d. irudia). Ondoren, kontrol taldeko emaitzak 100 baliora normalizatu ziren eta balio hori oinarrizko lerrotzat hartuz, alkohol taldeko dentsitate-balioak normalizatu ziren (5e. irudia). Emaitzei erreparatuz gero, nerabezaroan alkohola kontsumitu duten sagu emeek helduaro goiztiarrean CB1 hartzailearen dentsitatean galera jasaten dutela behatu daiteke, %10eko dentsitatearen jaitsiera, hain justu ere. Emaitza hauek bat datoz sagu arretan mikroskopio elektronikoan behatutako CB1 hartzailearen galerarekin, bai neuronetan (Peñasco et al., 2020) eta bai astrozitoetan (Bonilla del Río et al., 2019).

5. irudia. Mikroskopio optikoan analizatutako x10 handipenean a) kontrol taldeko (n=3) eta b) alkohol taldeko (n=3) hipokanpoei ateratako argazkiak, d) aztertutako hipokanpoko geruza molekularra eta e) talde bien arteko CB1 hartzailearen dentsitate optikoa %tara normalizatuta, kontrol taldearen bataz besteko dentsitatea oinarri lerrotzat ezarriz, hau da, %100ean (p<0,01 Students T probaren arabera).**



4. Ondorioak

Emaitza hauetan argi ikusi da alkoholak emeetan ondorio kaltegarri iraunkorrak eragiten dituela, bai kognizioan eta bai maila zelularrean ere. Prozesamenduko memoria eta memoria espaziala kaltetzen dira, baita ikas-ahalmena ere. Gainera, garunean oparoena den hartzaile zelularraren dentsitateren murrizpen bat ikusi da hipokanpoan, non prozesu kognitiboak gauzatzen diren. Baliteke, beraz, hartzaile honen galerak zerikusia izatea alkoholak eragindako narriadura kognitiboarekin.

Baina hortaz gain, emeek alkoholarekiko erakusten duten preferentziak arrekin konparatuz adikzioarekiko izan ahal duten zaurgarritasuna agerian utzi du. Emaitza hau azpimarratzekoa da, aurretik aipu egin den moduan nerabezaroko alkohol kontsumoak epe luzera droga honen menpekotasun arazoak sorrarazi bailitzake.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Nerabezaroa garapen-trantsizio aldia da, non alderdi emozionalak, sozialak, fisikoak eta mentalak bateratzen eta nahasten diren. Gizarteratze arrakastatsua emateko beharrezkoak diren trebetasun fisiko eta pertsonartekoak garatzen eta mamitzen dira eta arrazoitze-ahalmena, adimena eta bestelako gaitasunak eratzen dira. Aldaketa garai honen bereizgarriak dira arriskue- eta esploratze-portaerak eta zirrara eta sentsazio berrien bilaketa. Hau guztia burmuinaren garapenarekin estuki lotuta dago (Crews et al., 2016). Burmuinaren garapen prozesu hau da, hain zuzen ere, alkoholaren kontsumoaren aurrean garuna hain sentikorra bilakatzen duena eta izan ditzakeen kalteak iraunkorrak izatera iristea ahalbidetzen duena.

Ondo deskribatuta dago oinarrizko ikerketan arren nerabezaroko betekadan oinarritutako alkohol kontsumoak luzarora dakartzan ondorioak, baina ikerketa batzuen arabera emeak alkoholaren aurrean sentikorragoak izan daitezkeela dirudien arren, oraindik ez dago oso argi hauetan ekar ditzakeen kalteak, ezta hauen mekanismoak. Etorkizunean lerro berdinarekin jarraitzea da asmoa, portaera proba desberdinak gauzatuko dira, maila azpizelularrean zer gertatzen den behatuko da mikroskopio elektronikoaren bidez, western blot analisiekin proteinen kuantifikazioa eta elektrofisiologia tekniken bidez hipokanpoko plastikotasuna aztertuko dira, alkoholak emeetan eragiten dituen iraupen luzeko kalteak argitzeko xedez.

6. Erreferentziak

Alfonso-Loeches, S., eta Guerri, C. (2011), Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain, Critical reviews in clinical laboratory sciences, 48(1), 19-47.

Bonilla-Del Río I, Puente N, Peñasco S, Rico I, Gutiérrez-Rodríguez A, Elezgarai I, Ramos A, Reguero L, Gerrikagoitia I, Christie BR, Nahirney P eta Grandes P. (2019), Adolescent ethanol intake alters cannabinoid type-1 receptor localization in astrocytes of the adult mouse hippocampus, Addiction Biology, 24(2), 182-192.

Crews, F. T., Vetreno, R. P., Broadwater, M. A., eta Robinson, D. L. (2016), Adolescent alcohol exposure persistently impacts adult neurobiology and behavior. Pharmacological reviews, 68(4), 1074-1109.

Eichenbaum, H., Otto, T., eta Cohen, N. J. (1994), Two functional components of the hippocampal memory system, Behavioral and Brain Sciences, 17(3), 449-472.

Hommer, D., Momenan, R., Rawlings, R., Ragan, P., Williams, W., Rio, D., eta Eckardt, M. (1996), Decreased corpus callosum size among alcoholic women, Archives of neurology, 53(4), 359-363.

Hommer, D. W., Momenan, R., Kaiser, E., eta Rawlings, R. R. (2001), Evidence for a gender-related effect of alcoholism on brain volumes, American Journal of Psychiatry, 158(2), 198-204.

Jacobson, R. (1986), The contributions of sex and drinking history to the CT brain scan changes in alcoholics, Psychological Medicine, 16(3), 547-559.

Naassila, M., Pierrefiche, O., Ledent, C., eta Daoust, M. (2004), Decreased alcohol self-administration and increased alcohol sensitivity and withdrawal in CB1 receptor knockout mice, Neuropharmacology, 46(2), 243-253.

Ortiz, S., Oliva, J. M., Pérez-Rial, S., Palomo, T., eta Manzanares, J. (2004), Chronic ethanol consumption regulates cannabinoid CB1 receptor gene expression in selected regions of rat brain, Alcohol and alcoholism, 39(2), 88-92.

Peñasco, S., Rico-Barrio, I., Puente, N., Fontaine, C. J., Ramos, A., Reguero, L., ... eta Grandes, P. (2020), Intermittent ethanol exposure during adolescence impairs cannabinoid type 1 receptor-dependent long-term depression and recognition memory in adult mice, Neuropsychopharmacology, 45(2), 309-318.

Pfefferbaum, A., Desmond, J. E., Galloway, C., Menon, V., Glover, G. H., eta Sullivan, E. V. (2001a), Reorganization of frontal systems used by alcoholics for spatial working memory: an fMRI study, Neuroimage, 14(1), 7-20.

Pfefferbaum, A., Rosenbloom, M., Deshmukh, A., eta Sullivan, E. V. (2001b), Sex differences in the effects of alcohol on brain structure, American Journal of Psychiatry, 158(2), 188-197.

Rhodes, J. S., Ford, M. M., Yu, C. H., Brown, L. L., Finn, D. A., Garland Jr, T., eta Crabbe, J. C. (2007), Mouse inbred strain differences in ethanol drinking to intoxication, Genes, Brain and Behavior, 6(1), 1-18.

Rico-Barrio, I., Peñasco, S., Puente, N., Ramos, A., Fontaine, C., Reguero, L., Giordano, M., Buceta, I., Terradillos, I., Lekunberri, L., Mendizabal, J., Rodríguez De Fonseca, F., Gerrikagoitia, I., Elezgarai, I., eta Grandes, P. 2019, Cognitive and neurobehavioral benefits of an enriched environment on young adult mice after chronic ethanol consumption during adolescence, Addiction biology, 24(5), 969-980.

SIIS Centro de documentación y Estudios (2013), Euskadi y drogas 2012 / Euskadi eta drogak 2012, Eusko Jaurlaritza-Gobierno Vasco, 397.

Squeglia, L. M., Schweinsburg, A. D., Pulido, C., eta Tapert, S. F. (2011), Adolescent binge drinking linked to abnormal spatial working memory brain activation: differential gender effects, Alcoholism: clinical and experimental research, 35(10), 1831-1841.

World Health Organization (2019), Global status report on alcohol and health 2018, World Health Organization.

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau Eusko Jaurlaritzak (IT1230-19); Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III (ISC-III) eta Europar Batasunaren Europako Eskualde Garapenerako Funtsak (ERDF-EU; RD16/0017/0012); MINECO/FEDER, UE (SAF2015-65034-R); Ikerbasque eta MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad) PGC2018-093990-A-I00 (MICIU/AEI/FEDER, UE) (E.S.-G.) finantzatutako ikerketari esker eta Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) Ikertzaileak Prestatzeko Doktoretza Aurreko Kontratatuei (L. L. PIF 18/315; M. S. PIF 19/164; S.A. PIF 16/251 eta I. T. PIF 17/292) eta Eusko Jaurlaritzako Ikertzaileak Prestatzeko Doktoretza Aurreko Kontratuari esker (A. M.) gauzatu da.

Erizaintza euskaraz: jarduteko edota ikasteko aukera eta oztopoen azterketa

Elizegi, G., Elezgarai, I., Anabitarte, N.
UEU/EHU
garbilekaroz@gmail.com

Laburpena

Euskal Herrian erizainek hainbat oztopo topatzen dituzte egunerokoan jarduera euskaraz egiteko. Ikerketa lan honek Euskal Herriko lurralde desberdinetan erizaintza euskaraz ikasteko eta jarduteko dauden hutsuneak eta aukerak aztertzea du helburu. Elkarrizketa sakonaren teknika erabiliz sei erizain elkarrizketatu dira, egoeraren diagnosia egin eta oztopo nagusiak identifikatzeko. Aldi berean, etorkizunera begira dauden aukerak identifikatu eta neurriak proposatzeko baliatu da. Elkarrizketatuek euskaraz jarduteko zailtasunen artean hizkuntza zapalkuntzaren ondorioz sortutako botere harremanak, kontzientzia eskasa eta kultura gaitasunaren formakuntza falta nabarmendu dituzte. Etorkizunera begira berriz norabide bateratu baten gabezia nabarmentzen da.

Hitz gakoak: erizaintza, euskara, kultura gaitasuna, kontzientzia, botere harremana

Abstract

Nurses in the Basque Country encounter several obstacles to practice nursing in Basque on a daily basis. The purpose of this research study is to evaluate the gaps and opportunities to study and practice in Basque in different regions. Six nurses were interviewed using an in-depth interview technique to identify the underlying obstacles and diagnosis of the situation. The opportunity was also taken to identify and propose future measures and options. Among the difficulties in practicing in Basque the interviewed emphasized the power relations arising from language oppression, poor awareness, and lack of training in cultural competence. Regarding proposed measures for the future the lack of a united direction becomes apparent.

Keywords: nursing, basque, cultural competence, awareness, power relations

1. Sarrera eta motibazioa

Euskal Herrian, oro har erizainek, beste hainbat profesionalek bezala, hainbat oztopo topatzen dituzte egunerokoan jarduera euskaraz aurrera eraman ahal izateko. Gabezi ugari daude egunerokoan pazienteen zein langileen hizkuntza eskubideak bermatzeko. Hizkuntz komunitate gisa, Euskal Herri osoan, euskaldun guztiok osasun sistema publikoan euskaraz artatuak izateko eskubidea bermatua egotea dugu helburu. Administrazio zein egoera soziolinguistiko desberdinak kontutan hartu behar ditugun arren, lurralde osorako estrategia bateratua garatzea ezinbestekoa da helburu hau lortzeko.

Bide horretan, erizaintzari dagokionez unibertsitateko ikasketak herrialde guztietan euskaraz burutu ahal izatea aurrerapauso garrantzitsua izango litzateke. Eskaintza aktiboa eskainiko duten eragile aktiboak izango diren langileak sortuz. Erizainek beren jarduera osoa euskaraz gauzatu ahal izateak, osasun sisteman langile kopuru gehien duen lanbidea delako eta pazienteekin denbora gehien pasatzen duten profesionalak direlako, jauzi kualitatibo zein kuantitatibo nabarmena ekarriko luke osasungintzan helburu den euskararen normalizazioan.

Ildo honetatik, ikerketa lan honek Euskal Herriko lurralde desberdinetan erizaintza euskaraz ikasteko eta jarduteko dauden hutsuneak eta aukerak aztertzea du helburu. Lana burutzeko herrialde ezberdinetako sei erizain elkarrizketatu dira, beren praktika eta bizipenak kontuan harturik, egoeraren diagnosia egin eta arazo edo oztopo nagusiak identifikatzeko. Aldi berean, etorkizunera begira dauden aukerak identifikatu eta neurriak proposatzeko bidea du xede.

Euskarak osasungintzan bizi duen egoera aldatzen da Euskal Herriko eremu administratibo, lurralde, zein zonaldearen arabera. Beste hainbat arloetan bezala, banaketa administratiboak, egoera soziolinguistikoak, eskumen mugatuak eta egoera historiko politikoak osasungintzan ematen den euskararen erabilera ere baldintzatzen du.

Hizkuntzak, kulturaren ardatz garrantzitsua den heinean, herritarren inguruaren ikuskera definitzen du. Euskaldunon kasuan, hizkuntza gure kulturaren oinarria dela esan dezakegu. Lan honetan aztertuko dugu erizaintzaren kasuan zenbateko garrantzia duen osasun langileek duten kultura gaitasuna edo beharbada kultura gaitasun eza.

Osasun sisteman kultura gaitasunak sistemak sinesmen, ohitura eta jarrera desberdinak dituzten herritarrak artatzeko gaitasuna deskribatzen du, herritarren behar sozial, kultural eta linguistikoak betetzeko ahalmena barne. Kultura gaitasuna biztanleria osoarentzat kalitatezko arretarako irisgarritasuna hobetzeko tresna eraginkorra da (Betancourt et al., 2002).

Kultura gaitasuna lortzeko, osasun langileei ohartarazi behar zaie faktore sozialak zein kulturalak duten garrantzia osasunaren inguruko sinesmen zein jarreretan, formakuntza eta hezkuntzaren bitartez tresna eta baliabideak eman behar zaizkie faktore hauek modu egokian kudeatzeko, eta beren pazienteak ahalduntzen lagundu behar dituzte paziente eta osasun langileen arteko harremanean jarrera aktiboa har dezaten (Betancourt et al., 2002).

Euskal Herri mailan egin diren azterketen ondorioetan ere kultura gaitasuna eta hizkuntzaren kontzientziaren garrantzia azpimarratu dira behin eta berriz. Osasungintzan euskararen erabilera bultzatzeak, zerbitzuaren kalitatean eragiten du, kalitatea hizkuntzarekin lotuta dagoelakoz (Montes, 2016).

Zerbitzua bakoitzaren ohiko edo jatorrizko hizkuntzan ez emateak pazienteen arteko desberdintasuna sortzen du. Norberaren beharrak komunikatzeko zailtasunek ezinegona eta etsipena eragiten du, bai pazienteengan zein osasun langileongan (Montes, 2016).

Hizkuntza kontzientzia, berriz, hizkuntzaren ezaugarriez eta pertsonen bizitzan duen garrantziaz ohartzea, eta ezagutzan oinarrituriko gaiarekiko kontzientzia sendoa eskuratzea da (Montes, 2016).

Gaitasun kulturala zein hizkuntza kontzientzia bezalako kontzeptuak, mundu mailan hainbat osasun sistemetan txertatzeko prozesuan abian diren arren, Euskal Herrian ia ezezagunak diren praktikak dira. Osasun langileen formakuntzatik kanpo gelditzen dira eta hainbat langileek zalantzan jartzen dute honen beharra dagoenik ere.

Erizaintzak pisu garrantzitsua izan dezake bide honetan, kontzeptu eta formakuntza ereduak gurera egokituz, eta eredu propioa sortuz. Aipatzekoa da Aotearoan erizainek bultzatutako ekimenez kultura segurtasunaren inguruan egin den lanketa. Segurtasun kulturalaren kontzeptua Aotearoako jendartearen testuinguru kolonialetik sortu zen. Maorien, Zeelanda Berriko jatorrizko herritarren, osasun egoera kaskarra zela eta hauek osasun arretaren aldaketa sakonaren eskaerari erantzuna emateko asmoarekin erizain Maoriek egindako auto ebaluazioaren ondorioa izan zen. Prozesu horren ondorioz, 1992tik aurrera kultura segurtasuna erizaintza eta emaginen formakuntzetan betebeharreko eskakizuna bihurtu zen (Papps eta Ramsden, 1996).

Gaur egun segurtasun kulturalaren kontzeptua osasun arretaren ikuspegi kritikoa bezala garatu da, jatorrizko herriei Kanada, Australia eta Zeelanda Berria bezalako estatu neo- kolonialetan eskainitako osasun zerbitzuei begira. Gaitasun kulturala eskaintzen duten beste markoetan ez bezala, segurtasun kulturalaren ikuspegiak kolonizazioaren ondorioz jasandako kalteak eta jatorrizko herriek pairatzen dituzten botere desberdintasunak aitortzen ditu, b aita hauek osasungintzan eduki ditzazketen ondorioak ere (Mackean, eta al., 2019).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Euskal Herriko antolaketa administratiboa dela medio herritarren osasun arreta hiru entitate desberdinek ematen dute. Euskal Autonomi Erkidegoa (EAE) osatzen duten Araba, Bizkaia eta Gipuzkoan Osakidetza da osasun arretaren hornitzaile publikoa. Nafarroa Garaian Osasunbideak ematen die zerbitzua herritarrei. Nafarroa Behera, Lapurdi eta Zuberoan berriz, herritarrak Frantziako Estatuko osasun sistemaren menpe daude.

Osakidetzak EAEn eta Osasunbideak Nafarroan autonomi maila garrantzitsu batekin herrialde mailan kudeatzen den osasun sistema publikoak dira. Ipar Euskal Herrian, berriz, Parisetik Estatu mailako irizpideen arabera kudeatzen den sistemaren menpe daude. Alde batetik, oinarrizko arreta langile liberatuek eskaintzen dute, eta ospitale publikoak, berriz, Frantziar estatuaren baldintzapean daude.

Egoera horretan, herritar zein osasun langile euskaldunak osasun arreta jasotzeko edota lan egiteko aukera edukitzeko asko aldatzen da eremuaren arabera. Hizkuntz Eskubideen Behatokiaren arabera, EAEri dagokionez osasun-asistentzia euskaraz jasotzeko eskubidea legez aitorturik izateak edota zerbitzu hori euskaraz jaso nahi duela eskatzeak ez du bermatzen osasun-arreta euskaraz jasoko duenik (Behatokia).

Nafarroan ere osasun-asistentzia euskaraz jasotzeko oztopoek kexa ugari sortzen ditu; bai eta eremu publikoan euskaraz aritzeko Euskararen Legeak eskubidea aitortzen duen zonaldean ere. Profesionalen gaitasun linguistikoak berebiziko garrantzia dauka herritarren hizkuntza-hautua bermatzeko eta herritarrei kalitatezko zerbitzua eskaini ahal izateko, baina Osakidetzako hiru langiletik batek du ziurtatuta bere lanpostuari dagokion hizkuntza profila eta Osasunbidean, langile euskaldunen kopurua ez da %0,5era iristen (Behatokia).

Nafarroa Behera, Lapurdi eta Zuberoan, berriz, osasun langileek ez dute inongo hizkuntz eskakizunik euskarari dagokionez. Euskaraz eskaintzen den zerbitzua langileen borondatearen araberakoa da, eta ez dago inongo babes ofizialik herritarrak euskaraz artatuak edota lan egin ahal izateko. Gauzak horrela, lan hau burutzeko datuak lortzeko garaian ere zailtasun handiagoak izan dira Ipar Euskal Herriko informazioa eskuratzerakoan.

Osasun langile euskaldunen eskasiak lotura zuzena du osasun zientzietako ikasketak euskaraz burutzeko zailtasunekin. Erizaintzaren gradu osoa ikasteko aukera EAEn bakarrik dago gaur egun. Euskara hizkuntza gutxitua izanik, eta hizkuntza politika ahula dela medio, euskaraz matrikulatzen diren ikasle kopurua %60ra ez da iristen bataz beste. Araba eta Gipuzkoako campusetan matrikulazio datuak igo diren bitartean, Bizkaian jaitsi egin dira azken urteetan (EHU euskara errektoreordetzatik jasotako datuak).

2019/2020ko ikasturtean lehenengo aldiz eskaini zuen Nafarroako Unibertsitate Publikoak (NUP) Erizaintzan euskaraz matrikulatzeko aukera. Errealitatean lehenengo urteko hamaika ikasgaietatik hiru bakarrik eskaini ziren euskaraz. 2020/2021 ikasturterako lehenengo kurtsoan hamaika ikasgaietatik bost dira euskaraz eta aurreko urtean euskaraz hasi zirenak ez dute izango erizaintzako ikasgairik euskaraz bigarren urtean (Universidad Pública de Navarra (UPNA) - Nafarroako Unibersitate Publikoa (NUP).

Ipar Euskal Herriko ikasleek, berriz, ez dute Ipar Euskal Herrian aukerarik erizaintza euskaraz ikasteko. Ikastolako ikasleek EAEra ikastera joatea erabakiko balute ere, Estatuen arteko unibertsitatean sartu aurreko ikasketen puntuaketa sistemaren desberdintasunak zein gaztelania menperatu behar izateak oztopo nabarmenak sortzen dizkie. Beraz, Ipar Euskal Herriko ikasleentzat erizaintza euskaraz ikasi ahal izateko aukerak are murritzagoak dira (Hik Hasi).

2.1. Helburuak

1) Euskal Herriko eremu administratibo desberdinetan erizaintza euskaraz jarduteko dauden hutsuneak eta aukerak aztertzea.

2) Etorkizunera begira dauden aukerak identifikatzea eta neurriak proposatzea.

3) Euskal Herri mailan erizaintzan kultura gaitasunaren inguruko formakuntzaren inguruko hasierako azterketa orokor bat burutzea.

3. Ikerketaren muina

Euskal Herrian erizainek euskaraz jarduteko eta lan egiteko dituzten oztopo eta aukerak aztertzeko elkarrizketa sakona erabili da ikerketako metodo gisa. Elkarrizketa erdi egituratua erabili da non aurrez prestaturiko gidoia baliatu den gaietan sakontzeko (Howitt eta Howitt, 2019). Bakoitzaren esperientziatik erizaintza euskaraz jarduteko bizi dituzten oztopoetan, zailtasun hauen erroa aztertzean eta etorkizunera begira ikusten dituzten balizko irtenbideetan sakontzeko xedearekin bideratu dira galdera irekiak.

Elkarrizketak elkarrizketatuen ingurune naturalean egin dira, bakoitzaren etxean eta elkarrizketaren transkripzioa gauzatuz. Elkarrizketa transkribatzeko eta informazioa ikerketa burutzeko erabili ahal izateko elkarrizketatutako erizainek baimena sinatu dute. Nahitaezko laginketa erabili da, azterketa egin ahal izateko erizainak euskaldunak izatea, hizkuntza eta kulturaren inguruko kontzientzia edukitzea eta euskal lurralde ezberdinetan banatuak izatea beharrezkoa zelakoz gaiaren azterketan sakondu ahal izateko. Elkarrizketatutako sei erizainak emakumeak dira 26 urtetik 69 urteko adin tartea dutelarik. Guztiak urteetako esperientzia dute erizaintzan eta eremu desberdinetan aritutakoak dira: Ospitalean, Pediatrian, Larrialdietan, Etxeko Ospitalizazioan, Oinarrizko Arretan eta Erradiologia Interbentzionistan besteak beste. Esperientzia hori eremu publiko zein pribatuan banatu da. Jatorriari dagokionez elkarrizketatutako bi baxe-nafartar, bi nafar, eta bi gipuzkoar daude.

Ikerketan izandako mugarik garrantzitsuena elkarrizketatuen kopurua izan da, hasierako azterketa bat egiteko nahikoa izan daitekeen arren, ondorioak estrapolatzeko elkarrizketa kopurua handiago bat komenigarria izango litzateke.

Hasierako gidoiari jarraituz elkarrizketatuek beren esperientzietatik abiatutako gogoetak partekatu dituzte. Gogoeta hauetatik zazpi ideia nagusi atera dira, behin eta berriz errepikatu direnak. Ideia eta gogoeta horien arabera burutu da beraz analisia.

Elkarrizketetan jasotako informazioa aztertzerakoan gaikako kodeketa erabili da. Transkripzioetan bildutako informaziotik gai zehatzak identifikatu dira datuekin familiarizatzeko, honen ondoren gaien hasierako kodifikazioa egin da. Hasierako kodifikazioa oinarri hartuta, gaien bilaketa bat eman da. Ondoren, maizen agertzen ziren gaien berrikuspena egin da, gaien definizioa eta etiketatzea egin arte. Sailkapen horretan oinarrituz gauzatu da azterketa (Howitt eta Howitt, 2019).

3.1. Euskaraz artatzearen garrantzia

Informazio bilketan behin eta berriz azpimarratu da hizkuntzak duen garrantzia erizainaren lana modu eraginkorrean burutu ahal izateko. Pazientearen hizkuntza jakitea ezinbestekoa da erizainentzat sendatze prozesuan hain beharrezkoa den informazio bilketa zuzena lortzeko. Euskarak eguneroko praktikan pazienteekiko hurbiltasuna eragiten du eta langile erdaldunek askotan lortzen ahal ez duten informazio eta konfiantza lortzen da langile eta pazientearen artean. Pazientearen hizkuntza ez jakiteak paziente zein langilearengan sortzen den ezinegona ere aipatzen da elkarrizketa desberdinetan.

3.2. Botere harremana

Hizkuntza nagusia eta euskararen arteko botere harremana ere nabarmendu den gaia izan da. Euskara bigarren mailako hizkuntza gisa tratatua izateak, eta horren ondorioz euskaldunak, hizkuntzaren erabilera baldintzatzen du. Esanguratsua da botere posiziotan euskaldunak egotea edo ez nola baldintzatzen duen ingurukoen praktika. Elkarrizketatu guztiek aipatzen dute bizi dugun harreman sistema hierarkikoan gora joan ahala euskararen presentzia gutxitu egiten dela. Mediku eta erizainen arteko botere posizioaren ondorioz emandako kasuak ere nabarmentzekoak dira. Herritar elebakarrek hizkuntza hegemonikoaren erabilera esklusiboa bultzatzeko egiten duten botere posizioaren erabilera orokortua dela ere adierazten da.

3.3. Kultura gaitasuna

Osasun arretan kulturak duen garrantziak ere kezka sortzen du elkarrizketatuen artean. Hizkuntza soilik ikastea ez du balio hizkuntz komunitatearen ohitura eta sinesmenak ezagutzen ez badira. Gaixotasun prozesuak baldintzatu dezakeen informazioa galtzeko arrisku handia dago, bertako mundu ikuskera kontutan ez bada hartzen.

3.4. Kontzientzia

Hizkuntzaren gaineko kontzientzia eta hizkuntzaren erabileran ekarri dezakeen motibazioa ere elkarrizketetako ardatzetako bat izan da. Hizkuntza jakiteak, erabiltzeak ala ez duen garrantziaz eta ondorioez ohartu gabe, etsipen sentsazio orokorra sortzen duela errepikatu den gogoeta izan da. Nolabait, hizkuntza irakastea eta ikastea, lanpostuak lortzeko baldintza gisa jartzea ez da eraginkorra, hizkuntzaren kontzientzia ez badago edo ez bada transmititzen.

3.5. Oztopoak

Erizaintza euskaraz ikasi edota jarduteko oztopoak ugari dira eta maila ezberdinetan ematen dira. Elkarrizketatu guztiek adierazten dute erizaintza euskaraz ikasteko eta jarduteko egunero eta etengabean bizi dituzten oztopo eta erasoak. Erasoak maila guztietan ematen dira, lankideetatik hasita administrazioko eremu guztietara ailegatu arte. Erizain euskaldunei euskaraz ez mintzatzea eskatzen zaie eta egiten dutenean erasoak jasaten dituzte. Gutxietsiak eta bigarren mailakoak direla sentiarazten zaie. Maiz aipatzen dute lankideekin dituzten eztabaidak eta borrokak, baita horrek sortzen duen etsipena eta nekea ere.

Zenbait eremuetan erizaintza ikastea ezinezkoa da eta ikasten ahal den eremuetan ikasketak erdizka egiten dira euskaraz, praktiketako kasuetan adibidez. Honen ondorioz hitz teknikoak eta idatzizko lanetan dituzten arazoak nabarmenak dira.

Administrazioari dagokionez, osasun zentroetatik hasita goi mailako komunikazioetara iritsi arte komunikazioa erdaraz ematen da. Bilerak, parteak, mezu elektronikoak,...erdaraz ematen dira. Administrazioak euskararekiko duen borondate eza ere ideia orokorra da, praktikatzen den herrialdea edozein izanda ere.

3.6. Burujabetza/nazio zapalkuntza

Euskarak bizirauteko edo gure hizkuntzaren iraupena bermatu ahal izateko, gaur egun herri bezala bizi dugun zapalkuntzatik ateratzearen beharraren ideia behin baino gehiagotan agertu da elkarrizketetan. Ideia nagusia izanik, Euskal Herria bi estatu zapaltzaileen menpe dagoen bitartean hizkuntzak ere menpekotasunean eta zapaldurik segituko duela da. Ondorioz, hartzen diren beste neurri guztiak bizirauteko eta pitzadurak tapatzeko neurriak besterik ez dira.

3.7. Proposamenak

Etorkizunera begira erizaintza euskaraz ikasi eta praktikatu ahal izateko planteatutako proposamenak ildo desberdinetatik eman dira. Banakako arduretatik hasita erizain bakoitzak bere eremuan ahal duen heinean euskaraz egitea eta bere euskara maila hobetzea proposatzen da. Oinarri sendoak jarriz, erizain bezala saretu eta antolatzearen beharra ere azpimarratu da, Euskal Herri mailako egitura baten babespean. Kontzientzia hartzea eta kultura aldaketaren beharra ere aipatu da, aurrera egiteko baldintza bezala. Administrazioaren aldetik, aldaketa garrantzitsuak egitearen beharra bai eguneroko praktikan eta baita unibertsitatean ikasketak euskaraz burutu ahal izateko ere ezinbestekotzat ematen da.

4. Ondorioak

Euskarak Euskal Herri mailan Osasungintzan eta bereziki erizaintzaren eguneroko praktikan bizi duen egoera islatzen da. Proiektu honetan elkarrizketatutako sei erizainen esperientziatik abiatuz Euskal Herri mailako hasierako azterketa bat egin dezakegu. Eremu administratibo ezberdinen banaketak, praktikan ñabardurak izan arren, erizain euskaldun bezala esperientzia komun ugari atzeman daitezke.

Guztiek nabarmentzen dute eguneroko erizaintza modu eraginkorrean praktikatu ahal izateko hizkuntzak duen garrantzia. Komunikazio tresna izatetik aparte pazientearekin konfiantzazko harremana sortzeko beharrezkoa da. Sendatze prozesuaren baitan ere, ezinbesteko garrantzia dauka hizkuntzak. Jatorrizko herrien inguruan egindako ikerketa ugarik nabarmentzen dute jatorrizko hizkuntzak mantentzea eta biziberritzea ondorio positiboak dituela jatorrizko herrien osasun fisiko zein kolektiboan (Whalen, et al., 2016). Euskararen kasuan ere esan dezakegu kalitatezko arreta emateko zein emaitza positiboak edukitzeko oinarria dela.

Hizkuntza hegemonikoa eta euskararen arteko botere harremana ere nabarmendu den gaia izan da. Ezin dugu botere harreman honen gaineko azterketa egin gure hizkuntzak pairatzen duen zapalkuntzaren jatorria aztertu gabe. Mendez mende euskarak euskal herrian pairatu duen zapalkuntzak maila ezberdinetan dihardu gaur egun ere. Euskara bigarren mailako hizkuntza gisa tratatua izateak, eta horren ondorioz euskaldunak, hizkuntzaren erabilera baldintzatzen du. Rochek nabarmentzen du hizkuntza zapalkuntza, menderakuntza mota bezala, “arraza”, nazio, edota etnia zapalkuntzen ildo beretik doala. Ikertzaileek hizkuntza zapalkuntza bortxaketa fisiko, mental, sozial eta izpiritualaren eraginez betearazitako hizkuntza galera bezala definitzen dute (Roche, 2019).

Egoera horretatik abiatuta azaldu daiteke euskaldun eta erdaldunen artean ematen diren botere dinamikak. Erdaldunak posizio hegemonikotik euskaldunei esan ohi digute noiz, nola eta norekin aritzen ahal garen gure hizkuntzan. Euskaldunok berriz, zapalduaren posiziotik agindu horiek betetzen ditugu. Erizainen kasuan medikuak edo erizain arduradunaren agindupean hizkuntza aldatzea eskatzen zaigu gaur egun ere. Elkarrizketatu guztiek aipatzen dute bizi dugun harreman sistema hierarkiakoan gora joan ahala euskararen presentzia gutxitu egiten dela. Herritar elebakarrek hizkuntza hegemonikoaren erabilera esklusiboa bultzatzeko egiten duten botere posizioaren erabilera orokortua dela ere adierazten da.

Hizkuntza oso tresna eraginkorra da jakintza kulturala transmititzeko eta kulturaniztasuna mantentzeko. Hizkuntza eta kultura elkar lotuta daude, eta batek bestea zehazten ez badu ere, hizkuntza koherentzia kulturalaren adierazlea da (Whalen, et al., 2016). Kultura gaitasuna beraz, ezinbestekoa da osasun arretan hizkuntza gutxituen herritarren osasun arazoak ulertzeko. Elkarrizketetan adibide zehatzak ematen dira, non hizkuntzaren inguruko ezjakintasunak kultura ulertzerakoan gaizki ulertuak sortzen diren eta alderantziz. Erizaintzan, zein osasun arloko beste lanetan, pazientearen kontakizunaren ulermena berebizikoa da pazientearen osatze bidean.

Gauzak horrela, nabarmentzekoa da erizaintza ikasketetan edota bestelako ikastaroetan gaitasun kulturalaren formakuntzarik ez egotea. Mundu mailan egindako ikerketetan gomendio gisa jartzen den formakuntza den arren (Cooper eta Powe, 2004). Hezkuntza profesionala

emateko eragile garrantzitsutzat kontutan hartu beharko litzateke unibertsitatea. Galesen ereduari jarraikiz, funtsezkoa izan daiteke hizkuntzaren kontzientziazioan (Roberts, 2016).

Euskal Herriko kasuan, langile erdaldunen egoeraren ulermena hobetzeko eta euskaldunak ahalduntzeko ezinbesteko pausua izango litzateke kultura gaitasunaren formakuntza unibertsitate zein lantokietan txertatzea. Kultura gaitasunaren formakuntza horretan sartu daiteke hainbat elkarrizketetan aipatu den hizkuntzaren kontzientzia. Azkenean, formakuntza integral baten bitartez lortu daitekelakoz maila batean kultura aldaketa hori ematea langile zein herritarren artean. Jauzi kualitatibo bat izango litzateke osasun zerbitzuak herritar guztiak berdintasunean artatzeko bidean. Elkarrizketatuen esperientzien arabera, gaitasun kulturalaren inguruan jasotako formakuntza bakarra migrazioari begira izan da. Euskara eta euskal kultura ikusezina bihurtuz. Garrantzitsua da beraz, kultura gaitasunaren gaia euskaratik eta euskaraz egitea hizkuntza zapalkuntzaren estrategiarekin hausteko. Rochek aztertzen du baita ere nola hizkuntza zapalkuntza ezabatze praktiken bitartez ematen den. Zenbait populazio eta haien hizkuntzak diskurtsiboki ikusezin bihurtzeko moduak aztertzen ditu (Roche, 2019). Jabetu behar gara, ematen ditugun pausuak ematen ditugula, gure lana ikusezina egiteko saiakerak jarraituko dutela.

Ildo horretatik, lan honetan zehar hainbat izan dira euskaldun bezala erizainak ere eguneroko praktikan pairatzen dituzten eraso eta oztopoak. Horrekin lotuta dago, dudarik gabe, aipatutako hizkuntza zapalkuntza eta botere harremanen dinamika.

Hasiera batean lanaren oinarrietako bat izan ez bada ere behin baino gehiagotan azaldu da burujabetza eta nazio zapalkuntzaren auzia. Zalantzan jartzen da beste neurri guztien eraginkortasuna euskaldunok herri bezala burujabe izan arte. Azterketa sakonagoa eskatzen duen gaia izanda ere, osasungintzan zein beste arloetan euskararen normalizazioari buruz hitz egiterakoan kontutan hartu beharreko hausnarketa da.

Etorkizunera begira berriz, burujabetzatik haratago maila desberdinetako planteamenduak egiten dira. Ikuspegi desberdinak ematen dira eta adostasun eza dago modu eta ekintzetan. Proposamen guztiak interesgarriak, zentzuzkoak eta beharrezkoak izan arren, estrategia komun baten faltan zaila izango da etorkizunera begira aurrerapauso esanguratsuak ematea. Agian hasierako pausuak saretze eta antolaketa eraginkorrei begira jarri beharko lirateke.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunera begira abiatutako ikerketa lan honen ondorioetan sakontzeko elkarrizketa kopurua handitu eta elkarrizketak Euskal Herriko eremu gehiagotara zabaltzea komenigarria izango litzateke. Ondorio nagusien ildotik jarraikiz osasungintzan euskararen normalizazioa bermatzeko alde batetik erizaintza gradu zein espezializazio ikastaroetan gaitasun kulturalari buruzko derrigorrezko formakuntza proposatuko nuke. Beste aldetik, erizainen arteko nazio mailako saretzea eta elkarlana bultzatzea ezinbestekoa da estrategia eraginkorrak sortu eta bultzatzeko.

6. Erreferentziak

Behatokia.[kontsulta2020-10-02].Eskuragarri. http://behatokia.eus/core_0.1206/fitxategia_ikusi.php?id=21&karp=1

Betancourt, J. R., Green, A. R., eta Carrillo, J. E. (2002). *Cultural competence in health care: Emerging frameworks and practical approaches*. New York, NY: Commonwealth Fund, Quality of Care for Underserved Populations.

Cooper, L. A., eta Powe, N. R. (2004). *Disparities in patient experiences, health care processes, and outcomes: The role of patient-provider racial, ethnic, and language concordance*. New York, NY.: Commonwealth Fund.

Hik Hasi. [kontsulta2020-10-02]. Eskuragarri. http://www.hikhasi.eus/Artikuluak/20100601/hautaprobak-baxoa-eta-selektibitatea

Howitt, D., eta Howitt, D. (2019). *Introduction to qualitative research methods in psychology putting theory into practice*. Upper Saddle River: Pearson.

Mackean, T., Fisher, M., Friel, S., eta Baum, F. (2019). A framework to assess cultural safety in Australian public policy. *Health Promotion International, 35*(2), 340-351. doi:10.1093/heapro/daz011

Montes, A. (2016). Hizkuntza kontzientzia osasungintzan. Unibertsitatearen eta Osakidetzaren ekarpena zein elkarlana kultura-aldaketa prozesuan. *Bat. Soziolinguistika Aldizkaria. 101,* 93-106

Papps, E., eta Ramsden, I. (1996). Cultural safety in NURSING: The New Zealand Experience. *International Journal for Quality in Health Care, 8*(5), 491-497. doi:10.1093/intqhc/8.5.491

Roberts, G. (2016). Hizkuntzaren inguruko jardunbide egoki ak osasungintzan eta gizarte zerbitzuetan: "eskaintza aktiboaren" printzipioa txertatzea Galeseko testuinguru elebidunean. *Soziolinguistika Aldizkaria, 4*(101), 69-92.

Roche, G. (2019). Articulating language Oppression: Colonialism, Coloniality and the erasure OF TIBET'S minority languages. *Patterns of Prejudice, 53*(5), 487-514. doi:10.1080/0031322x.2019.1662074

Universidad Pública de Navarra (UPNA) - Nafarroako Unibersitate Publikoa (NUP). [kontsulta2020-10-02]. Eskuragarri. https://www.unavarra.es/sites/grados/salud/enfermeria/asignaturas-y-profesorado.html

Whalen, D. H., Moss, M., eta Baldwin, D. (2016). Healing through language: Positive physical health effects of indigenous language use. *F1000Research, 5*, 852. doi:10.12688/f1000research.8656.1

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau *Hizkuntzaren Kudeaketa Osasun Arretan: Euskara Komunikazio Klinikoan* graduondokorako egindako proiektuan du jatorria. Horrengatik, eskertu nahi ditut graduondokoa burutu ahal izateko lan egin duten guztiak eta baita bidelagun izan ditudan ikaskideak ere. Bereziki eskertu nahi ditut proiektua eta artikulu hau idaztera animatu eta lagundu didaten Izaskun Elezgarai eta Naroa Anabitarte.

1 motako kannabinoide hartzaile (CB_1) astroglialaren adierazpena loki-lobuloko epilepsia ereduan

Mimenza, A.[1,2], Bonilla-Del Rio, I.[1,2], Egaña-Huguet, J.[1,2], Anaut-Lusar, I.[1], Serrano, M.[1,2], Lekunberri, L.[1,2], Gerrikagoitia, I.[1,2], Elezgarai, I.[1,2], Puente, N.[1,2], Grandes, P.[1,2]

[1]Neurozientziak Saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU)
[2]Achucarro Basque Center for Neuroscience, UPV/EHUko Zientzia Parkea (UPV/EHU)
amaia.mimenza@ehu.eus

Laburpena

Loki-lobuloko epilepsia (LLE) mundu osoko pertsonen %1-3ri eragiten dien afekzio neurologiko ohikoenetako bat da, eragin izugarria izanik pazienteen bizitzan. Horregatik, epilepsien fisiopatologia argitzea premiazkoa suertatzen da tratamendu antiepileptiko berriak garatu ahal izateko. Ikerketa honetan, CB_1 hartzaile astroglialaren espresioan zentratu gara, CB_1 astroglialak zitotoxikotasunean duen eginkizunari buruzko emaitza kontraesankorrak baitaude. Ikerketa honen hipotesiaren arabera, hipokanpoko CB_1 hartzaile astroglialek funtsezko rola betetzen dute epilepsiaren fisiopatologian. Hemen, CB_1 hartzaile astroglialaren hipokanpoko espresioa ikertu dugu azido kainiko LLE animalia-eredu batean.

Hitz gakoak: Epilepsia, Hipokanpo, Astrozito, CB_1, mikroskopio elektronikoa

Abstract

Temporal lobe epilepsy (TLE) is one of the most common neurological conditions affecting 1-3% people worldwide and having a tremendous impact on patients´ life. It is therefore crucial to elucidate the pathophysiology of the epilepsies with the aim of generating novel antiepileptic treatments. In this study, we have focused on the expression of CB_1 receptor in astroglia, as there are conflicting results regarding the role of astroglial CB_1 receptors in excitotoxicity. The hypothesis in this study is that CB_1 receptors localized in astrocytes of the hippocampus play a key role in the pathophysiology of epilepsy. Here, we have investigated the CB_1 receptor astroglial expression in the hippocampus of a kainic acid TLE mouse model.

Keywords: Epilepsy, Hippocampus, Astrocytes, CB_1, electron microscopy

1. Sarrera eta motibazioa

Nerbio-sistemari eragiten dioten gaixotasunentzako prebentziozko tratamenduak garatzea premia mediko nabarmena da. Epilepsia uste baino zabalduagoa dagoen asaldura neurologiko da, eta edozein adin, sexu, arraza, klase sozial edo herrialdetako jendea erasan dezake. Munduko Osasun Erakundearen (MOE) datuen arabera, egunero 5 milioi epilepsia kasu berri diagnostikatzen dira munduan. Datu hauek egiaztatzeko ez dugu urrun begiratu beharrik, izan ere, Osakidetzako neurologia zerbitzuko kontsulta ohikoena izaten da epilepsia.

Garuneko konputazio neuronalak izaera kitzikatzaileko jarduera transmisore bizia behar du. Hala ere, jarduera hori gehiegizkoa baldin bada, kalte eta heriotza neuronala eragiten ditu, zitotoxikotasun-mekanismo baten bitartez (Zhang et al., 2015). Kontrolik gabeko neurotransmisio kitzikatzailearen hedapenak krisi epileptikoen agerpena eragiten du. Beraz, krisi epileptikoak garuneko neurona multzo baten ohiz kanpoko eta gehiegizko jardueraren emaitzak direla esan dezakegu.

Krisi epileptiko batek ez du derrigorrez epilepsia esan nahi, izan ere, hainbatetan krisi epileptikoak kanpoko eraso jakin baten ondorioz gertatzen dira, hala nola, legez kanpoko drogen kontsumoak edo tumore batek eraginda. Pertsona batek epilepsia duela esan daiteke bi krisi epileptiko espontaneo, berezko eta, gutxienez, 24 ordu baino gehiagoko aldean pairatzen dituenean.

Funtsean, krisi epileptikoak bi motatakoak izan daitezke: krisi jeneralizatuak edo orokortuak, batetik, eta krisi partzialak edo fokalak, bestetik. Krisi jeneralizatuetan, deskarga epileptikoek garuneko azalera osoari eragiten diote; krisi fokaletan, ordea, deskarga epileptikoak garun-azaleraren zona jakin batera mugatzen dira. Garunaren gune desberdinek pairatu ditzakete deskarga horiek, eta horren arabera, adierazpenak anitzak izan daitezke: konbultsioak (kontrolik gabeko mugimenduak),

usain desatseginen antzematea, ikusmen arazoak, eta abar. Laburbilduz, epilepsia talde oso zabala da (Fisher et al., 2017).

Epilepsia fokalen mota ezberdinen artean, loki-lobuluko epilepsia (LLE) dugu ohikoen. Datu ofizialen arabera, giza-populazioaren %1ari eragiten dio (Bhaskaran eta Smith, 2010). Deskarga epileptikoak lobulu tenporalaren barne-egituretan hasten dira, substratu fisiopatologiko arruntena esklerosi hipokanpala izanik (Engel, 2001), izan ere, hipokanpoaren zirkuitu glutamatergikoek joera handiagoa dute gehiegizko jarduera kitzikatzailea jasateko (Ben-Ari, 2002). Hori dela eta, hipokanpoa konbultsio epileptikoen gune garrantzitsua dela ondorioztatu dezakegu.

Epilepsiaren aurka eskuragarri dauden tratamendu gehienek konbultsioak prebenitzea dute helburu, garunean $GABA_A$ hartzailearen aktibaziorekin batera, transmisio inhibitzailea areagotuz adibidez (Sugaya eta Kano, 2018). Tamalez, tratamendu horiek askotan LLErako erregogorrak izaten dira (epilepsia dutenen hamarretik hiruk ez dute onurarik botikekin). Ez dugu ahaztu behar epilepsia bizi guztirako gaixotasun bat izan ohi dela, eta ondorio sozial, psikologiko eta kognitibo larriak dituela (Xu et al, 2013). Gainera, paziente hauetan hilkortasun tasa hirukoiztu egiten da. Beraz, premiazkoa suertatzen da diana terapeutiko berriak identifikatzea etorkizunean ordezko bide terapeutikoen garapena ahalbidetzeko.

Arestian esan bezala, neurotransmisio kitzikatzailea kontrolik gabe geratzen bada, krisi epileptikoak eragin ditzake. Hortaz, zirkuitu neuronalek kontrol sistema oso zehatzak behar dituzte gehiegizko jarduera baten arriskua mugatzeko. Sistema endokannabinoidea (eKBS) kontrol-sistema hauetako bat da (Smith, 2005). Garunaren eKBS honako hauek osatzen dute: ligando lipidiko endogenoek (anandamida eta 2-arakidonoilglizerola), haien sintesi, garraio eta degradazio proteinek, eta 1 motako kannabinoide hartzaileak (CB_1) (beste hartzaile batzuk ere badaude, CB_2 kasu). Sistema hau garuneko hainbat funtziotan inplikatuta dago, ahoratzetik hasi eta ezagutzaraino doana (Marscicano et al., 2008; Bellocchio et al., 2010). Kannabinoideen hartzaileek funtsezko eginkizuna dute garuneko funtzio eta disfuntzioetan (Piomelli, 2003), eta krisi epileptikoak mugatu ditzaketela frogatuta dago (Alger, 2014).

CB_1 hartzailea oso ugaria da nerbio-terminal gabaergikoetan eta, neurri txikiagoan, burmuineko beste populazio zelular batzuetan; esaterako, neurona glutamatergikoetan, garuneko mitokondrietan eta astrozitoetan. Astrozitoen mintzean kokaturiko CB_1 hartzailearen aktibazioak diferentziazio astrogliala sustatzen du, baita neurona-astrozito komunikazioa ere. Komunikazio horrek garrantzi handia du plastikotasun sinaptikoan, oroimenean eta portaeran (Katona eta Freund, 2012; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018).

Zelula glialak nerbio-sistema zentraleko (NSZ) populazio zelularrik ugariena dira, horietatik gehiengoa astrozitoak izanik. Urteetan zehar, astrozitoak NSZren euskarri estrukturalaz bakarrik arduratzen zirela uste izan da. Haatik, gaur egun kontzeptu hau erabat aldatu egin da, eta badakigu astrozitoak garunaren fisiologian funtsezkoak direla. Nabarmentzekoa da astrozitoek funtzio sinaptikoan eginkizun garrantzitsua dutela, "Sinapsi Tripartitako" partaide aktiboak direlarik. Astrozitoek gune sinaptikoaren glutamatoa birziklatu egiten dute garraiatzaile espezifikoen bitartez. Glutamatoa NSZren neurotransmisore kitzikatzaile nagusia da, ondorioz, astrozitoek zitotoxikotasuna saihesten laguntzen dute (Araque et al., 2014). Ildo horretan, astrozitoen funtzionamendu okerrak hainbat neurofisiopatologiei laguntzen diela frogatu da, hala nola epilepsiari (Coulter et al., 2015).

Aurrekoaz gain, astrozitoek epilepsian neuroinflamazioaren bitartez ere parte hartu ahalko lukete. eKBSk neuroinflamazioaren kontrolean duen parte-hartzeari dagokionez, astrozitoetan adierazitako CB_1 hartzaileek erantzun inflamatorioaren modulazioan laguntzen dutela dirudi (Stella, 2010).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egun ez da epilepsiaren kontrako behin betiko tratamendurik existitzen. Era berean, epilepsia duten pertsonen %30k ez diote tratamenduari erantzuten. Horregatik, kontrolik gabeko kitzikagarritasunaren azpian dauden mekanismoak ulertzeak berebiziko garrantzia du tratamendu antiepileptiko berriak garatu ahal izateko (Bates, 2015).

eKBSk neurona-sarearen kitzikagarritasunaren kontrolean duen berezko eginkizuna dela eta, kannabinoideek epilepsia tratatzeko interes farmakologiko handia piztu izan dute azkeneko urteotan (Monory et al, 2015). Kanabidiolak (CBD), Kalamu landarearen osagai ez psikoaktibo nagusiak, epilepsiaren aurka duen ahalmen terapeutikoaren lehendabiziko ebidentzia 1980ean iritsi zen (Cunha,

1980). Raphael Mechoulamek (kannabisari buruzko ikerketaren aitatzat jotzen den zientzialariak) eta haren lankideek burutu zuten saiakuntza klinikoak CBDak krisi konbultsiboak arintzeko duen ahalmena agerian utzi zuen. Alabaina, nazioarteko legeria zela medio, 2018. urtera arte Ameriketako Estatu Batuetako Elikagai eta Sendagaien Administrazioak (ingelesetik *Food and Drug Administration* edo *FDA*) ez zuen CBDean oinarritutako lehen botika (Epidiolex®) onartu. Sendagaien Europako Agentziak (EMEA) ostera, 2019ko irailera arte itxaron zuen tratamendu berri honi argi berdea emateko. Epidiolex® botikari esker, gaur egun haurrei eragiten dien bi epilepsia mota, Lennox-Gastaut eta Dravet sindromeak, tratatu daitezke.

Lehengo hariari jarraituz, bistan da neuronen mintzetan kokaturiko CB_1 hartzaileek zitotoxikotasunaren aurka babesten dutela (Marsicano et al, 2003). Ez hori bakarrik, hainbat LLEren animalia-ereduetan CB_1 hartzaile neuronalaren adierazpena kaltetuta ikusten da (Ludányi et al., 2008). Astrozitoen CB_1 hartzaileari dagokionez, astrozitoen glutamato-atzipen tasa kontrolatu dezakela frogatua dago. Alde batetik, Shivachar eta lankideek (2007) arratoi-astrozitoen kultiboetan CB_1 agonistek D-aspartatoaren atzipena inhibitzen dutela ikusi zuten. Bestetik, badirudi CB_1 hartzailearen blokeo farmakologikoak deskarga epileptiformeak murrizten dituela hipokanpoan (Coiret et al., 2012). Hau da, neurona glutamatergikoetan CB_1 hartzailearen aktibazioak zitotoxikotasuna murrizten duen bitartean, astrozitoetan hartzaile berdin horren aktibazioak jarduera epileptiformea areagotzen du. Neurona eta astrozitoetan itxuraz kontrajarriak diren efektu horiek eKBS balantze kitzikatzailea modu konplexua batean erregulatzen duela iradokitzen dute. Dena den, prozesu zitotoxikoen testuinguruan, literaturan CB_1 astroglialak aminoazido kitzikatzaileen erregulazioan duen eginkizunari buruzko emaitza kontraesankorrak daude.

Oraingoz oso gutxi dakigu astrozitoetako eKBSk epilepsian duen paperaz. Orain arte, garuneko eKBSren ikerketan ahalegin guztiak neuronetarantz ardaztu dira. Horregatik guztiagatik, honako ikerketa honetan eKBS astroglialak epilepsiaren fisiopatalogian duen rola zehaztu nahi dugu. Ikerketa honen helburua LLEren animalia-eredu batean hipokanpoko bihurgune horzduneko geruza molekularrean (BHGM) CB_1 hartzaile astroglialaren adierazpenean aldaketarik gertatzen den aztertzea da.

3. Ikerketaren muina

Azido kainikoa, glutamato aminoazido kitzikatzailearen analogoa, karraskarietan estatus epileptikoa (EE) eragiteko erabili ohi da. Literatura zientifikoan oso ondo deskribatutako LLE animalia-eredua da hau (Monory et al., 2006).

LLEren ezaugarri fenotipikoak mikroskopio elektronikoaren bitartez maila azpizelularrean aztertzeko, jatorrizko 14 asteko 6 sagu ar heldu (WT saguak izendaturikoak; ingelesetik *wild-type*) erabili genituen. Hauek banaka kaiolatu eta 22°C-ko gela baten sartu ziren (12h:12h-ko argi-iluntasun zikloan). Janaria eta ura *ad libitum* izan zuten une oro.

Saguak, ausaz, bi taldetan bereizi ziren (3 sagu talde bakoitzeko): kontrol taldea eta kainato (KA) taldea. Hiru ohitze egun ondoren, kontrol taldeari gatz-disoluzioa administratu zitzaion. KA taldeari, aldiz, azido kainikoa (20mg/kg) injektatu zitzaion.

Azido kainikoaren administrazioaren egunetik zazpi egunetara, perfusio transkardiakoaren bitartez garunak fixatu egin ziren. Ehuna paraformaldehidoz (%4), azido pikrikoz (%0,2) eta glutaraldehidoz (%0,1) hornitutako soluzioarekin fixatu zen. Garunak egun berean atera eta aste batera 50μmtako xerretan ebaki ziren bibratomoan.

Astrozitoetako CB_1 hartzailea aztertzeko, mikroskopio elektronikorako erretxinan murgildu-aurreko immunohistokimika bikoitza erabili zen. Metodo horri esker, CB_1 azpizelularra eta astrozitoen markatzaile proteikoa (GLAST) aldi berean lokalizatu ahal izan ziren. Glutamato aspartato garraiatzailea (ingelesetik *glutamate aspartate transporter* edo GLAST), astrozitoak era espezifikoan adierazten duen aminoazido kitzikatzaileen garraiatzaile bat da, zelula osoan zehar adierazten dena.

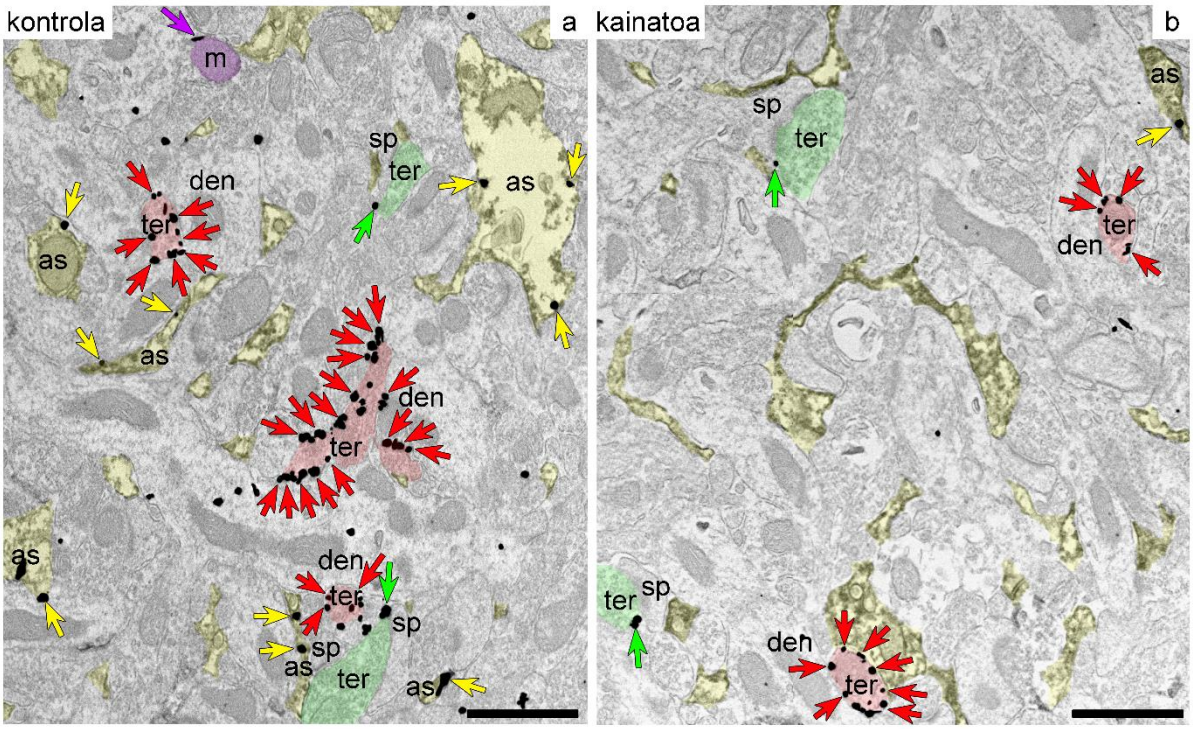
Metodo honetan, CB_1 hartzailearen aurka erabiltzen den bigarren antigorputzak 1,4nmtako urre partikula bat du itsatsia, zilarrez biziagotu ostean ikusarazten dena. Beste era batera esanda, CB_1 hartzailea dagoen tokian, metal partikula bat agertu zen. Astrozitoak aldiz, immunoperoxidasa metodoa erabiliz hauteman genituen. GLASTen aurka erabilitako antigorputz sekundario biotinilatuari

esker, astrozitoak errez bereiz daitekeen prezipitatu beltz batez (DAB) beteak agertu ziren mikroskopio elektronikoko ultramikrografietan.

Jarraian, immunohistokimikaren bitartez markatutako lagin hauek mikroskopio elektronikoan aztertzeko prestatu genituen osmio tetroxidoa eta berun zitratoa kontraste moduan erabiliz. Ultramikrotomoaren bitartez ebaki genituen 50nmko xerrei argazkiak atera genieten *JEOL JEM 1400 Plus* transmiziozko mikroskopio elektronikoa erabiliz.

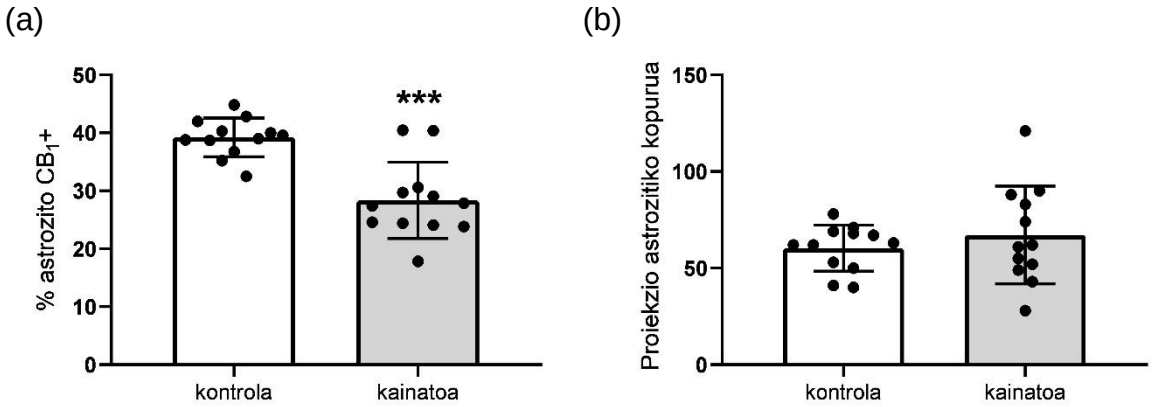
Espero bezala, hipokanpoko BGHM geruzan CB_1 hartzailea neuronetan eta mitokondrioetan ez ezik astrozitoetan ere aurkitu genuen (1. irudia). Azido kainikoaren animalia-ereduan CB_1 hartzaile astroglialaren adierazpenak aldaketarik sufritzen duen zehazteko, ImageJ ordenagailu softwarea erabiliz, hipokanpoko BGHM geruzan CB_1 markatzailerako positiboak eta negatiboak diren astrozito kopurua zenbatu ziren jarraian CB_1 positiboak diren astrozitoen ehunekoa kalkulatzeko. GraphPad software bidez analisi estatistikoa burutu zen (2. irudia).

1. irudia. Mikroskopio elektronikorako erretxinan murgildu-aurreko immunohistokimika bikoitza. CB_1 hartzailearen kokapen azpizelularra bihurgune horzduneko geruza molekularrean: (a) Kontrol taldean, CB_1 hartzailearen markaketa bukaera sinaptiko kitzikatzaileetan (ter, gezi berdeak) zein inhibitzaileetan (ter, gezi gorriak), astrozitoetan (as, gezi oriak) eta mitokondrietan (m, gezi moreak) behatu daiteke. (b) Kainato animali-ereduan CB_1 hartzaileak bukaera sinaptiko kitzikatzaileetan (ter, gezi berdeak) eta inhibitzaileetan (ter, gezi gorriak) daude, baina astrozitoetan ez dira hain ugariak (as, gezi oriak). Eskala barrak: 1µm



CB_1 hartzailearen adierazpenaren azterketak, hartzailearekin markatutako astrozitoen proportzioa (kontrolak: % 39,23 ± 0,96; kainatoak: % 28,37 ± 1.90) (*** $p < 0,001$) kainato animalia-ereduko saguetan nabarmen murriztu zela agerian utzi zuen (2.irudia a). Ultramikrografia bakoitzeko (290µm^2) proiekzio astrozitikoen kopuruari dagokionez, ez ziren ezberdintasun adierazgarririk antzeman. Kontrol saguetan 60,33 ± 3,44 astrozito/ultramikrografia zenbatu ziren, kainato saguetan, ordea, 67,17 ± 7,30 astrozito/ultramikrografia kontabilizatu ziren ($p > 0,05$) (2. irudia b).

2. irudia. Bihurgune horzduneko geruza molekularrean burututako azterketa estatistikoa azido kainiko zein kontrol saguetan. (a) CB_1 positiboak diren astrozitoen ehunekoa. (b) Astrozito kopurua ultramikrografia bakoitzeko (290µm^2). Datuak batezbestekoa ± SEM adierazten dira. Proba parametrikoen bidez aztertu ziren (unpaired t test *** p < 0,001).



4. Ondorioak

Behin ikerlan honen emaitzak aurkeztuta, orain arte azaldutakoa aurretiazko ikerketa baino ez dela esan beharra dago. Lortutako datuak nahiz eta gutxi izan, etorkizunean ikerketak hartuko duen norabidea zehazteko lagunduko digute.

Ikerketa muinaren atalean xehetasunez adierazten den bezala, sagu ar helduetan, azido kainikoak eragiten duen estatus epileptikoak CB_1 hartzailearen hipokanpoko adierazpenean aldaketak eragiten ditu. Kainatoa administratu eta aste betera, CB_1 hartzaileekin markatutako astrozitoen proportzioa nabarmen txikiagotu zen. Horrek garrantzi handiagoa hartzen du proiekzio astrozitikoen kopurua aldatzen ez dela kontuan hartzen badugu. Hemendik, ondorio garbi bat atera dezakegu: CB_1 hartzaile astrogliala krisi epileptikoetan konprometituta geratzen da.

Astrozitoek erantzun inflamatorioan parte hartzen dute pro-inflamatorioak diren molekulen isurketaren bitartez (Farina et al., 2007). Isurketa hau murriztu egin daiteke CB_1 hartzaile astroglialaren aktibazioak eragiten dituen erreakzio anti-inflamatorioei ezker (Metna-Laurent eta Marsicano, 2015). Hortaz, LLEren animalia-ereduan, CB_1 hartzaile astroglialaren gutxiagotzeak astrozitoen erreakzio anti-inflamatorioa urritzea ekarriko luke azido kainoikoaren administrazioaren ondoren. Kontuan hartuta azken hamarkadetan hainbat ebidentziek iradoki dutela inflamazio prozesuek epilepsiarekin lotura daukatela (Vezzani et al., 2014), astrozitoen CB_1aren ausentziak deskarga epileptimorfeak areagotuko lituzke azido kainikoa injektatu eta zazpi egunetara.

Argi dago lan honetan lortutako datuekin oso goiz dela CB_1 hartzaile astroglialak etorkizunean aplikazio klinikorik izango duen ala ez esateko. Oraindik asko dago ezagutzeko LLEren fisiopatologiari buruz eta, bereziki, krisi epileptikoetan astrogliak duen eginkizunari buruz. Beraz, ikerketa honen eta etorkizunean etorriko diren proiektuen helburua CB_1 astroglialak LLEn duen rola identifikatzea eta sakontasunean ezagutzea izango da. Izan ere, lan honetan nabarmen geratzen da CB_1 hartzaile astroglialak epilepsien fisiopatalogian esku hartzen duela. Astrozitoetan kokaturiko CB_1 hartzailea LLEn erabakigarria dela suertatzen bada, diana terapeutiko oso interesgarria izango litzateke eta eragin sozial handia izan lezake haren gainean eragiten duten botikak sortzea lortuko bagenuke, izan ere, epilepsia dutenen hamarretik hiruk ez dute onurarik gaur egun eskura ditugun botikekin. Baina ezer baino lehen, zehaztasunez ezagutu behar ditugu LLEren azpian gertatzen diren prozesu molekularrak eta CB_1 hartzaile astroglialaren eginkizuna, arestian esan bezala, bibliografian emaitza kontraesankorrak egon badaudelako eta orain arte egindako ikerketa gehienak neuronei zuzenduta egon baitira. Beste modu batera esanda, oraindik goiz da lan honetan lortutako datuak gizakietara estrapolatu ahalko diren ondorioztatzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

CB_1 hartzailearen presentziak astroglian duen eragina sakonago ikertu behar dugu. CB_1 positiboak diren astrozitoen ehunekoa kalkulatzeaz gain, proiekzio astrozitiko hauen azalera eta

morfologia aldaketa aztertuko dugu. Horretaz gain, CB_1 astrozitioaren ehunekoaren murrizketak zitokina proinflamatorio eta antiinflamatorioen mailan duen eragina Western Blot teknikaren bitartez analizatuko da.

Horrez gain, zenbait ikerketek frogatu dutenez astrozito-seinalizazioak oroimen-prozesuetan parte hartzen duela, saguei portaera frogak egitea (oroimen espaziala aztertzen duen Barnes laberintoa adibidez) interesgarria izango litzateke. Besteak beste, astrozitoen CB_1 hartzaileen delezioak identifikazio-oroimena kaltetzen duela ikusi delako (Santello et al., 2019).

6. Erreferentziak

Alger, B.E. (2014), Seizing an opportunity for the endocannabinoid system, *Epilepsy Curr.*. 14, 272-6.

Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R. eta Volterra, A. (2014), Gliotransmitters travel in time and space, *Neuron*, 81, 728-739.

Bates, K. (2015), Epilepsy: current evidence-based paradigms for diagnosis and treatment, *Prim Care.*, 42, 217-32.

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.

Bellocchio, L., Lafenete, P., Cannich, A., Cota, D., Puente, N., Grande, P., Chaouloff, F., Piazza, P.V. eta Marsicano, G. (2010), Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system, *Nat Neurosci.,* 13, 281-283.

Ben-Ari, Y. (2002), Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture, *Nat Rev Neurosci,* 3, 728–739.

Coiret, G., Ster, J., Grewe, B., Wendling, F., Helmchen, F., Gerber, U. eta Benquet, P. (2012), Neuron to astrocyte communication via cannabinoid receptors is necessary for sustained epileptiform activity in rat hippocampus, *PLoS One*, 7, 5.

Coulter, D.A. eta Steinhäuser, C. (2015), Role of astrocytes in epilepsy, *Cold Spring Harb Perspect Med.,* 53,a022434.

Cunha. J.M., Carlini, E.A., Pereira, A.E., Ramos, O.L., Pimentel, C., Gagliardi, R., Sanvito, W.L., Lander, N. eta Mechoulam, R. (1980), Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients, *Pharmacology*, 21, 175-85.

Engel Jr, J. (2001), Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned?, *The neuroscientist*, 7, 340-352.

Farina, C., Aloisi, F. eta Meinl, E, (2007), Astrocytes are active players in cerebral innate immunity, *Trends in immunology*, 28, 138-145.

Fisher, R.S., Cross, J.H., D'Souza, C., French, J.A., Haut, S.R., Higurashi. N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L., Peltola, J., Perez, E.R., Scheffer, I.E., Schulze-Bonhage, A., Somerville, E., Sperling, M., Yacubian, E.M. eta Zuberi, S.M. (2017), Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types, *Epilepsia*, 58,531–42.

Gutiérrez-Rodríguez, A., Bonilla-Del Río, I., Puente, N., Gómez-Urquijo, S. M., Fontaine, C. J., Egaña-Huguet, J., Elezgarai, I., Ruehle, S., Lutz, B., Robin, L.M., Soria-Gómez, E., Bellocchio, L., Padwal, J.D., van der Stelt, M., Mendizabal-Zubiaga, J., Reguero, L., Ramos, A., Gerrikagoitia, I., Marsicano, G. eta Grandes, P. (2018), Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus, *Glia*, 66, 1417-1431.

Katona, I. eta Freund, T.F. (2012), Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain, *Annu Rev Neurosci.*, 35,529-58.

Ludányi, A., Eross, L., Czirják, S., Vajda, J., Halász, P., Watanabe, M., Palkovits, M., Maglóczky, Z., Freund, T.F. eta Katona, I. (2008), Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus, *J Neurosci.,* 28, 2976-90.

Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutiérrez, S.O., van der Stelt, M,. López-Rodriguez, M.L., Casanova, E., Schütz, G., Zieglgänsberger, W., Di Marzo, V., Behl, C. eta Lutz, B. (2003), CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity, *Science,* 302, 84-8.

——————— , (2008): *Anatomical Distribution of Receptors, Ligands and Enzymes in the Brain and in the Spinal Cord: Circuitries and Neurochemistry*. *Cannabinoids and the brain (ed Attila Kofalvi)* Springer, 161-201.

Metna-Laurent, M. eta Marsicano, G. (2015), Rising stars: modulation of brain functions by astroglial type-1 cannabinoid receptors, *Glia*, 63, 353-364.

Monory, K., Massa, F., Egertová, M., Eder, M., Blaudzun, H., Westenbroek, R. eta Long, J. (2006), The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus, *Neuron*, 51, 455-466.

——————— , (2015), Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus, *J Neurosci.*, 35,3842-50.

Piomelli, D. (2003), The molecular logic of endocannabinoid signalling, *Nat Rev Neurosci.,* 4, 873-84.

Santello, M., Toni, N. eta Volterra, A. (2019), Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment, *Nature neuroscience*, 22, 154-166.

Shivachar, A.C. (2007), Cannabinoids inhibit sodium-dependent, high-affinity excitatory amino acid transport in cultured rat cortical astrocytes, *Biochem Pharmacol,* 73, 2004-11.

Smith, P.F. (2005), Cannabinoids as potential anti-epileptic drugs, *Curr Opin Investig Drugs*, 6, 680-5.

Stella, N. (2010), Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas, *Glia*, 58, 1017–1030.

Sugaya, Y. eta Kano, M. (2018), Control of excessive neural circuit excitability and prevention of epileptic seizures by endocannabinoid signalling, *Cell Mol Life Sci.*, 75, 2793-2811.

Vezzani, A., French, J.A., Bartfai, T. eta Baram, T.Z. (2011), The role of inflammation in epilepsy, *Nature Reviews Neurology,* 7, 31-40.

Xu, D., Miller, S. D. eta Koh, S. (2013), Immune mechanisms in epileptogenesis, *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 195.

Zhang, L.N., Hao, L., Wang, H.Y., Su, H.N., Sun, Y.J., Yang, X.Y., Che, B., Xue, J. eta Gao, Z.B. (2015), Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity, *Adv Clin Exp Med.,* 24, 161-5.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau honako diru-laguntzei esker burutu da: Eusko Jaurlaritza (IT1230-19); Europar Batasunaren Europako Eskualde Garapenerako Funtsa (ERDF-EU; RD16/0017/0012); MINECO/FEDER, UE (SAF2015-65034-R); Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-107548RB-I00); AM-k Euskal Jaurlaritzako Hezkuntza Saileko doktoreak ez diren ikertzaileak prestatzeko doktoratu aurreko programaren beka bat dauka. MS, LL, IT eta SA-ren Euskal Herriko Unibertsitateko doktoratu aurreko ikertzaileen kontratuak (PIF 19/164; PIF 18/315; PIF 17/292 eta PIF 16/251); JEH doktorearen kontratua (PIC 280/20), eta IBDR doktorearena (BES-2016-076766).