



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**Mikrogliaren aktibazioa eta 2
motako hartzaile
kannabinoidearen de novo
adierazpena loki bihurguneko
epilepsia ereduan**

*Itziar Terradillos, Itziar Bonilla-Del
Río, Svein Achicallende, Jon Egaña,
Irantzu Rico, Ianire Buceta,
Leire Lekunberri, Leire Reguero,
Juan Luis Mendizabal, Julian
Romero, Maria Teresa Grande,
Cecilia J. Hillard, Nagore Puente,
Izaskun Elezgarai, Inmaculada
Guerricagoitia eta Pedro Grandes*

122-129 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.16>



Mikroglia-aren aktibazioa eta 2 motako hartzaille kannabinoidearen de novo adierazpena loki bihurguneko epilepsia eremuan

Terradillos, Itziar^{1,2}; Bonilla-Del Río, Itziar^{1,2}; Achicallende, Svein^{1,2}; Egaña, Jon^{1,2}; Rico, Irantzu^{1,2}; Buceta, Ianire^{1,2}; Lekunberri, Leire^{1,2}; Reguero, Leire^{1,2}; Mendizabal, Juan Luis^{1,2}; Romero, Julian⁴; Grande, Maria Teresa⁴; Hillard, Cecilia J.⁵; Puente, Nagore^{1,2}; Elezgarai, Izaskun^{1,2}; Guerricagoitia, Inmaculada^{1,2} eta Grandes, Pedro^{1,2,3}

¹Medikuntza eta Erizaintzako fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU

²Achucarro Basque Center for Neuroscience, UPV/EHUko Zientzietako parkeko eraikina

³Zientzia medikoen barrutia, Victoriako Unibertsitatea, Victoria, BC, Kanada; ⁴Zientzia esperimentalen fakultatea, Francisco de Vitoria Unibertsitatea, Madril;

⁵Farmakologiako departamentua eta Neurozientzien ikerketa zentroa, Wisconsin-eko Medikuntza eskola

itziar.terradillos@ehu.eus

Laburpena

Loki bihurguneko epilepsia (ingeleseko Mesial Temporal Lobe Epilepsy, MTLE) epilepsia partzial mota ohikoena da, tratamenduari erresistentzia handia garatzen duena eta osasun fisiko eta mentala erabat kaltetzen dituena. Ikerketa honetan epilepsiarekin erlazionaturik egon daitezkeen inflamazio prozesuekin gertatzen den mikroglia-aren aktibazioan eta CB₂ hartzaillearen espresioan zentratu gara. Izan ere, mikroglia M₁ inflamazio-aldeko egoeran ala M₂ inflamazio-kontrako egoeran sartzen da CB₂ hartzaillearen aktibazioaren bidez. Gainera, hartzaille horren espresioa, garun lesioetan eta neuroendekapenezko zenbait gaixotasunetan, handitzen dela frogatu da. Ikerketa honetan, CB₂ hartzaillearen adierazpena hipokanpoan aztertu dugu MTLE sagu eredu batean. Helburu honetarako CB₂ hartzaillearen espresioa markatuta duten saguak (CB₂-GFP) eta hartzaillea adierazten ez duten saguak erabili ditugu (CB₂-KO).

Hitz gakoak: inflamazioa; CB₂ hartzaillea; mikroglia; loki bihurguneko epilepsia.

Abstract

Medial temporal lobe epilepsy (MTLE) is the most common form of partial epilepsy that presents great resistance to treatment and severely impairs physical and mental health. In this study, we have focused on microglial activation and CB₂ receptor expression related to the inflammatory processes that could be involved in epilepsy. Pro-inflammatory M₁ state microglia enters the anti-inflammatory M₂ state by the CB₂ receptor activation. Furthermore, this receptor expression has been shown to increase in brain injuries and in several types of neurodegenerative diseases. Here, we have investigated the CB₂ receptor expression in the hippocampus of a MTLE mouse model by using CB₂-GFP and CB₂-KO mutant mice.

Key words: inflammation; CB₂ receptor; microglia; temporal lobe epilepsy.

1. Sarrera eta motibazioa

Epilepsia gaixotasun neurologiko ohikoenetarikoa bat da, kronikoa eta sendaezina. Munduko biztanlerian %1-3-ko prebalentzia du (Bhalla et al., 2012; O'Connell et al., 2017), guztira 50 milioi pertsonen jasaten dutelarik mundu osoan (Herrera-Vázquez et al., 2016). Paziente epileptiko guztien %30-ak tratamenduari erresistentea den epilepsia pairatzen du, nahiz eta existitzen diren terapia motak oso desberdinak diren: farmako bidezko terapiak eta prozedura kirurgikoak adibidez. Paziente hauek morbiditate larria jasaten dute eta hilkortasun tasaren handipen esanguratsua. Gainera, bizitzaren lehen urteetan ondorio larriak agertu daitezke, hala nola, alderdi kognitiboan eta motorrean atzerapena. Tratamenduak eraginkorrak direnean ere, ezgaitasuna sortzen duten albo eragin kaltegarriak agertzen dira eta dosifikazioaren aldaketa txikiak edo bizitzako egoera desberdinek konbultsio gertakariak piztu ditzakete (adibidez, dosi baten hartzearen ahaztearekin, alkoholaren kontsumoarekin, lo gabeziarekin, etab.) (O'Connell et al., 2017). Gainera, farmako antiepileptikoekin tratamendua burutzeak konbultsioak saihesten ditu askotan, baina kasu gehienetan, hauen eraginkortasuna paziente epileptikoen asaldura kognitiboan zalantzarria da (Di Marzo et al., 2015). Beraz, epilepsiaz diagnostikatutako paziente

gehientzat, bizi kalitatea okertzen da gaixotasuna eta honen kontrako terapien albo ondorioak direla eta (O'Connell et al., 2017). Arlo honetako gaur egungo ikerketa asko, ordezkio bide terapeutikoen garapenean bideratu dira, estatus epileptikoaren (EE) ostean epileptogenesisia eta bere ondorio kaltegarriak, hala nola, oxidazio-estresa, kalte neuronalak, eta hauen ondoriozko funtzio kognitiboen okerragotzea ekiditeko (Tchekalarova et al., 2018).

Hipokanpoa konbultsio epileptikoen gune garrantzitsua da (Wallace et al., 2003) epilepsia partzial mota ezberdinen artean, ohikoenetarikoa loki bihurguneko epilepsia delarik (MTLE) (Herrera-Vázquez et al., 2016). MTLEa giza-populazioaren %1-ari eragiten dio (Bhaskaran and Smith, 2010). Oraindik ez dira epilepsia mota honen eta bere ondoriozko bat bateko konbultsioen kausak ondo ezagutzen. Hala ere, MTLEren agerpena hurrengo aldaketa anatomikoekin erlazionatzen da beti: neuronen galera, neuronen kitzikakortasunaren handipena, inhibizioaren ahultzea, zirkuituen berantolaketak, sinapsien anormaltasunak eta inflamazioa (Long et al., 2014; Herrera-Vázquez et al., 2016).

Bildutako datu kliniko eta esperimentalek endokannabinoide sistema (EKS) neuroendekapenezko gaixotasunetan itu terapeutiko potentziala izan daitekeela iradokitzen dute, hala nola, epilepsian, Alzheimer gaixotasunean, esklerosi anizkoitzean eta Parkinson gaixotasunean.

Kannabinoideekin eta endokannabinoideekin erlazionatutako hartzailen espresio maila neuronetan eta glia zeluletan aldatu daiteke. Gaixotasun neurologikoetan, endokannabinoideen seinaleztapeneko alterazio kronikoak ematen dira, eta sarritan baita immunitate sisteman ere. Burmuin parenkima inbaditzen duten immunitate zelula jakin batzuk agertuko dira, hartzaille kannabinoideak espresatuko dituztenak (Di Marzo et al., 2015).

Hainbat ikerketek aurkeztutako datuetan, 2 motako hartzaille kannabinoidearen (CB₂) bitartez eragiten duten farmakoak nerbio sistema zentralerako (NSZ) gaitzen kontrako eragile farmakologiko gisa erabili ahalko litekeela iradokitzen da. Azken urtetan, CB₂ hartzaillearekiko afinitatea duten zenbait konposatu sintetiko eta natural berriak aztertzen ari dira NSZeko gaitzen kontrako ohiko farmakoen ordezkio gisa. Hauen artean, seskiterpeno bizikliko natural bat, b-kariofilenoa (BCP), espezieen olio esentzialen (kanela, piperbeltza, oreganoa, iltzea, erromeroa eta ezkaia) eta zenbait landareen ohiko konposatua dena, nagusiki *Cannabis sativa* eta *Copaifera* spp. BCPak CB₂ hartzaillearekiko afinitate handia dauka, eta etorkizun handiko fitokannabinoide dietetikoa kontsideratzen da, azterketa sakonago bat merezi duena. CB₂ hartzaillearen agonista honek alkoholaren adikzioaren ondoriozko inflamazioan, nozizepzioan, depresioan, garun iskemian eta Alzheimer gaixotasunean eragin babesle bat duela aurkitu da. Orain arte argitaratutako ikerketa batzuetan karraskarietan egindako frogetan konbultsioen kontrako ekintza potentziala erakutsi du. Azido kainikoak (AK), glutamato aminoazido kitzikatzaillearen analogo bat dena, oso erabilia izan da estatus EE eragiteko tresna bezala. Saguetan egindako entsegu batean, CB₂ hartzaillearen agonista selektiboak, konbultsio toniko-klonikoak ezabatu zituen eta kainatoak eragindako neurotoxikotasuna eta oxidazio-estres konkomitantea arindu zituen. Honek, CB₂ hartzaillearen aktibazioak EEren ondoriozko konbultsioen hedapenaren aurrean eta oxigenoaren espezie erreaktiboan (Ingelese, Reactive Oxygen Species, ROS) aktibazioaren aurrean babeslea dela iradokitzen du.

CB₂ hartzailleak, ehun periferikoetan eta konkretuki B linfuzitoetan, makrofagoetan, mastozitoetan, *Natural Killer* zeluletan, barean, amigdaletan eta timoan kokatzen dira. Hauen banaketa NSZean gutxiago aztertu da oraindik, baina badirudi bere kokapen nagusia mikroglia zeluletan ematen dela (Tchekalarova et al., 2018).

Mikroglia zelulak garunean kokatzen diren makrofagoak dira, bertako immunitate sistemaren lehenengo erantzuleak. Plastikotasun handidun zelulak dira, fenotipo ezberdinak hartu ditzaketelarik eta programa funtzional ezberdinetan parte hartu, mikroinguruneko seinale espezifiko ezberdinei erantzunez. Mikroglia bi egoeratarako aktibatuta daiteke: M₁, aktibazio fenotipo klasikoa, eta M₂, ordezkio forman aktibatutako fenotipoa. Zehazki, interferoi- γ -rekin edo lipopolisakaridoekin egindako estimulazioak mikroglia M₁ motako fenotipora aktibatzea sustatzen du, inflamazioaren bitartekariak askatuko dituelarik. Hala nola, nekrosi tumoralaren faktore- α (TNF- α) eta 1 β interleuzina (IL-1 β) bezalako zitokinak, kimiozinak, redox molekulak, proteina koestimulatzailleak eta II motako histokonpatibilitate konplexu nagusia. Hauek inflamazioa areagotzen dute, ehun eta zelulei kalteak eraginez. Aldizka, mikroglia M₂ polarizazio egoerara aktibatuta daiteke. Interleuzina-4 (IL-4) eta interleuzina-10 (IL-10) bezalako zitokinek mikroglia M₂ fenotipoa sustatzen dute. Egoera honetako mikroglia inflamazioaren-contrako zitokinak sortzen ditu, hazkuntza faktore bihurgarria beta (TGF- β) eta IL-10 bezala, propietate neurobabesleak dauzkatenak. Inflamazioaren kontrako bitartekari hauek garunaren berreskuratzea sustatuko dute, hondakin zelularren ezabapenez, inflamazio lokala konponduz eta ehunen birmoldaketan parte hartuz.

Mikroglia M₁/M₂ polarizazioa NSZeko hainbat kaltetan behatu da.

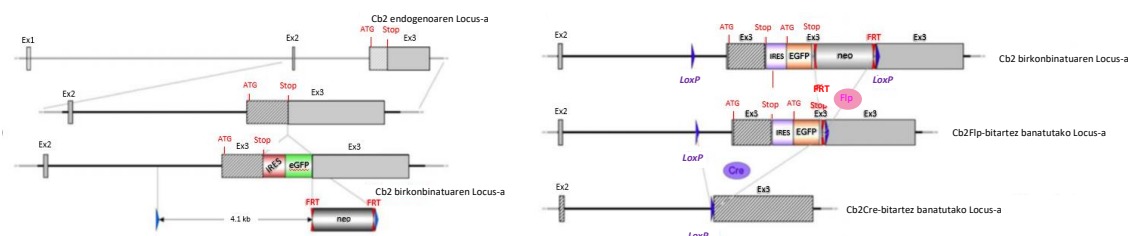
CB₂ hartzaillearen seinaleztapen bideak paper garrantzitsua jokatu du NSZeko kaltean, ekintza

mikroglialaren erregulazioaren bidez. Mikroglia aktiboan espresatzen den CB₂ hartzaileak migrazio mikroglialaren propietateak erregulatzen dituela frogatu da. Gainera, CB₂ hartzailearen estimulazio selektiboak garun lesio egoeran esanguratsuki babesten duela ikusi da eta inflamazioa ezabatu, mikroglialaren M₂ polarizazioa sustatuz. Bestalde, CB₂ hartzailearen espresioa mikroglial bere aktibazio egoeraren menpekoa da nagusiki. Beraz, NSZaren lesio eta kalteetan CB₂ hartzailea ito terapeutiko potentziala izan daiteke. Hala ere, mikroglialaren aktibazio egoera aldatzeak, NSZaren defentsa mekanismo fisiologikoen gabezia eragin dezake, eta zeharkako efektu kaltegarriak agertu daitezke. Izan ere, aktibatzen direnean, mikroglia eta makrofagoak aldibereko aurkako ekintzak dituzte, kalte neurologiko eta babesaren artean. Beraz, polarizatutako mikroglialaren aktibazio egoera eta funtzioa ulertzea ezinbestekoa da inflamazioaren aurrera egitea ebaluatzeko eta tratamendua hobetzeko (Lin et al., 2017).

Bestalde, CB₂ hartzailearen presentzia NSZean eztabaida gaia izan da azken hamarkadan. Entsegu batzuek CB₂ hartzailearen espresioa zegoela adierazten zuten garun osasuntsuko neuronetan, immunohistokimika teknikan oinarrituz batez ere. Beste entsegu batzuek, ordea, CB₂ hartzailearen presentzia NSZean glia zeluletara mugatzen zuten, eta bereziki, mikrogliala. Proposatu zen, beraz, CB₂ hartzailea mikroglia zeluletan espresatzea, eta espresio maila aktibazio zelularren arabera aldatzen zela ikusi zen. Ondorengo entseguek hipotesi hau konfirmatu zuten. Gizaki laginetan, hartzailearen presentzia odol-hodien inguruko mikrogliala mugatzen zen garun osasuntsuetan (kontroletan), baina egoera patologiko ezberdinetan proteina honen espresioa bortizki handitzen zen. Alzheimer gaixotasunean, esklerosi anizkoitzean, Down sindromean eta immunoeskasia birusak eragindako entzefalitisean egindako behaketek, CB₂ hartzailearen presentzia neuroinflamazio eremuetan handituta dagoela adierazten zuten, mikroglial nagusiki. Hala ere, proteina honen kontrako antigorputzen espezifikotasun falta dela eta kezka planteatu dira eta emaitza hauek zalantza jartzen dira. Argi dago CB₂ hartzailearen presentzia gorputz osoan modu garbian egiaztatzeko tresna gehigarriak beharrezkoak direla, NSZean batez ere. Hemen saguen eredu transgeniko bat azaltzen da. Sagu hauetan CB₂ hartzailearen espresioa ikus daiteke zeharkako modu batera (Lopez et al., 2018). CB₂ espresatuko duten zelulek proteina berde fluoreszentea (ingelesez, Green Fluorescent Protein, GFP) espresatuko dute aldi berean. Horrela CB₂ espresatu duten edo espresatzen ari diren zelulak identifikatu ahal izango ditugu. Gainera, CB₂ hartzailea espresatuko ez duten saguak, CB₂ Knock-Out (CB₂-KO) saguak, garatu dituzte ere. Modu honetan, CB₂aren gabezia izateak MTLE prozesuan eragingo dituen aldaketak behatu ditzakegu.

1. irudia. CB₂-KO eta CB₂-GFP sagu eredu transgenikoen eskema

CB₂-GFP saguak GFP espresatzen dute, *cnr2* genearen sustatzailearen kontrolpean, IRES bat txertatuz GFP kodetze eskualdeaz jarraituta, berehala *cnr2* genearen 3' eremuan. Knock-out saguak sortzeko (CB₂ - / -) sagu horiek Cre-errekonbinasa espresatzen zuten saguekin gurutzatu zituzten loxP-eremuaren ezabapena lortuz (Lopez et al., 2018).



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egun ez da epilepsiaren kontrako behin betiko tratamendurik existitzen eta klinikan erabiltzen direnak eragin kaltegarri ugari eta dosifikazio arazoak dauzkate. Hori dela eta, gaixotasun neurologiko honen kontrako tratamendu eraginkorrek topatzeko ito terapeutiko berriak aztertzea beharrezkoa da. EKS epilepsia gaixotasunarentzako ito terapeutiko berri bat bezala proposatu da azken urteetan, eta hau aztertzen duten gero eta ikerketa gehiago daude. CB₁ hartzailari, espresio maila handia duenez NSZan, arreta handia eskaini zaio. Aldiz, CB₂ hartzailak espresio maila oso baxuak dauzka egoera osasuntsu batean NSZean. Gaixotasunean maila hauek handitzen badira ere, aztertze oso zaila izan da, bere identifikaziorako existitzen diren antigorputzak ez direlako espezifikoak. Beraz, zeharreko bide batez baliatu gara, CB₂ hartzailaren espresioarenpean GFP sintetizatzen duten sagu transgenikoak, eta CB₂ hartzaila espresatzen ez duten (CB₂-KO) sagu transgenikoak. Tresna baliotsu hau erabiliz, CB₂ hartzailaren espresioa aztertu nahi dugu MTLE eremuan, eta baita mikroglia ematen diren aldaketa fenotipikoak CB₂ hartzaila espresatzen ez duten saguetan. Ikerketa honen helburu nagusia, CB₂ hartzaila kannabinoideak epilepsiaren ito terapeutiko potentzial gisa izan dezakeen garrantzia ikusirik MTLE eremuan hipokanpoak duen adierazpena sakontasunean aztertzea da.

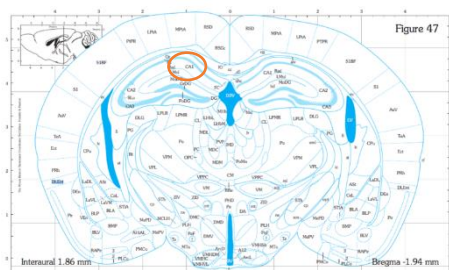
Bestalde, inflamazioa eta epilepsiaren kausalitate erlazioa gero eta gehiago aztertzen ari den fenomeno da. Krisi errepikakorrek inflamazioa eragiten dutela frogatu egin da, eta aldi berean inflamazioak krisi berrien sorrera eta gaixotasunaren okerragotzea eragiten du. Zehazki, gliak jariatutako zitozina proinflamatorioek paper garrantzitsua jokatzen dute krisi epileptikoetan inplikaturako hiperkitzikakortasun neuronalean, eta honekin erlazioatutako kalte zelular eszitotoxikoan (Herrera-Vázquez et al., 2016). Ondorioz, mikroglia epilepsia gaixotasunean aztertze oso zaila izan da, zelula populazio garrantzitsua iruditzen zaigu, honen egoeraren arabera fenotipo proinflamatorioa edo antiinflamatorioa izan dezakeelako. Beraz, beste helburu bat polarizatutako mikroglia aktibazio egoera eta funtzioa ulertzea da, inflamazioaren aurrera egitea ebaluatzeko.

3. Ikerketaren muina

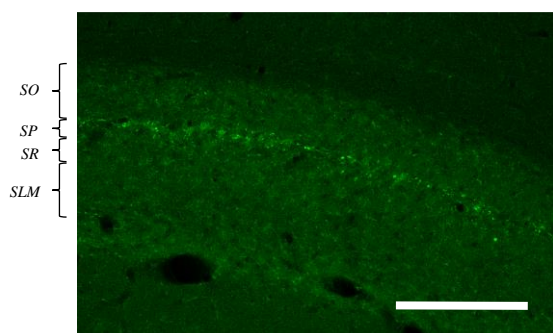
Behin ikerlan honen helburuak aurkeztuta, azaldu beharra dago orain arte aurretiazko ikerketa bakarrik egin dela. Lortutako datuak nahiz eta gutxi izan, etorkizunean ikerketak hartuko duen norabidea zehazteko lagundu digute, eta animalia hauen GFP seinaleztapena, CB₂ hartzailaren espresioaren adierazle dena, non eta nola ematen den ikusteko balioko dute ere.

Bi sagu transgeniko mota ezberdinei (CB₂-GFP eta CB₂-KO) EE indutzeko kirurgia estereotaxiko bidez, 20mM kainato soluziozko 50nl administratu zaie eskumaldeko hipokanpoko (hipokanpo ipsilateral) CA1 eremuan. Bi talde hauen kontrolei, gatz-disoluzioa administratu zaie. Guztira 3 CB₂-GFP animalia kainatoa, eta bi animalia salinoa administratu zaie. CB₂-KO animalien kasuan 2 animalia kainatoa administratu zaie eta 2 animalia salinoa. Saguek pairatzen dituzten krisien balorazioa egiteko Racine-ren eskala eraldatu bat erabili da (Lüttjohann et al., 2009). 15 egun igaro ondoren, perfusio transkardiakoa eginez garunak fixatu dira, ondoren 40µm lodierako koroa-ebakinak lortzeko. Ebakin hauetan, hasteko, GFPren berezko seinalea ikusi dugu, batez ere CA1 eskualdeko zelula piramidalen eremuan kontzentratzen dena. Hau konfirmatzeko mikroskopia optikorako immunoperoxidasa teknika aplikatu dugu GFPa markatuz. Hemen fluoreszentzian ikusitako patroi berdina behatu daiteke.

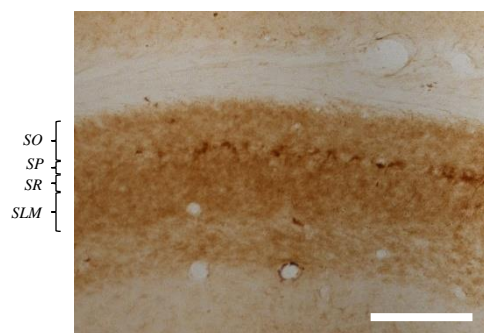
2. irudia. Burutzen den kirurgia estereotaxikoaren itua saguaren koordenatu estereotaxikoaren atlasean, eta horretarako erabiltzen den marko estereotaxikoa eta Nanoject II injektorea (Paxinos G, 2012).



3. irudia. CB2-GFP-sagu baten hipokanpo ipsilateraleko GFP markaketa fluoreszentea CA1 eskualdean. Eskala-barra: 200µm-a. CA1 eremuaren egitura eta eskema. SO, *Stratum oriens*; SP, *Stratum pyramidale*; SR, *Stratum radiatum*; SLM, *Stratum lacunosum-moleculare*.

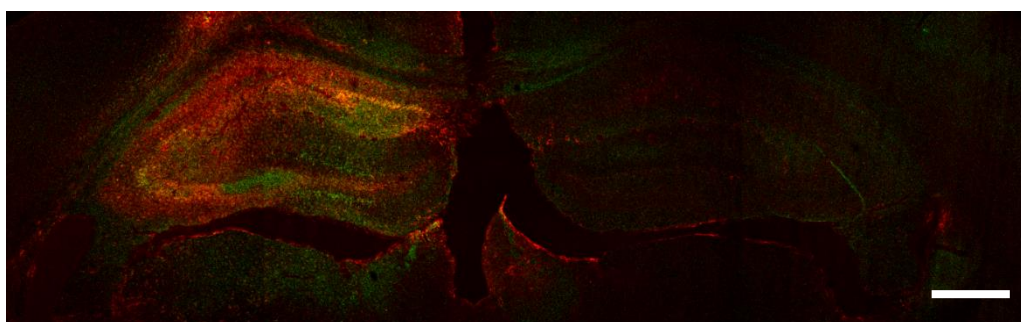


4. irudia. GFPren immunoperoxidasa markaketa CB2-GFP saguaren hipokanpo ipsilateralean. GFPren markaketa fluoreszentearen antzeko markaketa patroia behatu daiteke CA1 eskualdeko zelula piramidaletan zehar. Eskala-barra: 200µm. CA1 eremuaren egitura eta eskema. SO, *Stratum oriens*; SP, *Stratum pyramidale*; SR, *Stratum radiatum*; SLM, *Stratum lacunosum-moleculare*.



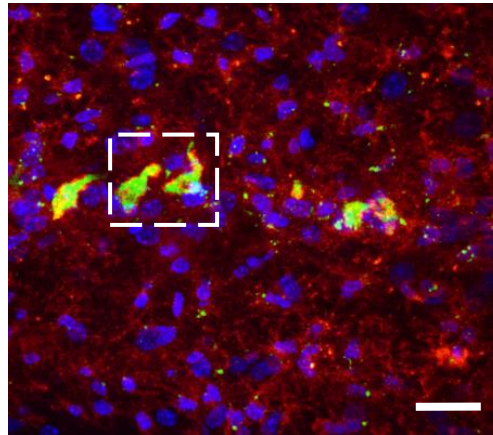
GFPren seinalea (CB₂ hartzailearen espresioaren adierazlea dena) ikusi ondoren, horrek mikrogliaekin duen erlazioa aztertu nahi izan dugu, eta horretarako, mikroglia eta makrofagoen kaltzio-lotura proteina espezifikoa den, ionizatutako kaltzio lotura egokitze proteinaren (Ingelesez, Ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba1) kontrako antigorputza erabili dugu. Aldibereko markaketa gauzatu dugu fluoreszentsia teknikaren bidez, eta mikrogliaen markaketa ematen den eremu bizienetan topatu dugu GFP markaketa.

5. irudia. GFPren (berdea) eta Iba1-en (gorria) markaketa CB2-GFP saguaren hipokanpoan. Alde ipsilateralean bi markaketen handipen bat behatu daiteke hipokanpo kontralateralarekin konparatuz. Markaketa hau ez da agertzen gatz-disoluzioa injektatutako kontrol saguan. Eskala-barra: 500µm



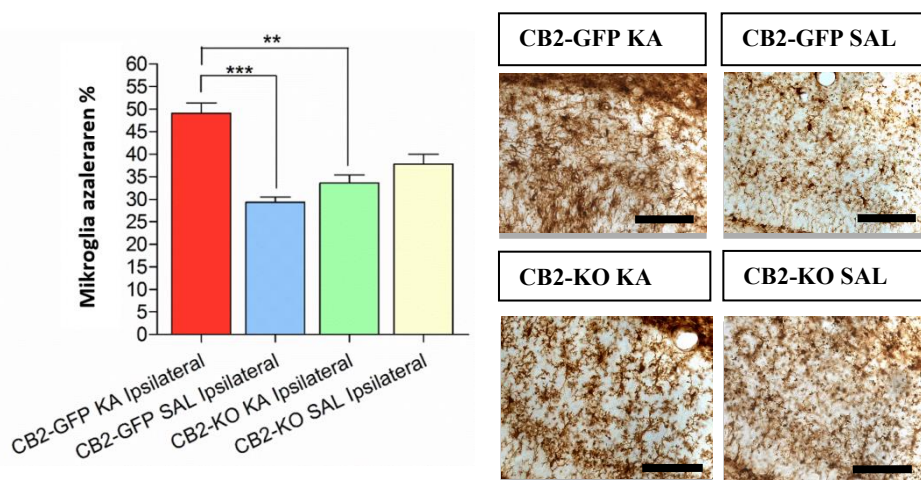
Handipen handiago batekin ikusi nahi izan dugu mikroglia eta GFPren aldibereko markaketa hori, bien banaketa eta kokapena nolakoa den zehazteko asmoz. Badirudi bien kolokalizazio bat dagoela.

6. irudia. GFPren (berdea), Iba1-en (gorria) eta Hoeschen (urdira, nukleoen markatzailea) markaketa CB2-GFP kainato saguaren hipokampo ipsilateraleko CA1 eremuan. Kolokalizazioa dagoela iradokitzen du. Eskala-barra: 25µm



Azkenik, mikroskopia optikorako immunoperoxidasa teknika aplikatuz mikrogliaen markaketa gauzatu dugu, CB2-GFP kainato animalien hipokampo ipsilateralala bere gatzeko-disoluzio animaliarekin konparatzeko, eta baita CB2-KO animalien hipokampo ipsilateralarekin. Horrela kainatoak eragiten duen kaltea eta inflamazioa bi animalia ezberdinetan nolakoa den zenbatetsi dezakegu. Iba1-engatik markatutako mikrogliaen azaleraren analisi estatistikoa egin da hipokampo ipsilateraleko hartz bihurtzeko geruza molekularrean.

7. irudia. Mikrogliaen batz besteko azalera CB2-GFP Kainato (CB2-GFP KA), CB2-GFP gatz-disoluzio (CB2-GFP SAL), CB2-KO Kainato (CB2-KO KA) eta CB2-KO gatz-disoluzio (CB2-KO SAL) saguetan. Batz besteko azalera CB2-GFP kainato saguen hipokampo ipsilateralean esanguratsuki handiagoa da bere kontrol gatzeko-disoluzioarekin konparatuz (** $p < 0.001$). Batz besteko azalera CB2-KO kainato saguen hipokampo ipsilateralean CB2-GFP kainato saguen hipokampo ipsilateralean baino esanguratsuki txikiagoa da (** $p < 0.01$). Kruskal-Wallis-en froga $p < 0,05$ *; $p < 0.01$ **; $p < 0.001$ ***. Eskala-barra: 100µm



Hauek aurretiazko datuak dira, baina ondorengo entseguak bideratzeko oinarria dira.

4. Ondorioak

- Kainatoaz induzitutako estatus epileptikoak CB₂ hartzailearen espresio berria eragiten du CB₂-GFP saguen hipokanpoan. Hartzaile hauek CA1 eta CA2 eremuetako zelula piramidalen zonaldean kokatzen dira batez ere, eta CA3 eremuan eta hilusean neurri baxuago batean. Hau esperotako emaitza da, injekzioa CA1 eremuan ematen delako.
- CB₂ hartzailearen espresioa Iba1-engatik intentsitate handiagoz markatutako mikrogliaekin bat egiten du. Aldaketa mikroglial hauek ez ditugu behatzen gatzezko-disoluzioa injektatutako saguetan.
- Iba1-en immunofluoreszentzia *stratum radiatum* eta *oriensean* zehar behatu daiteke, baina nagusiki zelula piramidalen geruzan kontzentratzen da, CB₂ hartzailearekin kolokalizatzen duela ematen duelarik CB₂-GFP saguetan.
- Mikrogliaaren azalera CB₂-KO saguen hipokanpo ipsilateralean CB₂-GFP saguaren hipokanpo ipsilateralean baino esanguratsuki txikiagoa da kainato injekzioaren ondoren.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

CB₂ hartzailearen presentziak mikroglia duen eragina sakonago aztertu behar dugu. Mikroglia betetzen duen azalera gain, CB₂ hartzailearen presentzia edo gabeziak honen fenotipoan (M1 edo M2) duen eragina aztertu beharra dago, morfologia eta zitokina proinflamatorio eta antiinflamatorioak behatuz. CB₂ hartzailearen agonista selektiboaren administrazioak krisi epileptikoetan eta animalien ondorengo egoera kognitiboan eta anatomikoan duen eragina aztertzea garrantzitsua izango litzateke baita ere. Izan ere, CB₂ hartzailearen agonistak klinikoki eraginkorrak izan litezke EEn tratamendu osagarri gisa oxidazio-estresa, neurotoxizitatea eta asaldura-kognitiboak murrizteko.

6. Erreferentziak

Bhalla D., Chea K., Hun C., Vannareth M., Huc P., Chan S., et al. (2012): Population-based study of epilepsy in Cambodia associated factors, measures of impact, stigma, quality of life, knowledge-attitude-practice, and treatment gap. *PLoS One*;7(10):e46296.

Bhaskaran MD eta Smith BN. (2010): Effects of TRPV1 activation on synaptic excitation in the dentate gyrus of a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*;223(2):529-536.

----- (2010): Cannabinoid-mediated inhibition of recurrent excitatory circuitry in the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *PloS one*;5(5):e10683.

Di Marzo V, Stella N, Zimmer A (2015): Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nature reviews Neuroscience*;16(1):30.

Herrera-Vázquez O, Toledo Rojas A, Fleury A (2016): Neuroinflamación y epilepsia. *TIP.Revista especializada en ciencias químico-biológicas*;19(1):24-31.

Lin L, Yihao T, Zhou F, Yin N, Qiang T, Haowen Z, et al. (2017): Inflammatory regulation by driving microglial M2 polarization: neuroprotective effects of cannabinoid receptor-2 activation in intracerebral hemorrhage. *Frontiers in immunology*;8:112.

Long LL, Song YM, Xu L, Yi F, Long HY, Zhou L, et al. (2014): Aberrant neuronal synaptic connectivity in CA1 area of the hippocampus from pilocarpine-induced epileptic rats observed by fluorogold. *Int J Clin Exp Med*;7(9):2687-2695.

López A, Aparicio N, Pazos MR, Grande MT, Barreda-Manso MA, Benito-Cuesta I, et al. (2018): Cannabinoid CB 2 receptors in the mouse brain: relevance for Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*;15(1):158.

Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaaar G (2009): A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav*;98(5):579-586.

O'Connell BK, Gloss D, Devinsk O (2017): Cannabinoids in treatment-resistant epilepsy: A review. *Epilepsy & Behavior*

Paxinos G (2012). Paxinos and Franklin's The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *Elsevier Academic Press*.

Tchekalarova J, da Conceição Machado K, Júnior ALG, Cavalcante, Ana Amélia de Carvalho Melo, Momchilova A, Tzoneva R (2018): Pharmacological characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene on seizure models in mice. *Seizure*;57:22-26.

Wallace MJ, Blair RE, Falenski KW, Martin BR, DeLorenzo RJ (2003): The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther*;307(1):129-137.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Eusko Jaurlaritzarengatik (BCG IT764-13) eta Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioarengatik MINECO/FEDER (SAF2015-65034-R; SAF2016/75959-R) finantziatuta dago. ITIk Euskal Herriko Unibertsitateko PhD kontratua jaso du (PIF 17/292).

Julian Romero jaunaren ikerketa taldeak eman ditu ikerketa honetarako ezinbestekoak izan diren animaliak.