



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**1 motako kannabinoide hartzaile
(CB₁) 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*

227-233 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.04.28>

ANTOLATZAILEA:



LAGUNTZAILEAK:



1 motako kannabinoide hartzaile (CB₁) astroglialaren adierazpena loki-lobuloko epilepsia eremuan

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}

¹Neurozientziak Saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU)

²Achucarro 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, CB₁ hartzaile astroglialaren espresioan zentratu gara, CB₁ astroglialak zitotoxikotasunean duen eginkizunari buruzko emaitza kontraesankorrak baitaude. Ikerketa honen hipotesiaren arabera, hipokanpoko CB₁ hartzaile astroglialek funtsezko rola betetzen dute epilepsiaren fisiopatologian. Hemen, CB₁ hartzaile astroglialaren hipokanpoko espresioa ikertu dugu azido kainiko LLE animalia-eredu batean.

Hitz gakoak: Epilepsia, Hipokanpo, Astrozito, CB₁, mikroskopia 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 CB₁ receptor in astroglia, as there are conflicting results regarding the role of astroglial CB₁ receptors in excitotoxicity. The hypothesis in this study is that CB₁ receptors localized in astrocytes of the hippocampus play a key role in the pathophysiology of epilepsy. Here, we have investigated the CB₁ receptor astroglial expression in the hippocampus of a kainic acid TLE mouse model.

Keywords: Epilepsy, Hippocampus, Astrocytes, CB₁, 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 herrialdeetako jendea erasan dezake. Munduko Osasun Erakundearen (MOE) datuen arabera, egunero 5 milioi epilepsia kasu berri diagnostikatzen dira munduan. Datu hauek egiaztatzeke ez dugu urrun begiratu beharrik, izan ere, Osakidetza neurologia zerbitzuko kontsulta ohikoena izaten da epilepsia.

Garuneko konputazio neuronalak izaera kitzikatzailerako jardura transmisore bizia behar du. Hala ere, jardura hori gehiegizkoa baldin bada, kalte eta heriotza neuronala eragiten ditu, zitotoxikotasun-mekanismo baten bitartez (Zhang et al., 2015). Kontrolik gabeko neurotransmisio kitzikatzaileraren 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 jeneralizatueta, deskarga epileptikoek garuneko azalera osoari eragiten diote; krisi fokaletan, ordea, deskarga epileptikoak garun-azalaren 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 kitzikatzailerako 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 aktibazioarekin batera, transmisio inhibitzailea areagotuz adibidez (Sugaya eta Kano, 2018). Tamalez, tratamendu horiek askotan LLE-erako erregogorriak 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 ordeztu bide terapeutikoen garapena ahalbidetzeko.

Arestian esan bezala, neurotransmisio kitzikatzailerako kontrol 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 endogenoak (anandamida eta 2-arakidonoilglizerola), haien sintesi, garraio eta degradazio proteinek, eta 1 motako kannabinoide hartzaileak (CB₁) (beste hartzaile batzuk ere badaude, CB₂ kasu). Sistema hau garuneko hainbat funtziotan inplikaturik dago, ahoratzen hasi eta ezagutzaraino doana (Marsicano 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).

CB₁ 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 CB₁ 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 zentralerako (NSZ) populazio zelularrik ugariena dira, horietatik gehienak astrozitoak izanik. Urteetan zehar, astrozitoak NSZren euskarri estrukturalak 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 espezifikoaren bitartez. Glutamatoa NSZren neurotransmisore kitzikatzailerako 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 CB₁ 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, kontrol gabe 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 konbultsiiboak 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 (EMA) oster, 2019ko irailera arte itxaron zuen tratamendu berri honi argi berdea emateko. Epidiolex® botikari esker, gaur egun hurrei eragiten dien bi epilepsia mota, Lennox-Gastaut eta Dravet sindromeak, tratatu daitezke.

Lehengo hariari jarraituz, bistan da neuronen mintzetan kokaturiko CB₁ hartzaileek zitotoxikotasunaren aurka babesten dutela (Marsicano et al, 2003). Ez hori bakarrik, hainbat LLEren animalia-ereduetan CB₁ hartzaile neuronalaren adierazpena kaltetuta ikusten da (Ludányi et al., 2008). Astrozitoen CB₁ hartzaileari dagokionez, astrozitoen glutamato-atzipen tasa kontrolatu dezakela frogatua dago. Alde batetik, Shivachar eta lankideek (2007) arratoi-astrozitoen kultiboetan CB₁ agonistek D-aspartatoaren atzipena inhibitzen dutela ikusi zuten. Bestetik, badirudi CB₁ hartzailearen blokeo farmakologikoak deskarga epileptiformeak murrizten dituela hipokanpoan (Coiret et al., 2012). Hau da, neurona glutamatergikoetan CB₁ 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 kitzikatzaila modu konplexua batean erregulatzen duela iradokitzen dute. Dena den, prozesu zitotoxikoen testuinguruan, literaturan CB₁ astroglialak aminoazido kitzikatzailen 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 fisiopatologian duen rola zehaztu nahi dugu. Ikerketa honen helburua LLEren animalia-eredu batean hipokanpoko bihurtune horzduneko geruza molekularrean (BHGM) CB₁ hartzaile astroglialaren adierazpenean aldaketarik gertatzen den aztertzea da.

3. Ikerketaren muina

Azido kainikoa, glutamato aminoazido kitzikatzailaren 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 aztertzeke, 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 CB₁ hartzailea aztertzeke, mikroskopio elektronikorako erretxinan murgildu-aurreko immunohistokimika bikoitza erabili zen. Metodo horri esker, CB₁ 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 kitzikatzailen garraiatzaile bat da, zelula osoan zehar adierazten dena.

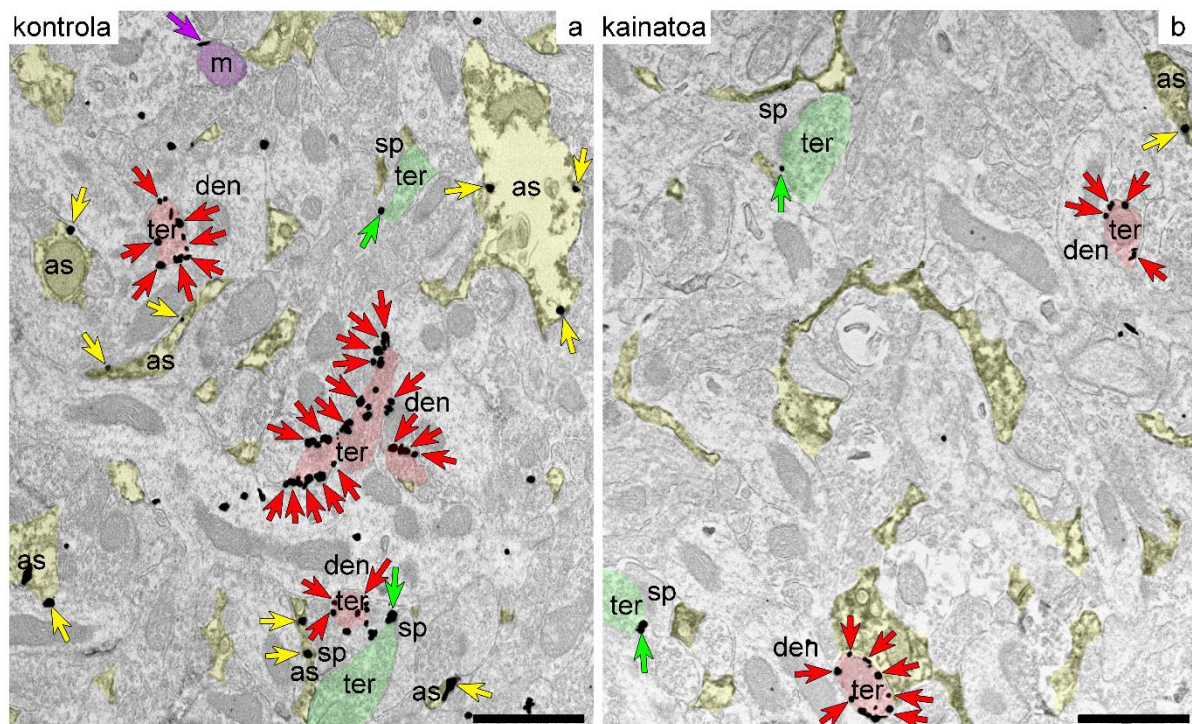
Metodo honetan, CB₁ hartzailearen aurka erabiltzen den bigarren antigorputzak 1,4nmtako urre partikula bat du itsatsia, zilarrez biziagotu ostean ikusarazten dena. Beste era batera esanda, CB₁ hartzailea dagoen tokian, metal partikula bat agertu zen. Astrozitoak aldiz, immunoperoxidasa metodoa erabiliz 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.

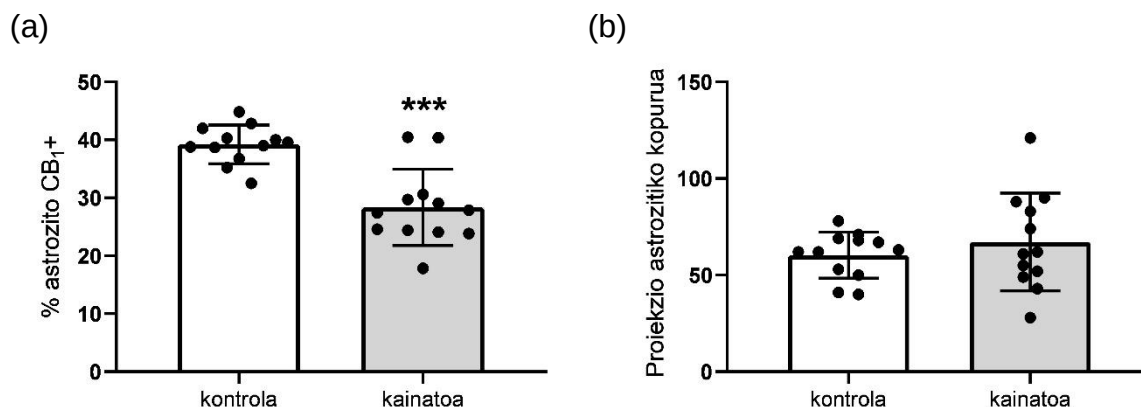
Espero bezala, hipokanpoko BGHM geruzan CB₁ hartzailea neuronetan eta mitokondrioetan ez ezik astrozitoetan ere aurkitu genuen (1. irudia). Azido kainikoaren animalia-ereduan CB₁ hartzaile astroglialaren adierazpenak aldaketarik sufritzen duen zehazteko, ImageJ ordenagailu softwarea erabiliz, hipokanpoko BGHM geruzan CB₁ markatzailerako positiboak eta negatiboak diren astrozito kopurua zenbatu ziren jarraian CB₁ positiboak diren astrozitoen ehunekoa kalkulatzeko. GraphPad software bidez analisi estatistikoa burutu zen (2. irudia).

1. irudia. Mikroskopio elektronikorako erretxinan murgildu-aurreko immunohistokimika bikoitza. CB₁ hartzailearen kokapen azpizelularra bihurtune horzduneko geruza molekularrean: (a) Kontrol taldean, CB₁ hartzailearen markaketa bukaera sinaptiko kitzikatzailetan (ter, gezi berdeak) zein inhibitzaileetan (ter, gezi gorriak), astrozitoetan (as, gezi orriak) eta mitokondrietan (m, gezi moreak) behatu daiteke. (b) Kainato animalia-ereduan CB₁ hartzaileak bukaera sinaptiko kitzikatzailetan (ter, gezi berdeak) eta inhibitzaileetan (ter, gezi gorriak) daude, baina astrozitoetan ez dira hain ugariak (as, gezi orriak). Eskala barrak: 1µm



CB₁ hartzailearen adierazpenaren azterketak, hartzailearekin markatutako astrozitoen proportzioa (kontrolak: % $39,23 \pm 0,96$; kainatoak: % $28,37 \pm 1,90$) (***) $p < 0,001$) kainato animalia-ereduko saguetan nabarmen murriztu zela agerian utzi zuen (2.irudia a). Ultramikrografia bakoitzeko ($290\mu\text{m}^2$) proiektzio astrozitikoen kopuruari dagokionez, ez ziren ezberdintasun adierazgarririk antzeman. Kontrol saguetan $60,33 \pm 3,44$ astrozito/ultramikrografia zenbatu ziren, kainato saguetan, ordea, $67,17 \pm 7,30$ 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) CB₁ positiboak diren astrozitoen ehunekoa. (b) Astrozito kopurua ultramikrografia bakoitzeko (290µm²). 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 CB₁ hartzailearen hipokanpoko adierazpenean aldaketak eragiten ditu. Kainatoa administratu eta aste batera, CB₁ hartzaileekin markatutako astrozitoen proportzioa nabarmen txikiagotu zen. Horrek garrantzi handiagoa hartzen du proiektzio astrozitikoaren kopurua aldatzen ez dela kontuan hartzen badugu. Hemendik, ondorio garbi bat atera dezakegu: CB₁ 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 CB₁ hartzaile astroglialaren aktibazioak eragiten dituen erreakzio anti-inflamatorioei ezker (Metna-Laurent eta Marsicano, 2015). Hortaz, LLEren animalia-ereduan, CB₁ hartzaile astroglialaren gutxiagotzeak astrozitoen erreakzio anti-inflamatorioa urritzea ekarriko luke azido kainikoaren administrazioaren ondoren. Kontuan hartuta azken hamarkadetan hainbat ebidentziek iradoki dutela inflamazio prozesuek epilepsiarekin lotura daukatela (Vezzani et al., 2014), astrozitoen CB₁aren ausentziak deskarga epileptimorfeak areagotuko lituzke azido kainikoa injektatu eta zazpi egunetara.

Argi dago lan honetan lortutako datuekin oso goiz dela CB₁ 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 CB₁ astroglialak LLEn duen rola identifikatzea eta sakontasunean ezagutzea izango da. Izan ere, lan honetan nabarmen geratzen da CB₁ hartzaile astroglialak epilepsien fisiopatologian esku hartzen duela. Astrozitoetan kokaturiko CB₁ 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 CB₁ 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

CB₁ hartzailearen presentziak astroglial duen eragina sakonago ikertu behar dugu. CB₁ positiboak diren astrozitoen ehunekoa kalkulatzear gain, proiektzio astrozitiko hauen azalera eta

morfologia aldaketa aztertuko dugu. Horretaz gain, CB₁ astrozitoaren 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 CB₁ 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., Maglóczy, 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-Rodríguez, 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); JEK doktorearen kontratua (PIC 280/20), eta IBDR doktorearena (BES-2016-076766).