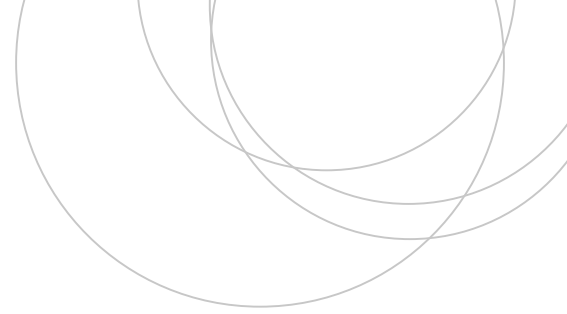




Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea

ZIENTZIA  
ETA TEKNOLOGIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana  
Biologiako Gradua

**CB<sub>1</sub> hartzaile endokannabinoidearen eta  
astrozitoen aldaketak loki-lobuluko epilepsiaren  
animalia-eredu batean**

Egilea:

**Ilazki Anaut Lusar**

Zuzendariak:

**Eider Bilbao Castellanos**

**Izaskun Elezgarai Gabantxo**

© 2020 Ilazki Anaut Lusar

## AURKIBIDEA

LABURPENA .....	2
1. SARRERA .....	3
1.1. Epilepsia .....	3
1.2. Loki-lobuluko epilepsia (LLE) .....	3
1.3. Hipokanpoa eta LLE .....	3
1.4. Sistema endokannabinoidea .....	5
2. HELBURUAK .....	6
3. MATERIAL ETA METODOAK .....	7
3.1. Animaliak .....	7
3.2. Krisi exzitotoxikoen azido kainikoaren (KA) eredua .....	7
3.2.1. KA peritoneo barruko administrazioa .....	7
3.2.2. Krisien larritasunaren neurketa .....	7
3.3. Portaera-probak .....	8
3.3.1. Eremu irekiaren proba .....	8
3.3.2. Gurutze goratuaren labirintoa .....	8
3.3.3. Argi-iluntasun kutxa .....	9
3.3.4. Barnesen labirintoa: memoria- eta estrategia-espazialaren testa .....	9
3.4. Habia egiteko gaitasunaren azterketa .....	10
3.5. Prozedura immunohistokimikoak .....	10
3.5.1. Sagu-burmuin ehunaren kontserbazioa .....	10
3.5.2. Antigorputzak .....	11
3.5.3. Argi mikroskopiarako Avidina-biotima peroxidasa metodoa .....	11
3.6. Datuen analisia .....	12
4. EMAITZAK .....	13
4.1. Racineren eskalaren (RE) ebaluazioa .....	13
4.2. Portaera-probak .....	13
4.2.1. Eremu irekiaren proba .....	13
4.2.2. Gurutze goratuaren labirintoa .....	14
4.2.3. Argi-iluntasun kutxa .....	14
4.2.4. Barnesen labirintoa .....	15
4.3. Habia egiteko gaitasunaren analisia .....	16
4.4. CB <sub>1</sub> hartzailearen immunohistokimika eta dentsitate-aldaketaren neurketa .....	16
4.5. GFAPren immunohistokimika eta astrozitoen analisia .....	18
5. EZTABAIDA .....	20
6. ONDORIOAK .....	21
7. ESKER ONAK .....	21
8. BIBLIOGRAFIA .....	22

## **LABURPENA**

Loki-lobuluko epilepsia (LLE) askotan epilepsiaren aurkako medikamenduekin trataezina den epilepsia partzial mota bat da. LLEn ez-ohiko neurona-jarduera, besteak beste, hipokanpoan gertatzen da. LLEdun pazienteetan oroimen arazoak eta depresioa jasateko probabilitate handia ikusi dira. Horrez gain, endokannabinoide (eKB) sisteman aldaketak aurkezten dituzte, eta astrozitoen hipertrofia eta hiperplasia ere agertzen dituzte. Lan honetan, LLEren animalia-eredu batean aztertu dira hipokanpoaren mendekoak diren antsietatea, oroimena eta habia egiteko gaitasuna, eta hipokanpoan gertatzen diren CB<sub>1</sub> hartzailen adierazpenaren eta astrozitoen aldaketak. Hiru animalia talde konparatu ditugu: kontrolak eta epilepsia-krisi arinak eta larriak izan dituztenak. Hirurekin portaera-probak burutu dira antsietate-maila eta memoria-espaziala aztertzeko, eta euren habiak aztertu dira. Azkenik, argi mikroskopiaren bidez animalien hipokanpoa aztertzeko prozedura immunohistokimikoak burutu dira. Ikusi dugu krisi epileptiko larriak izan dituzten animaliek memoria-espaziala kaltetuta dutela; izan ere, oroimen-proban denbora gehiago behar dute, akats gehiago egiten dituzte eta ez dute bilaketa-estrategiarik garatzen. Maila mikroskopikoan, hipokanpoko CA1 eskualdean, CB<sub>1</sub> hartzaille askoz gutxiago aurkezten dituzte eta astrozitoen hiperplasia eta hipertrofia agertzen dituzte. Emaitzek erakusten dute LLEk oroimen-espazialean eragin kaltegarriak dituela eta, beraz, aztertu daitekeen ezaugarri bat dela LLEk eragindako kalteak detektatzeko. Bestalde, CA1 eskualdean astrozitoen eta CB<sub>1</sub> hartzailen aldaketak sortzen ditu, eta baliteke horiek oroimen-urritasunaren eta krisi epileptikoen larritasun mailarekin erlazionatuta egotea.

## **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 and they are more likely to suffer from depression. Moreover, they usually present alterations in the endocannabinoid (eCB) system as well as astrocytic hypertrophy and hyperplasia. A TLE animal model was used to examine hippocampal dependant behaviours such as anxiety, spatial memory and nesting, and hippocampal changes in the expression of CB<sub>1</sub> receptors and astrocytes. Three animal groups were compared: controls and animals which have suffered mild and severe epileptic seizures. In the three groups behavioral tests were conducted to analyse the degree of anxiety, spatial memory and their nests. Lastly, immunocytochemistry procedures were performed to study the hippocampus at light microscopy. We saw that animals who have suffered severe epileptic seizures have spatial memory impairment as they need more time in the memory test, they make more mistakes and they do not develop any strategy. At microscopic level, in the CA1 hippocampus region there is lower expression of CB<sub>1</sub> receptors and there are astrocytic hypertrophy and hyperplasia. These results demonstrate that TLE impairs spatial memory, thus, it is an analysable feature that can be used to detect the damages caused by TLE. Furthermore, TLE causes changes in the CB<sub>1</sub> receptors and astrocytes from the CA1 region and those alterations might be related to the memory impairment and the severity of the seizures.

## **1. SARRERA**

### **1.1. Epilepsia**

Epilepsia adin guztietako pertsoneri 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 errepikakorrek 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 hainbat eskualdetan gerta daiteke neuronen gehiegizko kitzikapena, loki-lobuluan edo bekoki-lobuluan, kasu. Bestalde, epilepsia-krisiek nahigabeko mugimenduak eragin ditzakete gorputzaren atal batean (partziala) edo gorputz osoan (orokorrak), eta batzuetan, konorte galera eta gernu-maskuriaren edo hesteen kontrolaren galera ere ekar ditzakete. Horrez gain, giharren zurruntasuna edo arreta galera laburrak, nahiz luzaroko konbultsio larriak sor ditzakete. Krisien maiztasuna ere aldakorra da, adibidez, urtean behin gerta daitezke edo hainbat aldiz egunean (Munduko Osasun Erakundea, 2019).

Epilepsiak kausa desberdinak izan ditzake: estrukturala (garuneko lesioak, adibidez), genetikoa (garuneko malformazioak, kasu), infektiosoa (meningitisa, entzefalitisa ...), metabolikoa edo immunologikoa. Hala ere, kasuen %50 ingurutan gaixotasunaren jatorria ezezaguna da. Kasu guztietan, epilepsiak ondorio neurologikoak, kognitiboak, psikologikoak eta sozialak dakartza. Epilepsia jasaten duten pertsonen erdia inguruk bestelako kondizio fisiko edo psikiatrikoak ere pairatzen dituzte. Esaterako, depresioa (%23) eta antsietatea (%20) dira prebalentzia handiena duten nahasmenduak. Umeen kasuan, aldiz, adimen-degaitasuna da ohikoena (%30-40). Horrez gain, epilepsia gaixotasun neuroendekatzailerekin lotuta egoten da (Munduko Osasun Erakundea, 2019). Gaur egun, epilepsia ezin da sendatu, baina krisi epileptikoak medikamentuen bidez kontrola daitezke. Haatik, oraindik ez ditugu ezagutzen gaixotasun honen jatorriaren eta funtzionamenduaren inguruko alderdi asko.

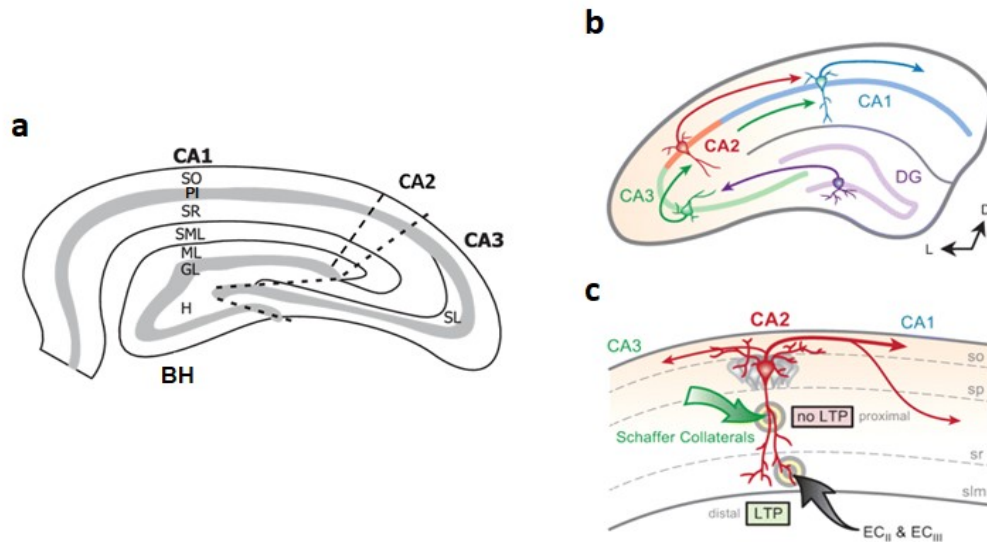
### **1.2. Loki-lobuluko epilepsia**

Lan honetan loki-lobuluko epilepsian (LLE) zentratuko gara. LLE epilepsia partzial mota bat da, maiz epilepsiaren aurkako farmakoekin trataezina dena. Alabaina, kirurgia egiten deneko kasuen artean epilepsia mota ohikoena da, kasuen %50-73 suposatzen baitu (Télliz-Zenteno eta Hernandez-Ronquillo, 2011). LLE gehienek anormaltasun epileptogenikoak loki-lobuluaren erdialdean aurkezten dituzte, hau da, hipokanpoan, amigdalari eta hipokanpo alboko bihurtunean (Engel, 2001). Hipokanpoaren esklerosia (HE) da LLEren etiologia nagusia. Hala ere, ikusi da aurretiko joera genetiko batek ere sor dezakeela asaldura hori. Horrez gain, haurtzaroko lehenengo 4 edo 5 urteetan jasandako garun barneko infekzioek edo garuneko lesioek ere eragin dezakete LLE (Engel, 1996).

### **1.3. Hipokanpoa eta LLE**

Ikerketa honetan hipokanpoan zentratuko gara. Izan ere, arestian azaldu den bezala, LLEn ez-ohiko neurona-jarduera hipokanpoan gertatzen da, besteak beste. Aldi berean, krisiekiko bereziki sentikorra den eremua da ere (Walker, 2015). Gizakietan hipokanpoa loki-lobuluan kokatzen da. Karraskarietan, berriz, paretari kortexaren sakonetik loki kortexaren sakonera zabaltzen da (Knierim, 2015). Gizakian zein

karraskarietan lau eskualde bereizten dira (1a. irudia): *cornu ammonis* (CA) 1, CA2, CA3 eta bihurgune horzduna (BH). Horrez gain, CA1 eskualdean lau geruza bereiz daitezke bizkarraldetik sabelaldera: *stratum oriens*, neurona piramidalen geruza, *stratum radiatum* eta *lacunosum moleculare* geruza. Bihurgune horzdunaren kasuan, aldiz, hiru geruza daude: molekula-geruza, pikor-geruza eta hilusa.



**1. irudia.** Karraskarien garunaren egituraren eta funtzionamenduen irudikapenak: **a)** 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. **b)** Zirkuitu trisinaptikoaren irudikapena: BH (DG) eta bertako pikor-zelulak (CA2) eta bertako piramide-zelulak (CA3) eta CA1 erakusten ditu. **c)** CA2ko piramide-neuronen sinapsiak CA1eko geruzara proiektatzen dira. Caruana eta kideen (2012) lanetik eraldatua.

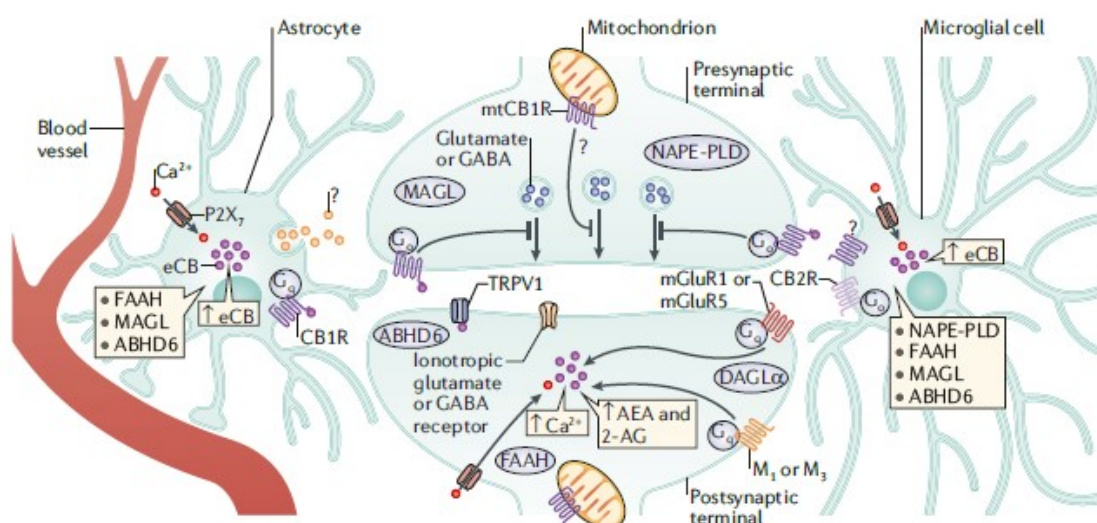
Hipokanpoko eskualde horiek zirkuitu trisinaptikoaren bitartez konektatuta daude (1b. irudia). BHko pikor-zelulak CA3ko piramide-zelulekin sinapsiak eratzen dituzte zuntz goroldiotsuen bidez. Ondoren, CA3ko neuronek CA2ko eta CA1eko neuronekin sinapsiak sortzen dituzte Schaffer albo-zuntzen bitartez. CA2ko neurona piramidalak batik bat CA1eko *stratum oriens* geruzara proiektatzen dira eta CA1eko zelula piramidalen dendritekin sinapsiak eratzen dituzte (1c. irudia). Bestalde, neurri txikiago batean, CA2ko neuronen axoiak CA1eko *stratum radiatum* era ere proiektatzen dira (Caruana et al., 2012). Hipokanpoak oroimen jardueran parte hartzen duen garunaren eskualdea da (Walker, 2015). Lobi-lobuluko kasu batzuetan pazienteek oroimen arazoak aurkeztu dituzte. Adibidez, Butler eta lankideek (2012) ikusi zuten epilepsiak eta hipokanpoaren kalte arinek epe luzera finkatzen den oroimenean eragina dutela. Beste alde batetik, Wilkinson eta lankideen (2012) ikerketak frogatu zuen LLEak ezagutzak berrien eskurapenean eta erretentzioan eragina izan dezakeela ordu bateko denbora tarte laburrean. Gainera, badirudi erretentzio defizit hori hipokanpoko atrofiarekin lotuta dagoela. Horrez gain, emaitzek iradokitzen dute LLE jasaten dutenek zenbait astetan zehar eskuratutako ezagutzak azkarrago ahazten dituztela. Azken kasu horretan, ordea, badirudi epilepsia-krisiak direla epe-luzeko oroimenean finkapenean eragiten dutenak.

LLE pairatzen duten pertsonengan, depresioa jasateko probabilitatea beste epilepsia motetan baino askoz handiagoa da, % 50-60koa delarik (Valente eta Busatto, 2013). Hainbat ikerketek proposatzen dute depresioak eta LLEk garuneko bidezidor berdina partekatzen dutela: sistema linbikoa (Garcia, 2012; Kanner et al., 2012; Valente eta Busatto, 2013). Izan ere, adibidez, erresonantzia magnetiko morfometrikoen (EMM) bidez egindako ikerketa bolumetrikoetan ikusi da depresioa eta LLE duten pazienteetan egitura linbikoen bolumena murriztuta ageri dela. Esaterako, hipokanpoaren kasuan, bi gaitzak pairatzen dituztenetan, alde bietako hipokanpoaren bolumena txikitzen da; LLE soilik jasaten dutenetan, berriz, normalean alde bakarrean murrizten da hipokanpoaren bolumena (Garcia, 2012; Valente eta Busatto, 2013). Hala ere, oraindik ez dago argi zeintzuk diren LLEn eta depresioan parte hartzen duten mekanismoak. Izan ere, orain arte egindako ikerketetan aldakortasun handia egon da laginketa eta metodologian, baita depresioaren eta epilepsiaren diagnosian ere.

#### 1.4. Endokannabinoide sistema

Endokannabinoide (eKB) sistema nerbio-sistema zentrolean (NSZ) zehar banatuta dagoen eta sinapsiaren transmisioaren modulazioan laguntzen duen seinalizazio-sistema konplexua da. Bere jardura oso espezifikoa eta lokalizatua da (Lutz et al., 2015). Garuneko eremu desberdinetan, eKBen seinaleztapenak zelula mota askoren (neuronak, astrozitoak eta mikroglia) jardura hainbat modutan modulatu ditzake. Horrela, sinapsiaren transmisioan testuinguruaren araberako aldaketak sor ditzake, nerbio-jardura egokia bermatuz.

EKB sistema hurrengoez osatuta dago: 1 motako kannabinoide hartzaileak (CB<sub>1</sub>R) eta CB<sub>2</sub>R; horiek kitzikatzeko gai diren lipido endogenoak (eKB), horien artean ezagunenak: anandamida (AEA; arakidonoiletanolamida) eta 2-arakidonoilglizerola (2-AG); eta endokannabinoideen sintesi- eta degradazio-entzimak (2. irudia). 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.



2. irudia. EKB sistemaren osagaiak neuronetan, astrozitoetan eta mikroglia. Lutz eta kideen (2015) lanetik eraldatuta.

NSZeko hartzaile kannabinoide nagusia CB<sub>1</sub>R da. G-proteina bati atxikitutako hartzaile auresinaptikoa da. Jardueraren menpeko sintesia duen 2-AGk aktibatzen du CB<sub>1</sub>R. Bere funtzioa da bukaera auresinaptikoko kaltzio-kanalak inhibitzea eta potasio-kanalen kondukzioa emendatzea, sinapsi transmisioaren atzeranzko kontrolean parte hartuz.

Epilepsiadun pertsonen eKB sisteman aldaketak gertatzen direla ikusi da. Adibidez, ikerketa batean behatu da orain dela gutxi LLE diagnostikatutako pazienteek anandamida-maila baxuagoa dutela likido entzefalorrakideoan (Friendman eta Devinsky, 2015). Horrez gain, ikusi da epilepsiadun pertsonen hipokanpoan 2-AGren sintesi entzima (DAGL $\alpha$ ), CB<sub>1</sub> hartzailearen mRNA eta CB<sub>1</sub> hartzailearen bukaera kitzikatzaileen immunoerreaktibotasuna murrizten direla (Ludanyi et al., 2008, Rosenberg et al., 2015).

Epilepsia-krisietan zehar neuronek jasaten duten gehiegizko kitzikapenak, askotan neurona horien funtzio galera edota zelula heriotza zitotoxikoa dakar. Azido kainikoaren (KA) animalia-eredu batean ikusi da eKBek babes funtzioa betetzen dutela: hipokanpoko CB<sub>1</sub>R auresinaptikoa aktibatzen dute glutamatoaren gehiegizko askapena inhibitzeko eta, horrela, horrek dakarren heriotza zitotoxikoa ekiditeko (Monory et al., 2006, Rosenberg et al., 2017).

Neurona-heriotzak gliosi erreaktiboa eragiten du. Hau da, neuronak kaltetzen diren eskualdeetan, astrozitoen hipertrofia eta hiperplasia gertatzen da. Animalia-eredu batean ikusi da bektore biralen bidez CB<sub>1</sub> hartzailearen adierazpen mailak areagotuz, KAK hipokanpoan eragindako konbultsioen larritasuna eta zelulen heriotza murrizten direla (Guggenhuber et al., 2010, Rosenberg et al., 2015). Beraz, CB<sub>1</sub> hartzaileek krisi epileptikoak kontrolatu eta neuronak ondorengo heriotzatik eta gliosi erreaktibotik babestu ditzakete.

Astrozitoak funtzio estruktural, metaboliko eta homeostatiko anitzetan parte hartzen duten glia zelula mota bat dira. Astrozitoek ere CB<sub>1</sub> hartzaileak aurkezten dituzte eta horien bidez neuronen arteko sinapsian modu aktiboan parte hartzen dute, sinapsi tripartittoa deritzon mekanismoaren bitartez (Navarrete eta Araque, 2008; Perea et al., 2009; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018). Coiret eta lankideek (2012) ikusi dute astrozitoen CB<sub>1</sub> 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. HELBURUAK**

Ikerketa honen helburua, alde batetik, loki-lobuluko epilepsiaren animalia-eredu batean hipokanpoaren mendekoak diren portaeren aldaketak aztertzea da. Horrela, antsietatean, oroimenean eta habia egiteko gaitasunean dituen eraginak neurtuko dira. Beste alde batetik, CB<sub>1</sub> hartzailearen adierazpenean eta astrozitoetan gertatzen diren aldaketak aztertuko dira.

Ikerketa honen hasierako planteamenduan, epilepsia-eredu honetan astrozitoetan CB<sub>1</sub> hartzailearen adierazpenean aldaketarik gertatzen zen ikertu nahi izan genuen. Hala ere, Covid-19aren eraginez, esperimendu horiek eginda badaude ere, ehunak mikroskopio elektronikoan aztertzea ezinezkoa suertatu zaigu, eta beraz, azken atal horren emaitzak falta dira.

### **3. MATERIALA ETA METODOAK**

#### **3.1. Animaliak**

8 asteko 10 C57BL/6j sagu ar heldu (Janvier-labs) erabili ziren esperimentuak egiteko. Saguak banaka gorde ziren plexiglasezko kutxa estandarretan (17 cm x 14,3 cm x 36,3 cm) eta esperimentuak egin baino lehen, gutxienez, aste 1 eduki zuten ingurunera girotzeko. Animaliak esperimentu guztietan zehar egoera estandarretan mantendu ziren, tenperatura konstantea (22 °C) zen gela batean, eta janaria eta ura *ad libitum* izan zutelarik. Saguak 12/12 h argitasun/iluntasun ziklo batean mantendu ziren, 21:00etan iluntasun fasean sartzen zirelarik. Portaera-probak saguen argitasun fasean zehar egin ziren, 9:30etik 15:00etara bitartean.

Esperimentuak Sinapsiaren neuroanatomia funtzional eta ultraestrukturalaren laborategian egin ziren, Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Medikuntza eta Erizaintzako Fakultateko Neurozientziak Sailean. Animaliekin egiten den Esperimentaziorako Etika Batzordeak erabilitako protokolo guztiak onetsi zituen (CEEA/M20/2015/105; CEIAB/M30/2015/106), zeinak bat datozen Europar Batasunaren Kontseiluaren 2010eko irailaren 22ko Zuzentarauarekin (2010/63/UE) eta espainiar erregulazioarekin (53/2013 Errege Dekretua, 2013-02-08ko BOE). Ahalegin guztiak egin ziren animalien mina eta sufrimendua minimizatzeke, bai eta erabilitako animalien kopurua txikiagotzeko ere.

#### **3.2. Krisi exzitotoxikoen azido kainikoaren (KA) eredia:**

Krisi exzitotoxikoen KA eredia asko erabiltzen da LLE eredu gisa. Eredu horrek epileptogenesiaren azpian dauden molekula, zelula eta farmakologia mailako mekanismoak ulertzen lagundu du, LLE duten pazienteetan ikusten diren ezaugarri neuropatologikoak eta elektroentzefalografikoak erakusten baititu (Lévesque eta Avoli, 2013).

##### **3.2.1. Azido kainikoaren (KA) peritoneo barruko administrazioa**

Sagui (N = 10) azido kainikoa (KA) administratu baino lehenago, animaliek beste egokitze-fase bat eduki zuten egoerak eragin zitzakeen estresa eta antsietatea txikitzeko. Egokitze-faseak bi egun iraun zituen. Lehenengo, saguak injektzioak egingo ziren gelara eraman ziren (tenperatura eta aire-fluxua kontrolatuta zeuden bertan) giro berrira ohitzeko. 30 minutu pasa eta gero, guztiei gatz-soluzioa (NaCl 0,9%) peritoneo barrutik injektatu zitzairen. Modu horretan, hartuak izatera eta zitzadara ohi zitezten lortu nahi zen. Animaliak bi orduz utzi ziren gela horretan eta, ondoren, euren jatorrizko gelara eraman ziren.

Hirugarren egunean, prozedura berdina jarraitu zen baina batzuei kainatoa eman zitzairen. Saguak, ausaz, bi taldetan bereizi ziren: kontrol taldea (N = 3) eta KA taldea (N = 7). Kontrol taldeari, aurreko egunetan bezala, soluzio fisiologikoa injektatu zitzaion. KA taldeari, ordea, azido kainikoa (25mg/kg) gatz-soluzioan diluituta eman zitzaion.

Egokitze-fasea zein KAren administrazioa saguen argitasun fasean zehar eta eguneko ordu berean egin ziren.

##### **3.2.2. Krisien larritasunaren neurketa**



Azido kainikoaren administrazioaren hurrengo bi orduetan saguak ebaluatu ziren. Krisien larritasuna 10 minuturo ebaluatu zen Racineren eskala egokitu bat jarraituz (1972). Racinek eskala bat (RE) garatu zuen konbultsioak amigdalaren estimulazio-ereduan ebaluatzeko, konbultsio motorren garapenaren eta elektroentzefalografian (EEG) gertatzen diren aldaketen arteko lotura ezarriz. Gaur egun, RE erabiltzen jarraitzen da, eta maiz epilepsia- eta konbultsio-eredu ezberdinetara moldatzen da (Vinogradova eta van Rijn, 2008; Lüttjohann et al., 2009).

Racineren eskala eraldatuan zazpi intentsitate-maila definitu ziren, animaliek jasandako sintometan oinarrituta: “mugiezintasuna eta begirada finko mantentzea” (1. maila); “buztanaren tentetzea eta aurreko gorputz-adarren klonusa” (2. maila); “altxatzea eta mugimendu errepikakorrak erakustea” (3. maila); “altxatzea eta erortzea” (4. maila); “etengabe altxatzea eta erortzea” (5. maila); “krisi toniko-klonikoak gorputz-jarrera galerarekin, korrika basatia eta saltoak ematea” (6. maila); “heriotza” (7. maila). Animaliek neurketa bakoitzean eskuratutako intentsitate baliorik altuena hartu zen kontuan analisisa egiteko.

Krisien intentsitatearen neurketan zehar, KA jaso zuten 3 sagu hil ziren (hilkortasun-tasa = % 43). Beraz, esperimendua 7 animaliarekin burutu zen azkenean.

### 3.3. Portaera-probak

Portaera-probak 11 asteko saguekin (4 KA eta 3 kontrol) egin ziren. Animaliak zenbaki desberdinekin izendatu ziren bi ikertzaileek azterketak modu itsuan egin zituzten. Animaliak saiakuntzak hasi baino 30 minutu lehenago, tenperatura eta aire-fluxua kontrolatuak zituen gela batean mantendu ziren, girora egoki zitezen. Probak baldintza berdinetan burutu ziren; gela berean, beti ere saguen argi fasean eta denbora-tarte berean. Saiakuntza denak bi behatzailek kontrolatu zituzten eta kronometro bat erabili zuten denbora neurtzeko. Proba guztiak argazki-kamerarekin (Panasonic Lumix) grabatu ziren. Usaimen-aztarnak ekiditeko, materiala EtOH % 70-arekin garbitu ziren saiakuntza bakoitzaren aurretik.

#### 3.3.1. Eremu irekiaren proba

Eremu irekiaren (EI) probaren bidez, karraskarien portaera aztertzen da, haienezko berria den eta bertatik ihes egitea eragozten duten hornez inguratuta dagoen eremu ireki batean aurkitzen direnean (Belzung, 1999). Hainbat faktore neur daitezke, hala nola, esplorazio-sena (kuriostatea), beldurra edo antsietatea, eta mugitze-jarduera (Gould et al., 2009). Kasu honetan, animalien antsietate-maila neurtzeko erabili zen, saguek eremu irekiak higuin baitituzte.



**3. irudia.** Eremu irekiaren probaren egitura.

EI gainerik argizatuta (85 lux) dagoen 50 x 50 x 50 cm-ko egurrezko eremu karratu zuria da (3. irudia). Elren zoru zuria 10 x 10 cm-ko 25 karratu gorritan banatu zen. Saguak eremu irekiaren erdian jarri ziren eta 5 minutuz modu librean mugitzen utzi zitzaizkien. Denbora tarte horretan zehar gurutzatu dituzten karratuen kopurua zenbatu zen. Proba behin egin zen animalia bakoitzarekin.

#### 3.3.2. Gurutze goratuaren labirintoa

Gurutze goratuaren labirintoa (GGL) testa karraskarien hersturaportaerak neurtzeko proba arrunta da (Walf eta Frye, 2007). Izan ere, eremu ireki goratuak ditu, karraskarientzako agente antsigenikoak direnak (Carola et al., 2002).

GGLa parean kokatuta dauden bi beso irekiz (30 x 5 cm, 0,25 cm-ko altuera duten ertzez inguratuta) eta bi beso itxiz (30 x 5 cm, 15 cm-ko altuera duten hormez inguratuta) osatuta dago (4. irudia). Bi beso pareak erdian kokatzen den plataforma (5 x 5 cm) batetik



4. irudia. Gurutze goratuaren labirintoaren egitura.

ateratzen dira, egitura osoak gurutze forma hartzen duelarik. Besoen oinarria, erdiko plataforma eta beso itxien hormak egurrez eginak daude eta gris kolorekoak dira. GGLak 40 cm-ko altuera dauka eta 105 lux-eko argi-iturriak argizatzen du.

Saio bakoitza 5 minututakoa zen eta sagua erdiko plataforman, eta beso irekietako bati begira kokatuta zegoenean hasten zen. Proba bakoitzean hurrengo parametroak neurtu ziren: beso irekia bisitatutako aldiak (BI bisitak) eta beso irekian egondako denbora totala, segundoetan (BI denbora). GGL proba behin egin zen animalia bakoitzarekin.

### 3.3.3. Argi-iluntasun kutxa

Argi-iluntasun kutxaren (A/I) testa karraskarien antsietate-portaerak aztertzeko proba ohikoenetarik bat da. Aurreko testak bezala, A/I proba oinarritzen da saguen argidun lekuekiko abertsioan, eta berria zaien ingurunean azaltzen duten berezko jokaera esploratzailean (Richetto et al., 2019).

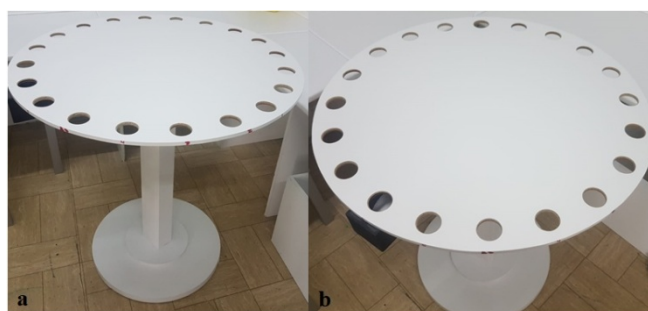


5. irudia. Argi-iluntasun kutxa probaren egitura.

A/Ia haien artean irekigune (5 x 5 cm) baten bitartez konektatuta dauden bi egurrezko kutxez (30 x 30 x 25 cm) osatuta dago. Kutxetako bat beltza da eta estalkia dauka, barnealdea ilunpean geratzen delarik (5. irudia). Beste kutxa, aldiz, zuria da, ez dauka estalkirik eta argi-iturri bat dauka gainean (340 lux). Saguak kutxa argidunaren erdian ipini ziren eta 5 minutuz era librean mugitzen utzi zitzairen. Denbora tarte horretan, ondorengo parametroak neurtu ziren: kutxa ilunera sartzeko behar izan duten denbora (latentzia, segundoetan), argizatutako kutxara ateratako aldiak (bisitak), eta argizatutako kutxan emandako denbora totala (denbora A-n).

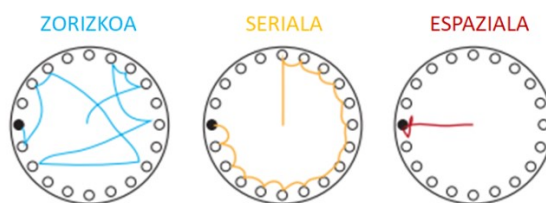
### 3.3.4. Barnesen labirintoa: memoria- eta estrategia- espazialaren testa (BL)

Barnesen labirintoa (BL) saguen oroimen espaziala aztertzeko ingurune lehorreko portaera-proba da (Bach et al., 1995). Oroimen mota hori hipokanpoaren mendekoa da. Saguek ihes-kutxa finko baten eta inguruan kokaturiko ikusmen-seinaleen arteko lotura ikasten dute.



6. irudia. Barnes labirintoaren egitura: a) BL aurretik ikusita eta b) ihes-kutxaren kokapenaren adibide bat.

Rueda-Orozco eta lankideek (2008) deskribatutako BLrako egokitutako protokolo bat erabili zen proba honetan. Horrela, perimetroan zehar 20 zulo banatuta dituen plataforma zirkular goratua erabili zen (6a. irudia). Ihes-kutxa zulo baten azpian finkatu zen eta gainerako 19 zuloak hutsik utzi ziren (6b irudia). Saguek argi distiratsua eta eremu ireki altuak higuin dituztenez, labirintoaren altueraren diseinua eta goiko argiztapen-iturria izan ziren ihesa eragiteko faktore motibatzaileak. Ihes-kutxa eta laguntza bisualak leku berdinean mantendu ziren saiakuntza osoan zehar. 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 (7. irudia).



Eguneroko probetan, bi behatzaile trebatuk kalifikatu zituzten saguek erakutsi zituzten

**7. irudia.** Saguek ihes-kutxa aurkitzeko erabiltzen dituzten 3 bilaketa-estrategia sekuentziak.

bilaketa-estrategiak, eta proba bakoitza burutzeko behar izandako denbora neurtu zuten. Lehenengo, saguek ihes-kutxan kokatu ziren minutu batez. Ondoren, labirintoaren erdian kokatu ziren eta libreki arakaten utzi zitzairen 4 minutuz, ihes-kutxa aurkitu arte. Emaitzak hurrengo moduan kalifikatu ziren: 1) estrategiarik gabe (EG): ihes-kutxa ez zen esplorazioaldian aurkitu; 2) zorizko estrategia (ZE): ihes-kutxa ausazko bilaketa baten ondoren aurkitu zen, hainbat zuloen miaketa eta gero; 3) estrategia seriala (ES): segidan kokaturiko zuloak esploratu ondoren ihes-kutxa aurkitu zen; 4) estrategia espaziala (EE): saguek labirintoaren erditik, ikusmen-pistak baliatuz ihes-kutxa aurkitu zuen. Proba bakoitzean, kutxan sartzeko beharrezkoa izan zitzairen denbora neurtu zen.

### 3.4. Habia egiteko gaitasunaren azterketa

Karraskarietarako habiak oso garrantzitsuak dira gorputz-tenperatura mantentzeko, harrapakarietatik babesteko eta ugalketarako (Deacon, 2006). Habien eraikuntza hipokanpoaren mendekoa da; izan ere, ikusi da hipokanpoko kalteak habia egiteko gaitasuna murrizten duela saguetan (Jirkof, 2014). Hori dela eta, kainatoaren administrazioak jarduera horretan eraginak izan ditzakeen aztertu egin da.

Habien eraikuntzarako erabilitako materiala paperezko zapiak izan ziren. Sagu bakoitzaren (N=7) kutxan zapi bana jarri zen, tolestuta. Habiak azido kainikoaren administrazioaren egunetik egun batera, 4 egunetara eta 10 egunetara aztertu ziren. Aldi bakoitzean, saguek ordura arte erabilitako zapia bildu zen eta berri bat jarri zitzairen. Analisisetan, habia egiterakoan saguek zapietan egin zituzten zuloen azterketa egin da. Argazki-kamera (Panasonic Lumix) eta irudi digitalen analisirako ImageJ programa erabili ziren zapietako zuloen azalerak neurtzeko.

### 3.5. Prozedura immunohistokimikoak

#### 3.5.1. Sagu-burmuin ehunaren kontserbazioa

13 asteko sagu denak (N=7) peritoneo barneko ketamina/xilazina nahasketa baten bidez (80/10mg/kg gorputz-pisua) sakonki anestesiatu ziren.

Bihotzean zeharreko perfusioa egin zen ezkerreko bentrikulutik. Lehenik, gatz fosfato-disoluzio bat pasarazi zen (0.1 M PBS, pH 7.4) giro tenperaturan 20 segundoz, eta, ondoren, hurrengo osagaiak zituen

hoztutako disoluzio finkatzailea pasarazi zen: %4 formaldehidoa (unean paraformaldehidotik despolimerizatua), % 0.2 azido pikrikoa eta %0.1 glutaraldehidoa, dena fosfato-gatzezko disoluzioan disolbatuta (0.1 M PBS, pH 7.4). Gero, garunak kontu handiz garezurretik atera ziren, eta ondoren, aste batez, finkatze-soluzioan murgildu ziren, 4°C-tara mantendu zirelarik. Ondoren, garunak 0.1 M-eko tanpoi fosfatozko (PB) disoluzio finkatzaile diluitu batean (4 °C-tan) biltegitatu ziren, horiek erabili ziren arte. Disoluzio horri % 0.025 sodio azida gehitu zitzaion kontserbaziorako.

### 3.5.2. Antigorputzak

Antigorputz primarioak dagozkien antigorputz sekundarioekin konbinatuta erabili ziren argi mikroskopiarako immunoperoxidasa metodorako (AM). 1. taulan erabilitako antigorputzak azaltzen dira.

**1 Taula.** Argi mikroskopiarako immunoperoxidasa metodoan erabilitako antigorputzak eta horien ezaugarriak.

	Antigorputza	Kontzentrazioa	Fabrikatzailea; espeziea; mota, katalogo zenbakia; RRID
Antigorputz primarioak	Anti-cannabinoid receptor type-1 (CB <sub>1</sub> )	2 µg / ml IHC	Frontier Institute co., ltd; ahuntza, poliklonala; CB1-Go-Af450; AB_2571592
	Anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP)	20 ng/ ml IHC	Sigma-Aldrich; sagua, monoklonala; G3893; AB_257130
Antigorputz sekundarioak	Biotinilatutako saguaren aurkako antigorputza	7,5 µg/ ml ICH	Vector Labs; BA-2000; AB_2313581
	Biotinilatutako ahuntzaren aurkako antigorputza	7,5 µg/ ml ICH	Vector Labs; BA.5000; AB_2336126

### 3.5.3. Argi mikroskopiarako Avidina-Biotina peroxidasa metodoa

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

Protokoloan jarraitutako pausuak hurrengoak dira:

1. Burmuina bibrotomoz egindako 50  $\mu\text{m}$ -ko lodierako koroa-ebaketetan moztu zen (Leica VT 1000s), eta giro tenperaturan (GT) 0.1 M-ko tanpoi fosfatotan (PB, pH 7.4) bildu ziren.
2. Hipokanpo ebakinak aurrez inkubatu ziren blokeo-soluzio batean utzi ziren 30 minutuz GTn: % 10 behi albumina (BSA), % 0.1 sodio azida, eta % 0.5 X-100 tritoi dituen tris-hidrogeno kloruroz bahetutako gatz-disoluzioan (TBS 1X, pH 7,4).
3. Ondoren, ebakinak dagokien antigorputz primarioan inkubatu ziren (1. taula). Blokeo-soluzioan prestatu ziren, eta 2 egunez 4°C-tan emeki mugitzen mantendu ziren, blokeo-soluzioan soilik inkubatutako kontrol negatiboekin.
4. Ehuna hainbat aldiz garbitu zen (30 minutuz), gehiegizko antigorputza kentzeko garbiketa-soluzio bat erabiliz: BSA % 1ean eta X-100 trittoa % 0.5ean, 1X TBStan disolbatuta.
5. Ebakinak garbiketa-soluzioan prestatutako antigorputz sekundario biotinilatuekin inkubatu ziren (1:200) (1. taula), ordubetez GTn, garbitzeko disoluzioan prestatuta, etengabeko mugimendu konstante batean.
6. Berriro ere, ehuna hainbat aldiz garbitu zen garbiketa-soluzioan.
7. Ebakinak avidina-biotina konplexuan (1:50; avidina-biotina peroxidasa konplexua, Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, AEB) inkubatu ziren ordu batez GTn, garbiketa-soluzioan prestatuta.
8. Ehuna hainbat aldiz garbitu zen, lehenik garbiketa-soluzioan, eta azken garbiketak 0.1 M PBa eta % 0.5 X-100 trittoa duen disoluzioa erabiliz egin ziren.
9. Ehunak 5 minutuz inkubatu ziren DABa % 0.05ean, hidrogeno peroxidoa % 0.01ean eta X-100 trittoa % 0.5ean dituen 0.1 M PBtan prestatutako disoluzioan.
10. Ehunak behin baino gehiagotan garbitu ziren X-100 tritoi % 0.5eko proportzioan duen 0.1 M PB disoluzioan.
11. Laginak alde zuzenetik gelatinizatutako portetan muntatu ziren.
12. Ebakinak alkohol gradiente gorakor batean deshidratatu ziren, eta portak graduazio bakoitzean (50°, 70°, 96° eta 100°) 5 minutuz mantendu ziren.
13. Portak xilolez argitu ziren (3 x 5 min).
14. Ebakinak DPXa medio gisa erabiliz estali ziren. Azkenik, laginen argazkiak atera ziren Zeiss AxioCam mikroskopio konposatu batekin, mikroskopiora akoplaturiko Zeiss AxioCamHRc kameraren bidez. Argazkiak ImageJ programaren bidez aztertu ziren. Bertan CA1 eskualdearen eta bihurtune horzdunaren dentsitate optikoak eta astrozitoen azalera neurtu ziren.

### 3.6. Datuen analisia

Emaitzak batezbesteko  $\pm$  S.E.M. moduan adierazi dira software estatistiko pakete bat (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc, San Diego, AEB) erabiliz. Analisi estatistikoak burutu aurretik datuek normalitatea eta homogenizitatea betetzen zuten edo ez egiaztatu zen. Kruskal-Wallis testa erabili zen hiru talde esperimentalen elkarrekintza aztertzeko.  $p < 0,05$  balioak estatistikoki adierazgarritzat jo dira.

## 4. EMAITZAK

### 4.1. REn ebaluazioa

Azido kainiko kantitate berdina (25mg/kg) jaso zuten animaliek intentsitate-maila desberdineko krisiak pairatu zituzten (2. taula). Hori dela eta, eta laborategiko aurretiko beste ikerketa batzuetako esperientzian oinarrituz, animaliak bi taldetan banatu ditugu: Racineren eskalan 3tik beherako krisiak izan dituztenak (RE < 3) eta 3tik gorakoak izan dituztenak (RE > 3). Kontrol animaliek, esperotako moduan, ez zuten inolako krisirik jasan.

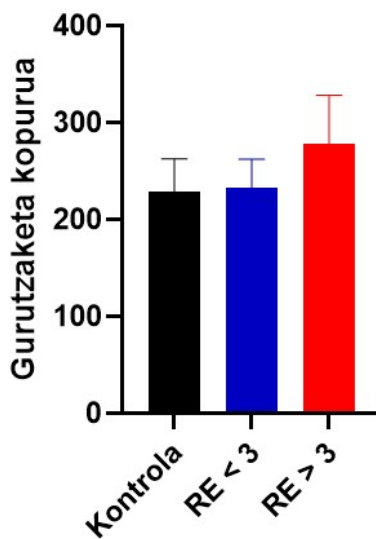
**2 Taula.** Racineren eskalaren (RE) arabera sagu bakoitzak eduki zituen krisien intentsitate-mailarik altuena.

	Kontrolak			Kainatoak			
REn eskuratutako intentsitate-mailarik altuena	0	0	0	2	0	6	6
Talde berriak	Kontrolak			RE < 3		RE > 3	

### 4.2. Portaera-probak

KAre neurotoxikotasunak eragiten dituen aldaketa morfologikoen ondorioak izan ditzakete portaeran, hala nola antsietatean edota prozesu kognitiboetan.

#### 4.2.1. Eremu irekiaren proba

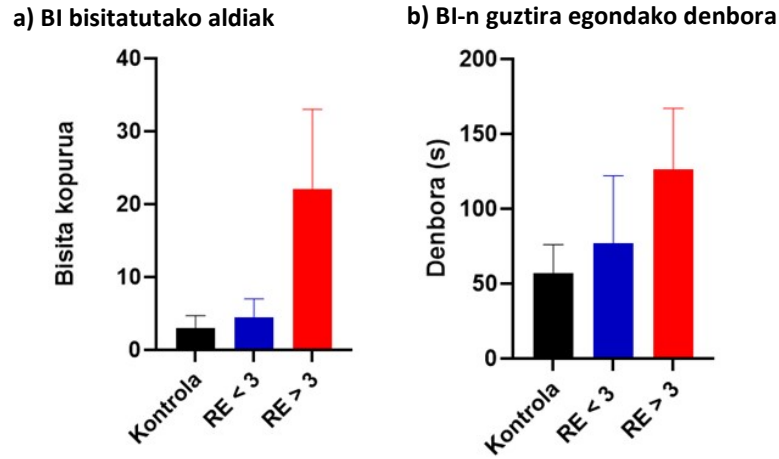


**8. irudia.** Eremu irekiaren emaitzen grafikoa: zoruko karratuak gurutzatutako aldien neurketa. Kruskal-Wallis testa.  $p > 0,05$ .

Antsietate-mailari dagokionez, ez da desberdintasun esanguratsurik behatu taldeen artean (8. irudia). Hots, hiru taldeek gurutzaketa kopuru berdintsuak eta denbora berdintsua igaro dute kaxaren paretetan

eredu irekiaren proban; talde ezberdinetan antsietate-maila berdinak izan direla iradokitzen duelarik ( $p > 0,05$ ).

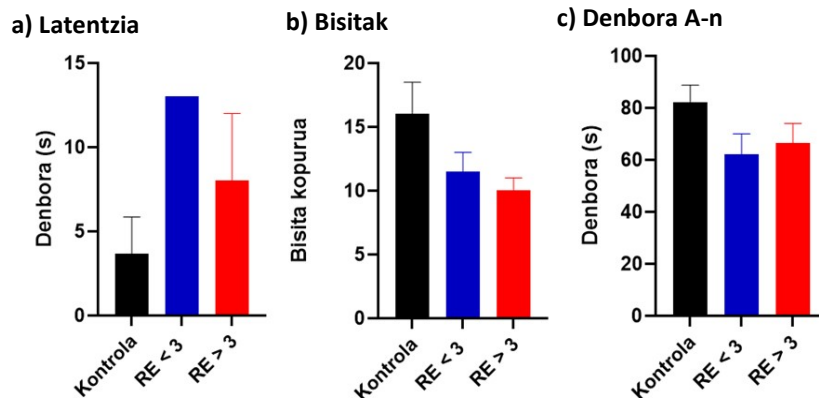
#### 4.2.2. Gurutze goratuaren labirintoa



**9. irudia.** Gurutze goratuaren labirintoaren emaitzen grafikoak: a) Beso irekia bisitatutako aldiak eta b) beso irekian osotara igarotako denbora (s). Kruskal-Wallis testa.  $p > 0,05$ .

Taldeen artean ez da ezberdintasun adierazgarriarik ikusi ez beso irekia bisitatutako aldietan, ez eta bertan egondako denboran ere (9. irudia). Grafikoetan ikusten denez, RE > 3 taldeak beso irekiak bisitzeko, bai eta horietan denbora gehiago igarotzeko tendentzia bat erakusten duen arren, desberdintasunak ez dira esanguratsuak izan eta beraz, guzti horrek aditzera ematen du proba honetan animalia taldeen antsietate-mailan ez dela desberdintasun adierazgarriarik egon ( $p > 0,05$ ). Batez besteko ezberdinak aurkezten dituzten arren, lagina txikia denez, estatistikak ez du desberdintasun esanguratsurik adierazi.

#### 4.2.3. Argi-iluntasun kutxa

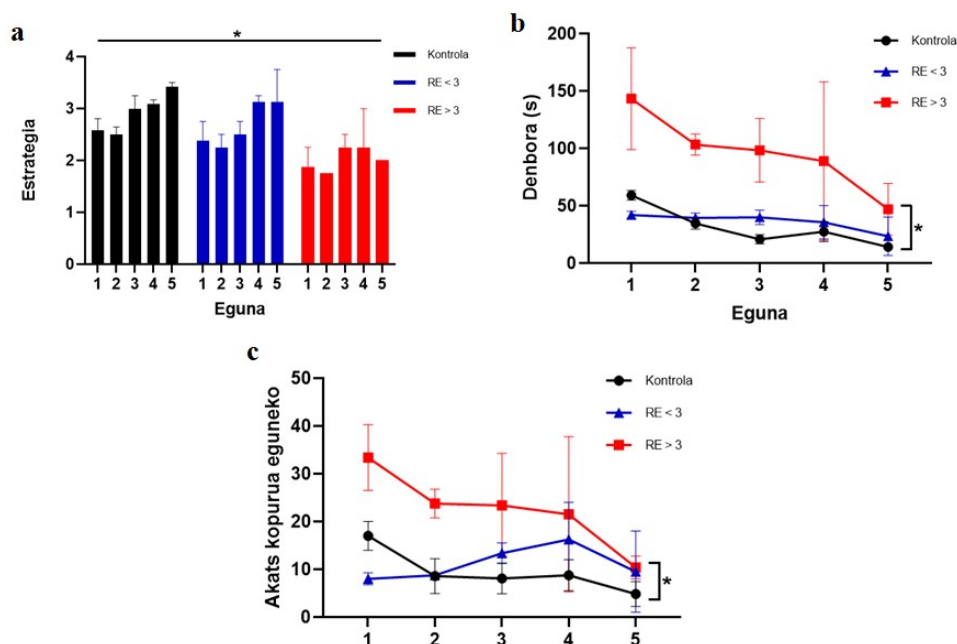


**10. irudia.** Argi-iluntasun kutxaren emaitzen grafikoak: a) Latentzia-denbora (s), b) argitasun kutxa bisitatutako aldiak eta c) argitasun kutxan osotara egondako denbora (s). Kruskal-Wallis testa.  $p > 0,05$ .

Proba honetan ere ez da desberdintasun esangarriarik behatu animalia taldeen artean (10. irudia). Hau da, hiru taldeen artean latentzia-denboran, bisita kopuruan eta argitasun kutxan egondako denboran

ezberdintasunak egon arren, ez dira adierazgarriak lagin tamaina txikia delako. Beraz, animalien antsietate-mailan ez da desberdintasun esangarririk egon ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.4. Barnesen labirintoa



**11. irudia.** Barnes labirintoaren emaitzen grafikoak: a) egun bakoitzean erabilitako bilaketa-estrategia: 1) estrategiarik gabe, 2) zorizkoa, 3) seriala eta 4) espaziala; b) egun bakoitzean ihes-kutxa aurkitzeko behar izandako denbora; eta c) egun bakoitzean ihes-kutxa aurkitu arte egundako akatsak. Kruskal-Wallis testa. \*  $p < 0,05$

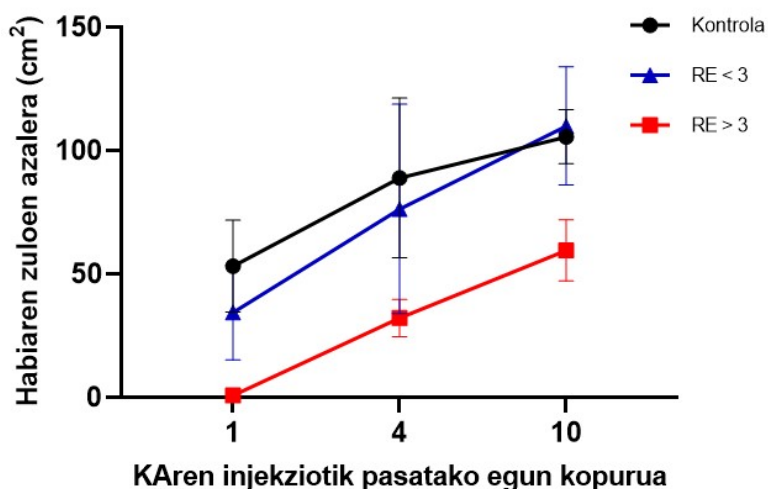
BL proban, sagu taldeek erakutsitako oroimen-espazialaren estrategian desberdintasun adierazgarriak behatu dira ( $p = 0,032$ ) (11a. irudia). Izan ere, kontrolak ( $2,917 \pm 0,1687$ ) eta RE > 3 kainatoek ( $2,025 \pm 0,10$ ) batez beste erabilitako estrategien artean alde nabaria dago ( $p = 0,012$ ). Kontrolen eta RE < 3 kainatoen eta bi KA taldeen arteko desberdintasunak, aldiz, ez dira esangarriak ( $p > 0,05$ ). Ihes-kutxa aurkitzeko behar izandako denboran ere ezberdintasun esanguratsuak ikusi ahal dira ( $p = 0,0035$ ) (11b. irudia). Kontrolak, batez beste, RE > 3 kainatoek baino hiru aldiz denbora gutxiago behar izan dute ihes-kutxa aurkitzeko,  $31, 33 \pm 7,762$  eta  $96,23 \pm 15,42$  segundo eguneko hurrenez hurren ( $p = 0,0112$ ). RE < 3 kainatoek kontrolen antzeko denbora behar izan badute ere ( $36,18 \pm 3,331$  segundo eguneko), bi KA taldeen arteko desberdintasunak ez dira adierazgarriak ( $p > 0,05$ ). Kontrolen eta RE < 3-en arteko desberdintasunak ez dira esangarriak ( $p > 0,05$ ).

Akatsei dagokienez, kasu honetan ere desberdintasun esangarria dago taldeen artean ( $p = 0,0123$ ) (11c. irudia). Kontrolak ( $9,45 \pm 2,018$  akats eguneko) RE > 3 kainatoek ( $22,48 \pm 3,665$ ) baino bi aldiz akats gutxiago egin dituzte eguneko ( $p = 0,0239$ ). Kontrolen eta RE < 3 kainatoen eta bi KA taldeen arteko desberdintasunak ez dira esangarriak ( $p > 0,05$ ).

Emaitza horiek aditzera ematen dute krisi larriak izan dituzten saguek memoria-espaziala kaltetuta dutela, oro har ihes-kutxa zoriz aurkitzen baitute. Kontrolak eta RE < 3 kainatoek, berriz, memoria-espaziala daukate ihes-kutxa non kokatzen den ikasten dute eta.



### 4.3. Habia egiteko gaitasunaren analisia



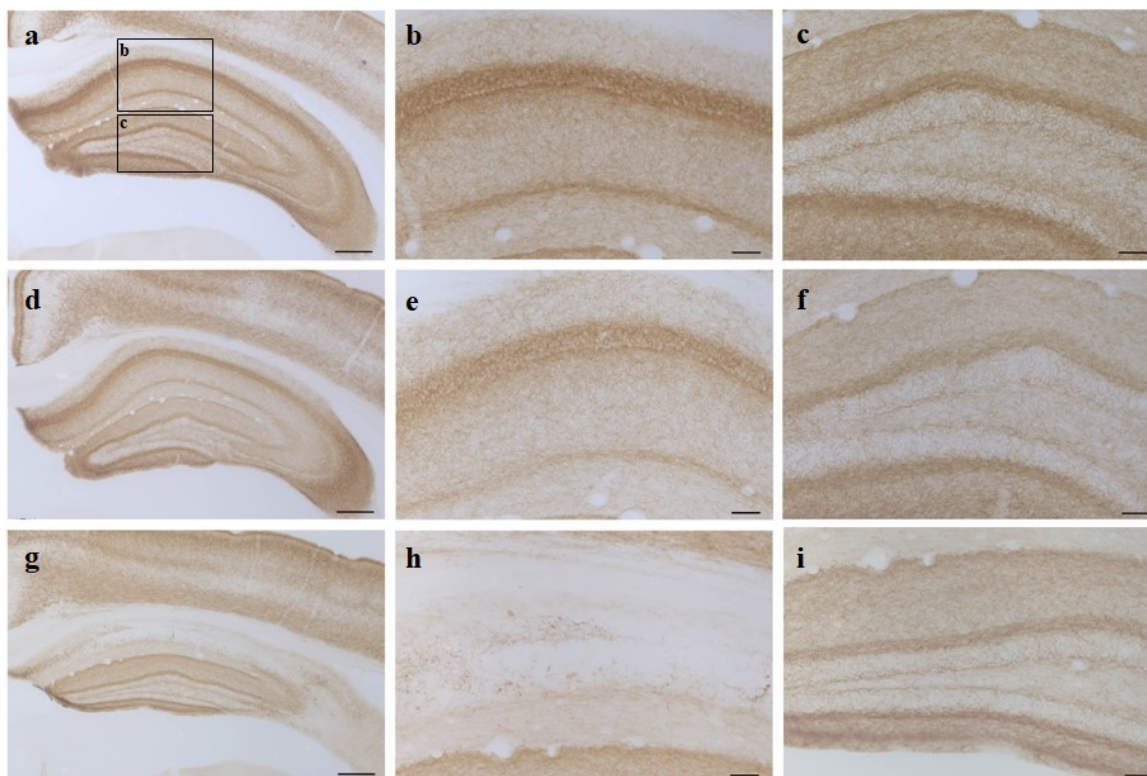
12. irudia. Habian egindako zuloen azaleraren neurketa kainatoaren injekzioetik egun batera, 4 egunetara eta 10 egunetara. Kruskal-Wallis testa.  $p > 0,05$ .

Habia egiteko gaitasunari dagokionez, ez da ezberdintasun adierazgarririk behatu taldeen artean ( $p > 0,05$ ) (12. Irudia). Kainatoak animalien joakeran eragin nabarmenak izan baditu ere, ezberdintasunak ez dira esanguratsuak. Hala ere, aipagarria da KAren injekzioetik egun batera RE > 3 kainatoek ez dutela zapia ukitu, jasandako krisietatik suspertzeko denbora behar dutela adierazten duelarik.

### 4.4. CB<sub>1</sub> hartzailearen immunohistokimika eta dentsitate-aldaketaren neurketa

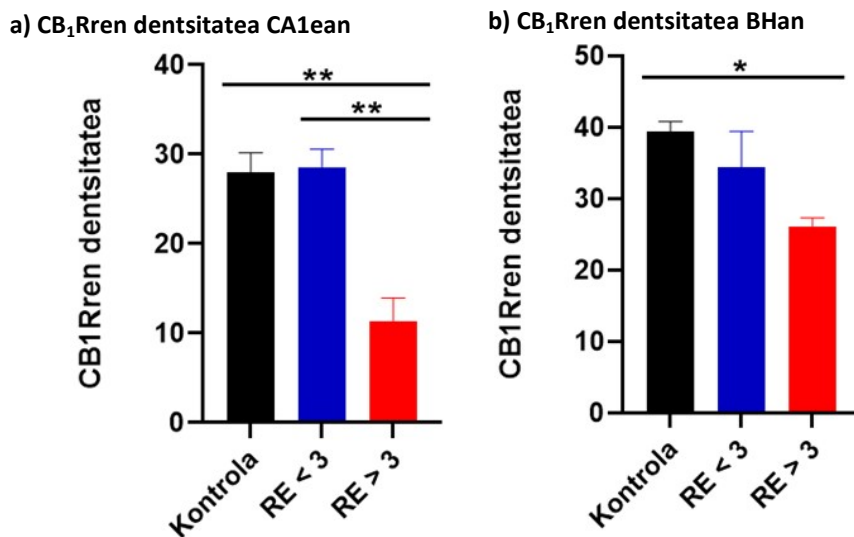
CB<sub>1</sub> hartzailearen immunotindaketa argi mikroskopiaren bidez aztertu da (13. irudia). Espero zen bezala CB<sub>1</sub> hartzailearen immunotindaketa hipokanpoaren eskualde eta geruza gehienetan ageri da. Markaketa nabarmenena *Cornu Ammonis* (CA) eremuaren piramide-geruzaren inguruetan, *stratum radiatum*-ean eta *oriens*-ean eta bihurgune horzduneko molekula-geruzan agertzen da tratatu gabeko animalietan. Tindaketa horren erantzule nagusia bukaera sinaptiko inhibitzaileetan duen adierazpena bada ere, ezin dugu ahaztu bukaera kitzikatzaileetan, astrozitoetan eta mitokondrietan duen kokapena (Benard et al., 2012; Etienne Hebert-Chatelain et al., 2016; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018). Desberdintasun nabarmenak ikus daitezke RE > 3 kainatoen hipokanpoaren CA1 eskualdean, non tindaketa askoz ere eskasagoa den (13g. eta 13h. irudiak). Piramide-zelulen geruza ia guztiz desagertu da, eta zaila da *stratum oriens* eta *stratum radiatum* desberdintzea (14h. irudia). Bihurgune horzduneari ere tindaketa argiagoa da, molekula-geruzan batez ere (14i. irudia). Hala ere, CA1 eskualdean ikus daitezke ezberdintasun handienak.

RE < 3 kainatoek, gatz-serumekoekin alderatuz, tindaketa argiagoa aurkezten dute ere, baina desberdintasunak ez dira horren nabariak (13d.-13f. irudiak).



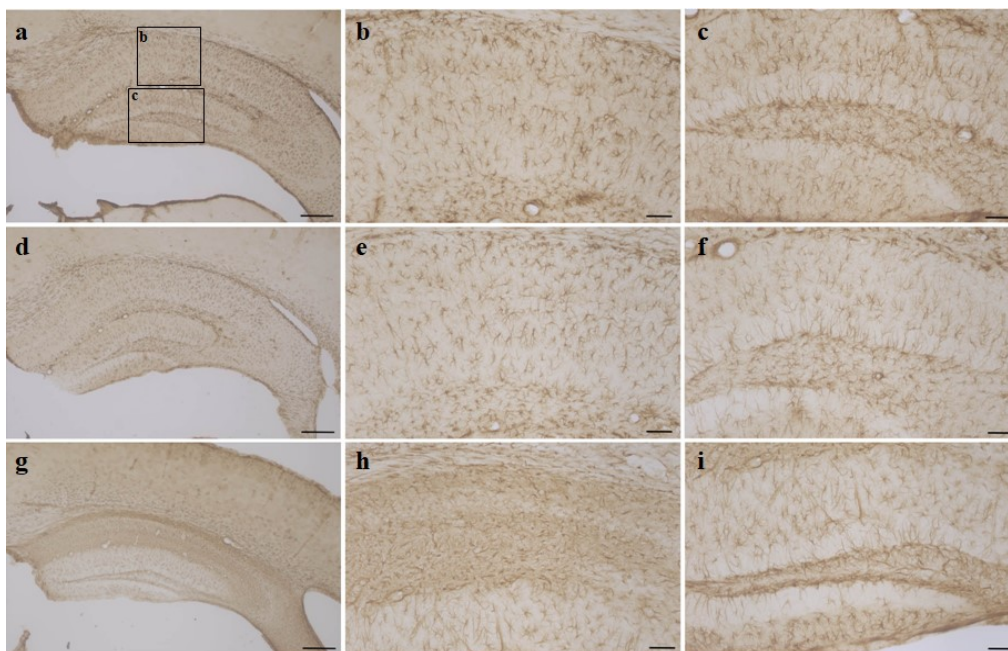
**13. irudia.** CB<sub>1</sub> hartzailearen immunotindaketa sagu talde desberdinen burmuinean: a-c kontrola (gatz-seruma), d-f RE < 3 kainatoa eta g-i RE > 3 kainatoa. **a, d, g:** CB<sub>1</sub>Rren immunotindaketa hipokampo osoan. **b, e, h:** immunotindaketa CA1 eskualdean. **c, f, i:** immunotindaketa bihurgune horzdunean. Eskala barrak: 1000 µm a, d eta g-n; 200 µm gainerakoetan.

CA1 eskualdean, CB<sub>1</sub> hartzailearen dentsitate optikoari dagokionez, ezberdintasun esangarriak behatu dira animalia taldeen artean ( $p = 0,0084$  eta  $p = 0,0064$  hurrenez hurren) (14a. irudia). Izan ere, kontrolatan ( $27,93 \pm 2,24$ ) eta RE < 3 kainatoetan ( $28,52 \pm 2,056$ ) CB<sub>1</sub>Rren dentsitatea RE > 3 kainatoen ( $11,37 \pm 2,569$ ) dentsitatearen ia hirukoitza da. Bihurgune horzdunean ere desberdintasun adierazgarriak ikusi dira ( $p = 0,0358$ ), baina kasu horretan soilik kontrolen ( $39,35 \pm 1,455$ ) eta RE > 3 kainatoen ( $26,07 \pm 1,23$ ) artean (14b. irudia). Desberdintasun horiek guztiak erakusten dute REan 3tik gorako ezaugarriak azaleratzen dituzten animaliek CB<sub>1</sub> hartzailean aldaketa bortitzak erakusten dituztela KA aplikatu eta hilabetera. Kainato kantitate berdina jaso duten baina RE 3tik beherako ezaugarriak agertu dituzten animaliek, aldiz, esanguratsuak ez diren aldaketak jasan dituzte CB<sub>1</sub>aren adierazpenean.



**14. irudia.** CB<sub>1</sub> hartzailaren dentsitate optikoaren neurketaren emaitzen grafikoak: a) CB<sub>1</sub>R dentsitatea 26 μm<sup>2</sup>-ko, CA1 eskualdean eta b) CB<sub>1</sub>R dentsitatea 12,5 μm<sup>2</sup>-ko, bihurgune horzdunean (BH). Kruskal-Wallis testa. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

#### 4.5. GFAPren immunohistokimika eta astrozitoen analisisia

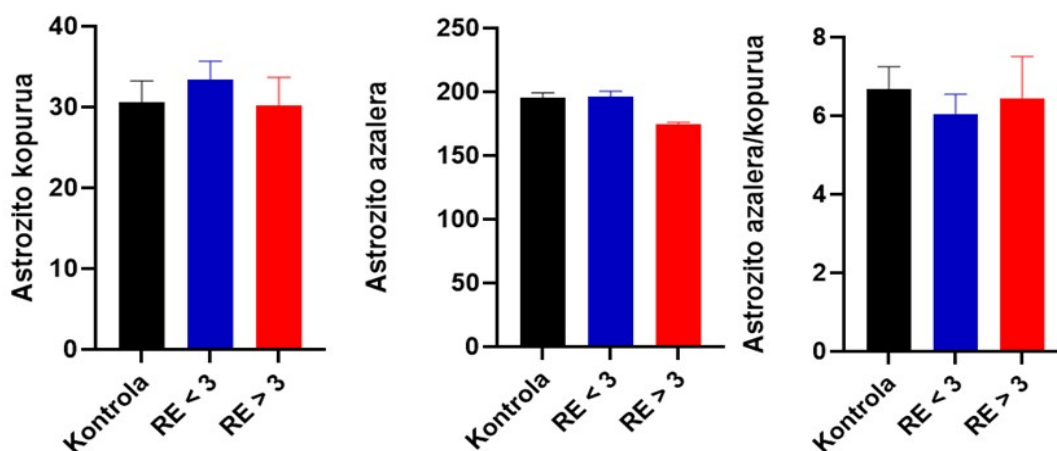


**15. irudia.** GFAPren immunotindaketa sagu talde desberdinen burmuinean: a-c kontrola (gatz-seruma), d-f RE < 3 kainatoa eta g-i RE > 3 kainatoa. **a, d, g:** GFAPren immunotindaketa hipokanpo osoan. **b, e, h:** immunotindaketa CA1 eskualdean. **c, f, i:** immunotindaketa bihurgune horzdunean. Eskala barrak: 1000 μm a, d eta g-n; 200 μm gainerakoetan.

Astrozitoen GFAPren immunotindaketa argi mikroskopiaren bidez aztertu da (15. irudia). Kontrolak eta RE < 3 kainatoek antzeko tindaketa erakusten dute (15a. eta 15d. irudiak). Bi taldeetan astrozitoek forma eta antolamendu berdintsuak dituzte bai CA1ean baita bihurgune horzdunean ere (15a.-15f. irudiak). Alabaina, RE > 3 kainatoetan astrozitoak desitxuratuta agertzen dira, CA1ean batik bat (15h. irudia). Izan ere, zaila da zelula horien bereizgarria den izar itxura antzematea. Horrez gain, ez dute aurreko bi taldeetan ikus daitekeen antolamendua erakusten. Bihurgune horzdunean GFAP tindaketa argiagoa dela ikus daiteke, baina desberdintasunak ez dira CA1ean bezain begi-bistakoak (15i. irudia).

Beraz, horrek guztiak iradokitzen du krisi epileptiko larriek astrozitoen morfologian eta antolamenduan aldaketak eragin dituztela, behintzat CA1 eskualdean.

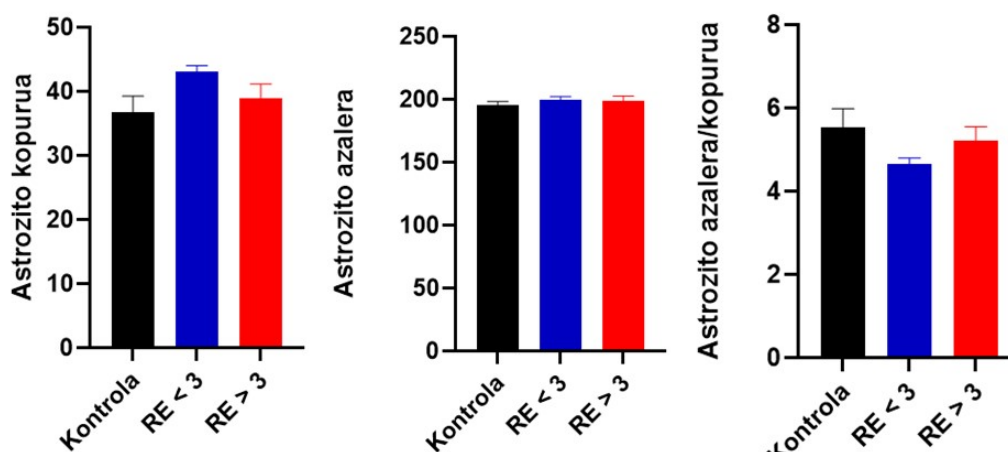
a) Astrozito kopurua CA1ean      b) Astrozito azalera CA1ean      c) Astrozito azalera/kopurua CA1ean



16. irudia. Astrozitoen analisiak CA1ean: a) astrozito kopurua  $22,5 \mu\text{m}^2$ -ko; b) astrozito azalera  $22,5 \mu\text{m}^2$ -ko. eta c) Astrozitoen azalera/kopurua  $22,5 \mu\text{m}^2$ -ko azaleran. Kruskal-Wallis testa.  $p > 0,05$ .

Astrozito kopuruari dagokionez (16a. irudia), ez da desberdintasun esanguratsurik behatu hiru taldeen artean CA1 eskualdean ( $p > 0,05$ ). Hau da, hirurek astrozito kopuru berdintsuak aurkezten dituzte. Astrozito azaleraren kasuan ere ezberdintasunak ez dira esangarriak ( $p > 0,05$ ) (16b. irudia). Azkenik, astrozito azalera astrozito kopuruarengatik zatitzerakoan, hiru taldeek balio berdintsuak aurkezten dituzte ( $p > 0,05$ ) (16c. irudia). Beraz, astrozitoen kopuruari eta azalerari dagokienez, ez dago ezberdintasun nabarmenik hiru taldeen artean CA1 eskualdean.

a) Astrozito kopurua BHan      b) Astrozito azalera BHan      c) Astrozito azalera/kopurua BHan



17. irudia. Astrozitoen analisiak bihurgune horzdunean (BH): a) astrozito kopurua  $22,5 \mu\text{m}^2$ -ko; b) astrozito azalera  $22,5 \mu\text{m}^2$ -ko; eta c) astrozito azalera/kopurua  $22,5 \mu\text{m}^2$ -ko azaleran. Kruskal-Wallis testa.  $p > 0,05$ .

Bihurgune horzdunean, CA1ean bezala, ez da desberdintasun adierazgarririk behatu astrozito kopuruan hiru taldeen artean ( $p > 0,05$ ) (17a. irudia). Hau da, hiru taldeetan astrozito kopuru berdintsua dago  $22 \mu\text{m}^2$ -ko. Astrozito azalera ere berdintsua da kontrol eta kainatoetan ( $p > 0,05$ ) (17b. irudia). Azkenik, astrozito azalera astrozito kopuruagatik zatitzean ere ez da ezberdintasun esangarririk behatu, hirurek

antzeko balioak aurkezten dituztelarik ( $p > 0,05$ ) (17c. irudia). Hortaz, bihurgune horzdunean ere ez dago ezberdintasun adierazgarri astrozitoei dagokienez.

## 5. EZTABAIDA

Gradu amaierako lan honetan epilepsia-krisiek hipokanpoan eta hipokanpoaren mendekoak diren portaeretan duten eragina aztertu dira. Alde batetik, emaitzek frogatu dute REn 3tik gorako epilepsia-krisiak izan dituzten animaliek oroimen-espaziala kaltetuta dutela. REn 3tik beherako epilepsia-krisiak izan dituztenek, berriz, kontrol taldearen antzeko abilezia aurkeztu dute. Beraz, ondoriozta dezakegu krisi epileptiko larriek oroimen-espazialean eragin kaltegarriak dituztela. Beste alde batetik, epilepsia-krisi larriek KAren administratziotik hilabete batera, hipokanpoaren egituraren aldaketak eragin dituztela ikusi dugu. Gure erudian CA1 eskualdean gertatu dira aldaketa nabariak. Bertan, CB<sub>1</sub> hartzaileren immunotindaketa eta dentsitate optikoa askoz urriagoa da RE > 3 kainatoetan. Horrek geruzen desegituraketa eta zelulen heriotza gertatu direla iradokitzen du. Alabaina, hori beste tindaketa moten bidez sakonago aztertu beharko da. Astrozitoen kasuan, nahiz eta analisi estatistikoek ez duten ezberdintasun esangarririk adierazi, argi mikroskopiaren bidez ikusi dugu CA1 eskualdean zelula horiek bestelako itxura eta antolamendua erakusten dituztela, gliosi erreaktiboa gertatu dela iradokitzen dutelarik. Hortaz, ondoriozta dezakegu krisi epileptiko larriek KAaren injekzioetik hilabete batera eKB sisteman eta astrozitoetan aldaketa handiak eragiten dituztela hipokanpoan.

Hala ere, ikerketak zenbait muga izan ditu. Izan ere, erabilitako lagina (N = 7) oso txikia izan da. Beraz, etorkizuneko ikerketetan, epilepsia-krisien eraginak zehaztasun handiagoarekin aztertu ahal izateko lagin handiagoa erabili beharko litzateke.

Aurretik egindako beste ikerketa batzuek ere frogatu dute LLEk memoria-espazialean urritasuna eragiten duela. Animalia-ereduekin (Chauvière et al., 2009; Kalemenev et al., 2015) nahiz gizakiekin egindako ikerketetan (Amlerova et al., 2013) ikusi da. Hori dela eta, oroimen-espazialaren azterketa baliagarria izan liteke epilepsia eragindako kalteak detektatzeko.

Oroimen-espazialaren galera CA1ean ikusitako CB<sub>1</sub> hartzaileren desagerpenaren ondorio izan daiteke. Izan ere, hainbat ikerketek erakutsi dute eKB sistemak ikaskuntza- eta oroimen-prozesuetan parte hartzen duela. Esaterako, alzheimer gaixotasunaren animalia-ereduekin egindako ikerketa batean ikusi da CB<sub>1</sub> hartzailera adierazten ez duten saguek ikasketa- eta oroimen-urritasun handiagoak dituztela (Stumm et al., 2013). Bestalde, 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). Hala ere, eKB sistemak ezagutzan duen eginkizun fisiologikoa ez dago oso argi oraindik. Izan ere, sistema neuromodulatuzailea denez, ezagutzan parte hartzen duten garuneko eremuetan jarduera espezifiko eta lokalizatua izango du eta, beraz, mekanismo desberdinak aurkeztuko ditu.

Horrez gain, zenbait ikerketek frogatu dute astrozito-seinalizazioak oroimen-prozesuetan parte hartzen duela. Adibidez, astrozitoen CB<sub>1</sub> hartzaileren delezioak identifikazio-oroimena kaltetzen duela ikusi da (Santello et al., 2019). Gainera, frogatu da marihuanak eragiten duen lan-oroimenaren galera astrogliako

CB<sub>1</sub> hartzaillearen aktibazioaren ondorioz gertatzen dela (Han et al., 2012). Hortaz, posiblea liteke astrozitoak gure ikerketan ikusi dugun oroimen-espazialaren galeraren erantzuleak izatea.

Beste alde batetik, lan honetan ikusitako CB<sub>1</sub> hartzaileren galera zelulen heriotza zitotoxikoarekin eta horrek dakarren gliosi erreaktiboarekin ere egon daiteke lotuta. Izan ere, CB<sub>1</sub> hartzailleek glutamatoaren homeostasia kontrolatzen dute (Fernandez-Ruiz et al., 2015). Glutamatoa neurotransmisore kitzikatzailea da eta horren gehiegizko askapenak N-metil-D-aspartato (NMDA) hartzaileren bidezko kaltzio sarrera eragiten du. Horrek zelula barnean ur-jauzi zitotoxikoa eragiten du, azkenean zelulen heriotza dakarrena.

Glutamatoak, beste neurotransmisoreen artean, hipokanpoko astrozitoak aktibatzen ditu (Perea et al., 2009). Aktibazioak astrozito barruan kaltzio-igoera eragiten du eta horrek, aldi berean, hainbat molekula neuroaktiboen, glutamatoa edo D-serina adibidez, askapena eragiten du (gliotransmisioa). Astrozitoen glutamato askapenak NMDA hartzaille postsinaptikoak aktibatzen ditu eta hipokanpoko neurona piramidalak kitzikatzen ditu, neurona-kitzikaberatasuna eta sinapsi-korrante kitzikatzaileen maiztasuna emendatzen dituelarik. Beraz, epilepsiaren testuinguruan, astrozitoetan gertatzen diren aldaketek bere biziko garrantzia izan dezakete epileptogenesiaren garapenean.

Azken urteotan, kannabinoideetan oinarritutako epilepsiaren aurkako terapien inguruko ikerketa asko egin dira, eta ikusi da tratamendu eraginkorra izan daitekeela. Hala ere, ikerketa gehienak neuronetan jarri dute arreta. Astrozitoek prozesu horietan duten parte hartzea, ordea, garrantzitsua izan liteke. Hori dela eta, etorkizunean astrozitoen eta CB<sub>1</sub> hartzaileren artean dagoen lotura aztertu behar da. Horrela, epilepsian duten eginkizuna ezagutu ahalko dugu, eta eragin ditzaketen kalteak tratatzeko medikamendu eraginkorragoak garatu.

## **6. ONDORIOAK**

Erabilitako LLEren animalia-ereduaren hipokanpoan eta hipokanpoaren mendekoak diren portaeretan ikusitako aldaketak ikusita hurrengo ondoriozta dezakegu:

1. Kainatoak antsietate-mailan eragiten dituen ezberdintasunak ez dira esanguratsuak.
2. Krisi epileptiko larriak izan dituzten saguek oroimen-espazialean kalteak jasan dituzte.
3. Kainatoak animalien habia egiteko gaitasunean eragin nabarmenak izan baditu ere, ezberdintasunak ez dira esanguratsuak.
4. Epilepsia-krisi larriak izan dituzten saguek CB<sub>1</sub> hartzaileren adierazpen askoz txikiagoa erakusten dute CA1 eskualdean.
5. Krisi epileptiko larriak izan dituzten animaliek astrozitoen morfologia aldaketa aurkezten dute CA1 eskualdean.

## **7. ESKER ONAK**

Lehenik eta behin, eskerrik asko Pedro Grandesen laborategiko kideei eskainitako laguntzagatik. Bereziki Izaskun Elezgarairi irakatsitako guztiagatik eta Jon Egañari, Itziar Terradillosi eta Leire Lekunberriri esperimenduekin laguntzeagatik. Bestalde, eskerrik asko Eider Bilbaori lana berrikusteagatik eta egindako iradokizunengatik.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Amlerova, J., Laczko, J., Vlcek, K., Javurkova, A., Andel, R., & Marusic, P. (2013). Risk factors for spatial memory impairment in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 26 (1), 57-60. doi: 10.1016/j.yebeh.2012.10.025.
- Bach M.E., Hawkins R.D., Osman M., Kandel E.R., & Mayford M. (1995): Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal Itp in the range of the  $\theta$  frequency. *Cell*. 81: 905-915. doi: 10.1016/0092-8674(95)90010-1.
- Belzung, C. (1999). .11 Measuring rodent exploratory behavior. In *Techniques in the behavioral and neural sciences* (Vol. 13, pp. 738-749). Elsevier.
- Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., Soria-Gómez, E., ... & Hebert-Chatelain, E. (2012). Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature neuroscience*, 15 (4), 558. doi: 10.1038/nn.3053.
- Butler, C., Kapur, N., Zeman, A., Weller, R., & Connelly, A. (2012). Epilepsy-related long-term amnesia: anatomical perspectives. *Neuropsychologia*, 50 (13), 2973-2980. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2012.07.027.
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural brain research*, 134 (1-2), 49-57. doi: 10.1016/s0166-4328(01)00452-1.
- Chauviere, L., Rafrafi, N., Thinus-Blanc, C., Bartolomei, F., Esclapez, M., & Bernard, C. (2009). Early deficits in spatial memory and theta rhythm in experimental temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 29 (17), 5402-5410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4699-08.2009.
- Deacon, R. M. (2006). Assessing nest building in mice. *Nature protocols*, 1 (3), 1117. doi: 10.1038/nprot.2006.170.
- Caruana, D. A., Alexander, G. M., & Dudek, S. M. (2012). New insights into the regulation of synaptic plasticity from an unexpected place: hippocampal area CA2. *Learning & memory*, 19 (9), 391-400. doi: 10.1101/lm.025304.111.
- Coiret, G., Ster, J., Grewe, B., Wendling, F., Helmchen, F., Gerber, U., & Benquet, P. (2012). Neuron to astrocyte communication via cannabinoid receptors is necessary for sustained epileptiform activity in rat hippocampus. *PLoS One*, 7 (5). doi: 10.1371/journal.pone.0037320.
- Engel Jr, J. (1996). Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*, 26 (1), 141-150. doi: 10.1016/s0920-1211(96)00043-5.
- Engel Jr, J. (2001). Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned?. *The neuroscientist*, 7 (4), 340-352. doi: 10.1177/107385840100700410.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., ... & Hesdorffer, D. C. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55 (4), 475-482. doi: 10.1111/epi.12550.



- Guggenhuber, S., Monory, K., Lutz, B., & Klugmann, M. (2010). AAV vector-mediated overexpression of CB1 cannabinoid receptor in pyramidal neurons of the hippocampus protects against seizure-induced excitotoxicity. *PLoS one*, 5 (12). doi: 10.1371/journal.pone.0015707
- Gutiérrez-Rodríguez, A., Puente, N., Elezgarai, I., Ruehle, S., Lutz, B., Reguero, L., ... & Grandes, P. (2017). Anatomical characterization of the cannabinoid CB1 receptor in cell-type-specific mutant mouse rescue models. *Journal of Comparative Neurology*, 525 (2), 302-318. doi: 10.1002/cne.24066
- Gutiérrez-Rodríguez, A., Bonilla-Del Río, I., Puente, N., Gómez-Urquijo, S. M., Fontaine, C. J., Egaña-Huguet, J., ... & Soria-Gómez, E. (2018). Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus. *Glia*, 66 (7), 1417-1431. doi: 10.1002/glia.23314.
- Fernández-Ruiz, J., Moro, M. A., & Martínez-Orgado, J. (2015). Cannabinoids in neurodegenerative disorders and stroke/brain trauma: from preclinical models to clinical applications. *Neurotherapeutics*, 12 (4), 793-806. doi: 10.1007/s13311-015-0381-7.
- Friedman, D., & Devinsky, O. (2015). Cannabinoids in the treatment of epilepsy. *New England Journal of Medicine*, 373 (11), 1048-1058. doi: 10.1056/NEJMr1407304.
- Garcia, C. S. (2012). Depression in temporal lobe epilepsy: a review of prevalence, clinical features, and management considerations. *Epilepsy research and treatment*, 2012. doi: 10.1155/2012/809843.
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. In *Mood and anxiety related phenotypes in mice* (pp. 1-20). Humana Press, Totowa, NJ. doi: 10.1007/978-1-60761-303-9\_1.
- Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Xu, L., Georges, F., ... & Liu, Q. (2012). Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*, 148 (5), 1039-1050. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.037.
- Hebert-Chatelain, E., Desprez, T., Serrat, R., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Busquets-Garcia, A., ... & Varilh, M. (2016). A cannabinoid link between mitochondria and memory. *Nature*, 539 (7630), 555-559. doi: 10.1038/nature20127.
- Jiang, M., & Swann, J. W. (1997). Expression of calretinin in diverse neuronal populations during development of rat hippocampus. *Neuroscience*, 81 (4), 1137-1154. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00231-5.
- Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of neuroscience methods*, 234, 139-146. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.02.001.
- Kalemenev, S. V., Zubareva, O. E., Frolova, E. V., Sizov, V. V., Lavrentyeva, V. V., Lukomskaya, N. Y., ... & Magazanik, L. G. (2015, July). Impairment of exploratory behavior and spatial memory in adolescent rats in lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Doklady Biological Sciences* (Vol. 463, No. 1, pp. 175-177). Pleiades Publishing. doi: 10.1134/S0012496615040055.
- Kanner, A. M., Schachter, S. C., Barry, J. J., Hersdorffer, D. C., Mula, M., Trimble, M., ... & Ryvlin, P. (2012). Depression and epilepsy: epidemiologic and neurobiologic perspectives that may



- explain their high comorbid occurrence. *Epilepsy & Behavior*, *24* (2), 156-168. doi: 10.1016/j.yebeh.2012.01.007.
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, *25* (23), R1116-R1121. doi: 10.1016/j.cub.2015.10.049.
- Lévesque, M., & Avoli, M. (2013). The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *37* (10), 2887-2899. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.10.011.
- Ludányi, A., Erőss, L., Czirják, S., Vajda, J., Halász, P., Watanabe, M., ... & 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. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4465-07.2008.
- Lüttjohann A., Fabene P.F., & van Luijtelaaar G. (2009): A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & Behavior*. *98* (5): 579-586. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.09.005.
- Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R., & Hillard, C. J. (2015). The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nature Reviews Neuroscience*, *16* (12), 705-718. doi: 10.1038/nrn4036.
- Monory, K., Massa, F., Egertová, M., Eder, M., Blaudzun, H., Westenbroek, R., ... & Long, J. (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*, *51* (4), 455-466. doi: 10.1016/j.neuron.2006.07.006.
- Navarrete, M., & Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, *57* (6), 883-893. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.029.
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences*, *32* (8), 421-431. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.001.
- Puighermanal, E., Busquets-Garcia, A., Maldonado, R., & 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. doi: 10.1098/rstb.2011.0384.
- Racine, R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, *32* (3), 281-294. doi: 10.1016/0013-4694(72)90177-0.
- Richetto, J., Polesel, M., & Weber-Stadlbauer, U. (2019). Effects of light and dark phase testing on the investigation of behavioural paradigms in mice: relevance for behavioural neuroscience. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *178*, 19-29. doi: 10.1016/j.pbb.2018.05.011.
- Rosenberg, E. C., Tsien, R. W., Whalley, B. J., & Devinsky, O. (2015). Cannabinoids and epilepsy. *Neurotherapeutics*, *12* (4), 747-768. doi: 10.1007/s13311-015-0375-5.
- Rosenberg, E. C., Patra, P. H., & Whalley, B. J. (2017). Therapeutic effects of cannabinoids in animal models of seizures, epilepsy, epileptogenesis, and epilepsy-related neuroprotection. *Epilepsy & Behavior*, *70*, 319-327. doi: 10.1016/j.yebeh.2016.11.006.

- Rueda-Orozco P.E., Soria-Gomez E., Montes-Rodriguez C.J., Martínez-Vargas M., Galicia O., Navarro L., & Prospero-García O. (2008): A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology*, 198, 565-576. doi: 10.1007/s00213-007-0911-z.
- Santello, M., Toni, N., & Volterra, A. (2019). Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nature neuroscience*, 22 (2), 154-166. doi: 10.1038/s41593-018-0325-8.
- Stumm, C., Hiebel, C., Hanstein, R., Purrio, M., Nagel, H., Conrad, A., ... & 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. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.027.
- Téllez-Zenteno, J. F., & Hernández-Ronquillo, L. (2012). A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research and treatment*, 2012. doi: 10.1155/2012/630853.
- Valente, K. D., & Busatto Filho, G. (2013). Depression and temporal lobe epilepsy represent an epiphenomenon sharing similar neural networks: clinical and brain structural evidences. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 71 (3), 183-190. doi: 10.1590/S0004-282X2013000200011.
- Vinogradova L.V. & van Rijn C.M. (2008): Anticonvulsive and antiepileptogenic effects of levetiracetam in the audiogenic-kindling model. *Epilepsia*. 49: 1160-8. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01594.x.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, 2(2), 322-328. doi: 10.1038/nprot.2007.44.
- Walker, M. C. (2015). Hippocampal sclerosis: causes and prevention. *Seminars in neurology* (Vol. 35, No. 03, pp. 193-200). Thieme Medical Publishers. doi: 10.1055/s-0035-1552618.
- Wilkinson, H., Holdstock, J. S., Baker, G., Herbert, A., Clague, F., & Downes, J. J. (2012). Long-term accelerated forgetting of verbal and non-verbal information in temporal lobe epilepsy. *Cortex*, 48 (3), 317-332. doi: 10.1016/j.cortex.2011.01.002.
- World Health Organization. (2019). *Epilepsy: a public health imperative: summary* (No. WHO/MSD/MER/19.2). World Health Organization.