

**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIA**

**“PAPEL DEL ASTROCITO EN LA INTEGRACIÓN SINÁPTICA DE
NEURONAS PIRAMIDALES CA1 EN UN MODELO MURINO DE
EPILEPTOGÉNESIS”**

AGUILAR HERNÁNDEZ FREDDY ERNESTO

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Director de Tesis:



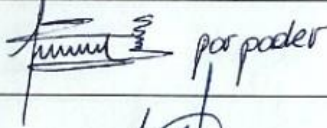

Dr. Christian Bonansco

Universidad de Valparaíso

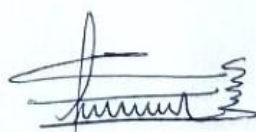
Año 2023

ACTA OFICIAL EXAMEN DE GRADO

Nombre : FREDDY ERNESTO AGUILAR HERNÁNDEZ
 Rut : 27.544.406 - 5
 Programa : MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON MENCIÓN EN NEUROCIENCIAS
 Título Tesis : PAPEL DEL ASTROCITO EN LA INTEGRACION SINÁPTICA DE NEURONAS PIRAMIDALES CA1 EN UN MODELO MURINO DE EPILEPTOGÉNESIS
 Fecha : 12 de abril de 2023

Nombre Académico	Comisión	Firma	Nota Tesis Escrita	Nota Tesis Oral
DR. CHRISTIAN BONANSCO (QEPD) Facultad de Ciencias Universidad Valparaíso	TUTOR		✓	✓
DR. ANDRÉS CHÁVEZ Facultad de Ciencias Universidad de Valparaíso	REVISOR INTERNO		7	7
DR. GONZALO YEVENES Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción	REVISOR EXTERNO	 por poder	7	7
DR. ÁLVARO ARDILES ARAYA Facultad de Medicina Universidad de Valparaíso	REVISOR INTERNO		7	7

Promedio Tesis Escrita	7
Promedio Tesis Oral	7
PROMEDIO TESIS FINAL	7



DR. RAMÓN SOTOMAYOR-ZÁRATE
 Director
 Magíster en Ciencias Biológicas
 mención Neurociencias
 Facultad de Ciencias

*Al Dr. Christian Bonansco,
Tutor de mis esfuerzos y agricultor de mis ideas.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ramon Sotomayor y Dr. Gonzalo Cruz, por su vocación al enseñar y mecenazgo ejemplar.

A mis padres, por su cariño y apoyo incondicional para alcanzar mis sueños.

A Naileth González, por traerme de vuelta al mundo de la ciencia.

A Miguel Fredes, por brindarme la practicidad del cariño.

A Wladimir Plaza, por guiarme en mis primeros pasos.

A Camila Cerna, por su compañerismo sin igual.

A Camila Estay, por enseñarme a mejorar.

A los ratones, por su vida.

A ti que lees esto.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue desarrollado con el financiamiento de:

- Centro de Neurobiología y Fisiología Integrativa (CENFI – UV) DIUV-CI Grant No. 01/2006 a cargo del profesor Dr. Christian Bonansco.
- FONDECYT regular N°120-0474 a cargo del profesor Dr. Ramon Sotomayor-Zarate.
- FONDECYT regular N°120-1816 a cargo del profesor Dr. Gonzalo Cruz.
- Universidad de Valparaíso DIUV-CI Grant N°01/2006.
- Programa de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
La epilepsia, epidemiología y descripción.	11
Epileptogénesis.	12
Kindling inducido por Pentilenotetrazol (PTZ): un modelo de epileptogénesis.	13
Desregulación del Balance Excitación/Inhibición en la epilepsia.	15
Modulación de la transmisión sináptica y actividad eléctrica mediada por el Astrocito.	17
Modulación de la transmisión glutamatérgica mediada por astrocitos en epilepsia.	18
Modulación de la transmisión GABAérgica mediada por astrocitos en epilepsia.....	20
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
OBJETIVOS PROCEDIMENTALES	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Animales.....	24
Grupos experimentales y protocolo de administración de PTZ.	24
Farmacología.....	25
Obtención de rebanadas de hipocampo.	27
Registro, estimulación y análisis.	28
Disección por voltaje:	28
Registro de corrientes espontáneas.	29
Registro de corrientes evocadas.	29
Registro de corrientes espontáneas en miniatura.....	30

Controles.	31
Integración temporal de células piramidales de CA1.	33
Protocolo de integración temporal.	34
Sobre-activación astrocítica e Integración temporal.	35
Controles.	36
Análisis estadísticos.	37
RESULTADOS.....	38
Fenotipificación del comportamiento epileptogénico en PTZ-kindling.	38
Efecto del PTZ-kindling en el balance Excitación/Inhibición evocado en neuronas piramidales de CA1.	39
Efecto del PTZ-Kindling en la transmisión espontánea de neuronas piramidales de CA1.	42
Efecto del PTZ-kindling y sobre-activación astrocítica en la probabilidad de disparo de neuronas de CA1.	44
DISCUSIÓN	47
Aumento de la excitación en el balance E/I en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo epiléptico.	48
Aumento de la eficacia sináptica en transmisión glutamatérgica CA3-CA1 de hipocampo epiléptico.	48
Cambios en la transmisión inhibitoria del hipocampo epiléptico: componentes pre y postsinápticos.	50
Aumento de la probabilidad de disparo producto de la integración temporal de neuronas piramidales de CA1 relacionado con hipocampo epiléptico e inducido por sobre-activación astrocítica.	52
CONCLUSIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA	55

ABREVIATURAS

A1R: Receptor de adenosina 1.

ACSF: Líquido cefalorraquídeo artificial.

AMP: Adenosín monofosfato.

AMPAR: Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.

ANOVA: Análisis de varianza.

APV: Ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico.

ATP: Adenosín trifosfato.

CA1: Cornu ammonis hipocampal 1.

CA3: Cornu ammonis hipocampal 3.

CCPA: 2-cloro- N 6- ciclopentiladenosina.

CCK: Colecistoquinina

CNQX: Cianquixalina

EGTA: Etilenglicol-bis (β -aminoetil éter).

EPSCs: Corrientes postsinápticas excitadoras evocadas.

E_{LAMPA}: Potencial de equilibrio corriente mediada por receptores AMPA

E_{GABA}: Potencial de equilibrio corriente mediada por receptores GABA

GABA: Ácido γ -aminobutírico.

GABA_B R: Receptor B del ácido γ -aminobutírico.

GABA_A R: Receptor A del ácido γ -aminobutírico.

gE: Conductancias excitadoras.

gI: Conductancias Inhibidoras.

GLT-1: Transportador astrocítico de glutamato 1.

HEPES: Ácido 4- (2-hidroxietyl) -1-piperazinetanosulfónico.

IPSCs: Corrientes postsinápticas inhibidoras evocadas.

I-SOM: interneuronas somatostatina positivas

Hz: Hercio

LTP: Potenciación a largo plazo.

mEPSCs: Corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura.

mGluR5: Receptor metabotrópico de glutamato 5.

mIPSCs: Corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura.

MRS2179: Sal de diamonio 2'-desoxi-N6-metil adenosina 3', 5'-difosfato.

mM: Milimolar

ms: milisegundos

NMDAR: Receptor de *N-metil-D-aspartato*.

P2Y1R: Receptor metabotrópico purinérgico de ATP tipo 1.

PPF: Facilitación por pulsos pareados.

PPR: Relación de pulsos pareados

PTX: Picrotoxina.

PTZ: Pentilenotetrazol.

PTZ-kindling: Kindling inducido por PTZ

PV: Parvoalbumina

sEPSCs: Corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas.

sIPSCs: Corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas.

SOCs: Corrientes lentas dependientes de NMDAR.

TTX: Tetrodotoxina.

μ m: Micras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de Epileptogénesis inducido por PTZ.	24
Figura 2. Controles de la disección por voltaje.	32
Figura 4. Configuración de registro y estimulación de dos vías independientes.....	35
Figura 5. Fenotipo de comportamiento epileptogénico inducido por PTZ.	38
Figura 6. Efecto del PTZ-kindling en la relación Excitación/Inhibición de la transmisión sináptica evocada.	41
Figura 7. Efecto del PTZ-kindling en la transmisión disináptica y monosináptica espontánea.	43
Figura 8. Efecto del PTZ-kindling y sobre-activación astrocítica en la probabilidad de disparo de CA1.....	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de fármacos utilizados en baño durante los registros electrofisiológicos.	26
Tabla 2. Efecto del PTZ-kindling en las propiedades intrínsecas de neuronas piramidales de CA1.	37

RESUMEN

La epilepsia es un trastorno neurológico que se ha asociado con el aumento de la neurotransmisión glutamatérgica y una disminución de la GABAérgica. Sin embargo, en la mayoría de los modelos de epilepsia aún no se sabe cómo el equilibrio excitación e inhibición (E/I) está alterado, ni si afecta a la excitabilidad de las principales neuronas del circuito del hipocampo. Aquí, evaluamos el E/I en un modelo de epileptogénesis de kindling químico inducido por inyecciones de Pentilenotetrazol (PTZ). Usando enfoques electrofisiológicos, estudiamos la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica simultáneamente en las neuronas piramidales CA1 del hipocampo de ratones inyectados con PTZ (ratones PTZ-Kindling). Registramos corrientes postsinápticas evocadas excitatorias e inhibitorias entre -35 a -40 mV (EPSCs/IPSCs) calculando una relación E/I de amplitud y área, relación de pulsos pareados (PPR) y frecuencia de las corrientes disinápticas y monosinápticas. Además, evaluamos la probabilidad de disparo de neuronas piramidales de CA1 cuando dos fibras independientes fueron estimuladas subumbralmente con retrasos entre vías de 0 ms hasta 14 ms. En los ratones PTZ-Kindling se observaron varios cambios que sugieren una mayor hiperexcitabilidad en la transmisión disináptica y, por lo tanto, en presencia de potenciales de acción. En primer lugar, se encontró que la relación entre la amplitud de la transmisión excitatoria y la inhibitoria fue dos veces mayor que en el grupo de control, lo que se debió únicamente a un aumento en la amplitud de la transmisión excitatoria. En segundo lugar, se observó una mayor probabilidad de liberación (PL) en las sinapsis glutamatérgicas, lo que se reflejó en una disminución de la PPR solo en las corrientes EPSC evocadas. Además, se evidenció un aumento en la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs). Por último, se encontró un aumento en el tiempo de subida de las IPSCs evocadas, lo que podría estar asociado a una menor conductancia del receptor de GABA_A. En contraste, cuando se eliminó la presencia de potenciales de acción utilizando TTX y, por lo tanto, registrando la transmisión monosináptica del grupo PTZ-Kindling, se observó no solo un aumento en la PL de la transmisión excitatoria, sino también de la inhibitoria, como se reflejó en el incremento de la frecuencia de corrientes postsinápticas en miniatura (mEPSC y mIPSC). Esto sugiere un posible mecanismo de compensación mediado por la transmisión GABAérgica que es independiente de la actividad. Además, Se encontró que en las neuronas CA1 del grupo PTZ-Kindling, cuando se estimulaban dos vías independientes subumbralmente con un retraso de 6.5-7.5 ms entre ellas, la probabilidad de disparo aumentaba significativamente (70%) en comparación con el grupo control (50%), lo que sugiere un posible ensanchamiento de la ventana de integración temporal. Curiosamente, cuando los astrocitos de animales de control se activaron con el agonista del receptor activado por proteasa 1 (PAR1) TFLLR, la probabilidad de disparo fue similar a la registrada en el tejido epiléptico, utilizando el mismo protocolo de integración temporal. Estos resultados sugieren que en la epileptogénesis inducida por PTZ se produce una desregulación de la relación E/I que contribuye a una regulación positiva de la función de entrada/salida de las neuronas piramidales de CA1.

Palabras clave: Epilepsia, Índice Excitación/Inhibición, PTZ, Probabilidad de disparo, Astrocito.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia, epidemiología y descripción.

La epilepsia es un trastorno neurológico que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial (Moghim & Corne, 2014) y el 30% de sus pacientes desarrollan farmacorresistencia (Engel, 2001; Schmidt & Löscher, 2005; OMS 2018). Es diagnosticada cuando una persona presenta al menos dos o más crisis no provocadas o reflejas con más de 24 horas de diferencia (Fisher et al., 2014; Falco-Walter et al., 2018). Esta enfermedad, se distingue por convulsiones recurrentes y muerte neuronal del hipocampo que es más grave en la región CA1 acompañada de una condición llamada gliosis reactiva (Sloviter, 1994), que ha sugerido que los astrocitos participan en la generación y propagación de la actividad convulsiva (Binder & Steinhauser, 2006; Hammer et al., 2008; Seifert & Steinhauser, 2009).

Así mismo, la epilepsia se ha descrito como un desequilibrio de la función excitadora e inhibidora asociado a alteraciones en el metabolismo y captación de neurotransmisores (Löscher & Potschka, 2005; Eid & et al., 2016; Akyuz et al.; 2021). Sin embargo, esta pérdida del normal ajuste entre la actividad sináptica glutamatérgica y la GABAérgica ha sido coligada a las alteraciones en la modulación de la transmisión sináptica y excitabilidad neuronal (Álvarez-Ferradas et al., 2015; Wellmann et al.; 2018; Mcdonald et al., 1991; Olsen et al. 1992; During et al.; 1995; Khazipov et al., 2015; Campbell & Hablitz, 2004; Demarque et al., 2004). Un creciente cuerpo de evidencias ha sugerido que esta modulación está relacionada a la interacción entre astrocitos y neuronas, la cual estaría alterada en varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la epilepsia (Duffy & MacVicar, 1999; Nadkarni et al., 2005; Tian et al., 2005; Seifert et al., 2010; Boison et al., 2010; Seifert & Steinhäuser, 2013; Hadera et al., 2015; Pekny et al., 2016; Patel et al., 2019; Sanz et al., 2020; Binder & Steinhäuser, 2021).

Epileptogénesis.

La epileptogénesis es el proceso por el cual el tejido cerebral normal y mediante actividad eléctrica anormal se transforma en un tejido que genera crisis espontáneas recurrentes (SRS), lo que da como resultado el desarrollo de una condición epiléptica y/o la progresión de la epilepsia después de que se establece. Todo ello debido a mecanismos genéticos o adquiridos que conllevan a cambios en cascadas moleculares y celulares que eventualmente generarán estas crisis espontáneas (Pitkänen & Lukasiuk, 2009; Rattka et al., 2012), las que aumentan de manera progresiva y las cuales se buscan emular en los distintos modelos disponibles de epilepsia.

Por tanto, los modelos animales de epilepsia son los más cercanos e ideales para homologar las características morfológicas en estructuras mesiales, y las crisis espontáneas recurrentes observadas en la epilepsia del lóbulo temporal (Curia et al., 2008), normalmente se basan en inyecciones de quimio-convulsivos, como el ácido kaínico y la pilocarpina, o la estimulación eléctrica repetitiva de estructuras, como el hipocampo o la amígdala, que pueden conducir a un estado epiléptico crónico con episodios convulsivos espontáneos robustos (Gorter et al., 2016; McNamara et al., 1985; Lévesque et al. 2013).

Además, se han desarrollado numerosas variaciones de estos modelos, como el kainato intrahipocampal o intraamigdalino o el kainato sistémico de dosis bajas repetidas (Hellier et al. 1998) los cuales han permitido determinar los posibles cambios morfológicos y sinápticos ocurridos debido a un evento que gatillará un cuadro epiléptico y sus consecuentes crisis espontáneas, donde se acuña el término Kindling (encendido) para el proceso mediante el cual se emula la epileptogénesis obteniéndose un cerebro epiléptico.

Kindling inducido por Pentilenotetrazol (PTZ): un modelo de epileptogénesis.

El término kindling se refiere al fenómeno en el que la aplicación inicial de un estímulo eléctrico o químico subconvulsivante resulta en una intensificación progresiva de la actividad convulsiva, que culmina en crisis convulsivas generalizadas (McNamara et al., 1980; Karler et al., 1989; Morales et al., 2014). Este proceso ha permitido demostrar que algunas zonas del cerebro son más susceptibles a la estimulación repetida. Por ejemplo, la amígdala se "kindlea" después de 15 días, mientras que para el hipocampo se requiere un protocolo de estimulación eléctrica de unos 53 días (Goddard et al., 1969). Estos hallazgos han permitido el desarrollo de protocolos que logran "kindlear" el hipocampo en solo tres días mediante la estimulación eléctrica de la amígdala basolateral (Morales et al., 2014).

El kindling, además de ser inducido por una estimulación eléctrica de diferentes regiones cerebrales también puede ser desarrollado utilizando distintos agentes químicos como el Pentilenotetrazol: PTZ (Dhir, 2012), un fármaco que se sintetizó en 1924 por Hildebrandt y que se utilizó en varios laboratorios para probar la actividad anticonvulsiva de diversos fármacos poco después del primer informe de su acción convulsiva (Löscher, 2017).

El PTZ es un antagonista no competitivo del receptor del ácido gamma aminobutírico (GABA)-A (Hansen, 2004) el cual suprime la función de las sinapsis inhibitorias, produciendo una mayor actividad neuronal y convulsiones generalizadas en los animales (Tourov et al., 1996). La mayoría de las evidencias indican que el PTZ interacciona con el sitio de unión a PTX (en un sitio de regulación alostérica) en el receptor GABA_A, bloqueando el canal de Cl⁻ (Eloqayli et al., 2004; Löscher, 2009; Carmody & Brennan, 2010; Bazyan et al., 2001), provocando una hiperexcitabilidad comparable con la estimulación eléctrica repetitiva, donde el número y duración de un burst de espigas poblacionales progresa con la presentación repetitiva del estímulo (Bonansco & Fuenzalida, 2016).

Cabe destacar que el PTZ induce 4 fenómenos conductuales: freezing, espasmos mioclónicos, crisis clónicas y crisis tónico-clónicas (Velisek, 2006), siendo utilizado para reproducir crisis generalizadas tónico-clónica características de la epilepsia del lóbulo temporal (Goudarzi et al., 2015; Liu et al., 2015; Bascuñana et al., 2016; Rattka et al., 2012).

Además, El PTZ-Kindling presentan 4 patrones de EEG asociados a estos comportamientos: Espigas aisladas, usualmente asociadas con sacudidas mioclónicas; “Spindles” o “husos” de actividad de ondas y espigas, asociadas a comportamiento de freezing; Actividad decreciente de ondas y espigas, asociada a crisis clónicas y una o varias poliespigas y finalmente ondas lentas, asociadas con el inicio de las crisis tónico-clónica (Velisek , 2006).

Por otro lado, es importante considerar que en los distintos tipos de Kindling la cantidad de estímulos o dosis y la variabilidad de tiempo en la aparición de las crisis espontáneas es importante, ya que luego de instaurarse el foco epiléptico, se da paso a un período de latencia, que puede variar entre 24- 48 hrs, semanas e incluso meses (Morimoto et al., 2004; Gröticke et al., 2007; Curia et al., 2008; Chen et al.,2013), hasta finalmente la aparición de crisis espontáneas. Con el uso de PTZ se observa una progresión en el comportamiento epiléptico que está relacionado con problemas de memoria (Getova & Dimitrova 2000; Gupta et al., 2003; Pourmotabbed et al. 2011) mas no se describen crisis espontáneas recurrentes, siendo de mayor y de vital importancia observar una progresión en la respuesta epiléptica durante la administración de cada dosis.

En la mayoría de los estudios donde es utilizado el PTZ, este se usa en dosis subconvulsiva (25–40 mg/kg) por vía intraperitoneal o subcutánea con un esquema de administración Inter diario por períodos que varían de las 2 a las 8 semanas que permite “Kindlear” al 80% de los ratones y evaluar el efecto del fármaco en distintos escenarios de epileptogénesis o epilepsia crónica (Bascuñana et al., 2016; Dhir, 2012; Ekonomou et al., 2001; Grecksch et al., 1997; Koshal & Kumar, 2016; Vasil'ev et al., 2013; Lüttjohann et al., 2009).

Por tanto, la administración reiterada del PTZ brinda una contribución significativa en la comprensión de las consecuencias de las convulsiones, tanto en la epileptogénesis asociada a periodos cortos de la aplicación del fármaco, como de la epilepsia crónica en los periodos de aplicación más largos, en ambas las alteraciones neuroquímicas y moleculares inducidas por circuitos neuronales remodelados resultantes de convulsiones repetidas, son objetivos terapéuticos potenciales para prevenir o retardar la epilepsia (Singh et al. 2021).

Desregulación del Balance Excitación/Inhibición en la epilepsia.

Las evidencias indican que el balance excitación-inhibición del tejido epiléptico es claramente distinto promoviendo la hiperexcitabilidad del circuito. Se han demostrado que deleciones génicas, animales resultan más propensos a desarrollar epilepsia dado el cambio de un solo componente del balance excitación-inhibición, donde aumenta el componente excitador o disminuye el inhibidor (Terauchi et al., 2010; Wang y et al., 2021). Otros han evidenciado un aumento significativo de marcadores postsinápticos excitadores y una disminución generalizada de los receptores GABA_A en la etapa de convulsiones recurrentes de la epilepsia (Needs et al., 2019). Se ha descrito también, un desequilibrio mediado por la excitación seguido de convulsiones espontáneas en ratas inyectadas intra-hipocampalmente con la neurotoxina TeNT (Ferecskó et al., 2015). Por tanto, podemos concluir que el balance excitación/inhibición en epilepsia estaría dominado por el componente excitador.

No obstante, solo algunos autores han logrado medir específicamente las conductancias excitadoras (gE) o inhibitoras (gI) describiendo sus dinámicas antes, durante y después de la actividad epileptiforme, como la relación gE/gI en neuronas piramidales CA1 e interneuronas oriens- lacunosum moleculare (Žiburkus et al., 2013; Žiburkus et al., 2006). Se demostró que, en la etapa inicial de la actividad epileptiforme, la relación excitación/inhibición estaba dominada por el componente inhibidor en las neuronas piramidales y más equilibrada en interneuronas. Interesantemente, esta relación fue dominada por el componente excitador alcanzando su punto máximo en ambos tipos celulares y casi al mismo tiempo durante la actividad epileptiforme, mientras que a su finalización, las neuronas piramidales estuvieron nuevamente dominadas por la inhibición y las interneuronas experimentaron un alza sináptica excitadora persistente; demostrando que un aumento de la excitabilidad de las interneuronas puede desempeñar un papel tanto en el inicio como al final de la convulsión.

Por otra parte, la epileptogénesis estaría asociada a cambios en la expresión de varias subunidades del receptor GABA_A en modelos animales y en humanos (Pavlov &

Walker, 2013). Los hallazgos del grupo de Corda (1990) indican una reducción marcada en la entrada de Cl^- dependiente de receptores GABA_A en la corteza cerebral de ratas kindleadas con PTZ. Esto indicaría que la sensibilidad a las crisis inducidas por PTZ aumenta después de la administración repetida de este agente. También se ha demostrado cambios en los niveles de ARNm del receptor GABA_A ya sea con una dosis o dosis repetitivas de PTZ (Hansen et al, 2004), en conjunto con cambios en el sitio de unión y niveles de ARNm de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato (Economou et al, 2001).

Cabe destacar, que según resultados obtenidos en nuestro laboratorio - El modelo PTZ-kindling genera un aumento en la probabilidad de liberación en terminales glutamatérgicos de las sinapsis de CA3-CA1, y con ello eventualmente un aumento en el tono glutamatérgico en el hipocampo. Además, de generar astrogliosis y aumento de sus ondas lentas de calcio en el hipocampo epiléptico, asociado a la sobreexpresión de receptores mGluR5 y P2Y1. Donde estos cambios morfológicos podrían contribuir al alza en la gliotransmisión, manteniendo un tono glutamatérgico elevado.

En otro orden de ideas y destacando que el balance E/I es importante para regular el nivel general de actividad en las neuronas postsinápticas (Carvalho & Buonamano, 2009), controlando la integración de múltiples entradas y la sincronización de potenciales de acción (Wehr & Zador, 2003; Pouille et al., 2009; Isaacson & Scanziani, 2011). Es importante mencionar que las neuronas piramidales de CA1, se caracterizan por estar reguladas por un tipo de retroalimentación inhibitoria disináptica. La excitación proveniente de CA3 es capaz de activar tanto a neuronas piramidales, como a las interneuronas PV y CCK positivas que regulan perisomáticamente a CA1 (Tamás et al., 2004), lo que finalmente resulta en una ventana de integración muy breve de alrededor de dos milisegundos que responde al breve retraso con el que la inhibición de la retroalimentación inhibitoria disináptica (CA3-Interneurona-CA1) sigue a la excitación monosináptica (CA3- CA1) (Pouille & Scanziani, 2001) y que a la fecha en tejido epiléptico se desconoce si esta ventana presenta algún cambio y muchos menos el papel astrocítico en ello.

Modulación de la transmisión sináptica y actividad eléctrica mediada por el Astrocito.

Los astrocitos forman parte de las células gliales en el sistema nervioso central, interactúan perisinápticamente con las neuronas cumpliendo diferentes funciones metabólicas, de sostén, neuroprotección (Vasile y et al., 2017), homeostasis (Mederos y et al., 2018) y actividad neuronal oscilatoria (Mederos et al., 2021). Además, participan más allá de la recaptura del neurotransmisor del espacio sináptico, influyendo en la sinaptogénesis, en la regulación de la transmisión sináptica (Mederos et al., 2018; Ota et al., 2021), en la modulación de la plasticidad (Bonansco et al., 2011; Perea & Araque, 2005, Perea & Araque, 2007) y la excitabilidad neuronal (Datta et al., 2020 ; Zhang et al., 2017; Pirttimaki & Parri, 2013). Por tanto, sabiendo que los astrocitos cuentan con una excitabilidad de base química vinculada bidireccionalmente a la actividad neuronal (Haydon, 2001), convierte a este tipo celular en un objetivo importante que tomar en cuenta dentro de la epilepsia.

Así mismo, los astrocitos son componentes reguladores bajo el concepto de “sinapsis tripartita” (Perea et al., 2009), puesto que están íntimamente asociados con las sinapsis envolviendo muchas terminales pre y post-sinápticas (Ventura & Harris 1999; Volterra & Meldolesi 2005; Halassa et al., 2007; Bushong et al., 2005;). Los procesos perisinápticos de los astrocitos expresan receptores activos acoplados a proteína G que son capaces de detectar neurotransmisores liberados durante la actividad sináptica, de aumentar los niveles citosólicos de calcio y de estimular la liberación de gliotransmisores que a su vez pueden interactuar con los elementos pre y post-sinápticos, siendo capaces de comunicarse bidireccionalmente con las neuronas (Santello et al., 2012), regulando su excitabilidad (Sasaki et al., 2011) y transmisión sináptica (Araque et al., 2001 ; Bezzi et al., 2001a ; Perea et al., 2009).

Además, es importante mencionar que la concentración de glutamato extracelular en epilepsia se encuentra aumentada (Glass & Dragunow, 1995). El glutamato fue el primer gliotransmisor estudiado, siendo asociado a la modulación de la transmisión sináptica

excitadora en sinapsis excitatorias, y fue en la cual fue definido el concepto de “sinapsis tripartita”. Los astrocitos del estrato radiatum CA1 son capaces de sensar la actividad de las colaterales de Schaffer y responder a ellas con elevaciones de Ca^{2+} y liberación de glutamato. El glutamato astrocítico actúa sobre receptores NMDA extra-sinápticos de neuronas piramidales de CA1 (postsinápsis). La activación de esos receptores da como resultado una entrada de corrientes grandes y lentas (SIC) en las células piramidales capaces de despolarizar significativamente las células e incluso a provocar su disparo (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Perea y Araque 2005; Navarrete & Araque 2008).

De la misma forma, el glutamato liberado por astrocitos también puede activar receptores localizados a nivel presináptico (CA3). Mediante la activación de receptores de glutamato metabotrópicos del grupo I (mGluRs) (Perea & Araque 2007; Navarrete & Araque 2010), los astrocitos mejoran la frecuencia de las corrientes sinápticas excitatorias espontáneas y evocadas.

Finalmente, la comunicación neurona-astrocito no solo está mediada por glutamato, sino también por neurotransmisores como GABA, ATP-adenosina y endocannabinoides, que también son capaces de generar en los astrocitos un aumento de la señalización por Ca^{2+} y una posterior liberación de gliotransmisores que permiten la comunicación astrocito-neurona. Entre estos gliotransmisores destacan: el glutamato, ATP, GABA, D-serina, L-Lactato y la adenosina, (Bang et al., 2016). Siendo esta última molécula, un importante supresor de convulsiones endógeno, que actúa a través de la inhibición presináptica (CA3) y la estabilización del potencial de membrana postsináptico (CA1) de neuronas glutamatérgicas (During & Spencer, 1992; Lado et al., 2008).

Modulación de la transmisión glutamatérgica mediada por astrocitos en epilepsia.

En la epilepsia, se han descrito niveles elevados de glutamato extracelular en focos epileptogénicos (Glass & Dragunow, 1995), lo cual ha sido asociado a astrocitos reactivos

que cambian sus patrones de expresión génica y morfológica (Wetherington et al., 2008), involucrándose directamente en la patogenia de esta enfermedad.

En este orden de ideas, se ha descrito que la eliminación del transportador astroglial de glutamato GLT-1, resulta en el desarrollo de convulsiones espontáneas semejantes a pacientes con epilepsia del lóbulo temporal; mientras que su inhibición farmacológica reduce el umbral de la actividad epileptiforme (Campbell & Hablitz, 2004; Demarque et al., 2004). Sin embargo, la evidencia de si este transportador está o no disminuido en tejido epiléptico, sigue siendo contradictoria. No obstante, se ha llegado a la conclusión de que en la epilepsia hay una regulación a la baja de la glutamina sintetasa, una enzima que cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato, lo cual produce un enlentecimiento del ciclo glutamato-glutamina, que desencadena la acumulación del glutamato en los astrocitos y el espacio extracelular (Eid y et al., 2004).

Por otro lado, todo parece apuntar a un alza del tono glutamatérgico en hipocampo epiléptico debido a una hiperreactividad astrocítica, la cual es impulsada por la activación del receptor astrocítico purinérgico P2Y1 y, caracterizada por corrientes transitorias somáticas de mayor duración (insensibles a tetrodotoxina y sensibles a antagonistas purinérgicos). Esto, desencadena un patrón anormal de elevaciones espontáneas de Ca^{2+} en el astrocito y mejora la gliotransmisión de glutamato, que al interactuar con el receptor mGluR5 presináptico aumenta la liberación de glutamato neuronal (Álvarez-Ferradas et al., 2015; Wellmann et al., 2018). Además, el bloqueo de la señalización purinérgica entre astrocitos restaura la actividad sináptica normal durante la epileptogénesis (Nikolic et al.; 2018).

Por tanto, en la epilepsia no solo aumenta la transmisión sináptica excitadora por enlentecimiento del ciclo glutamato-glutamina; sino también, (1) por una mayor liberación de glutamato desde los terminales nerviosos glutamatérgicos (Álvarez-Ferradas et al. , 2015), vía activación de mGluR1-5 inducido por el astrocito hiperreactivo y (2) por una mayor liberación de glutamato desde el astrocito por interseñalización astrocítica purinérgica, que sugiere que este tipo de señalización mediada por ATP-adenosina está

específicamente asociada con la fisiopatología de la epilepsia y la generación de convulsiones (Ding et al., 2007; Bonansco et al. , 2011 ; Santiago et al., 2011 ; Pascual et al. , 2012 ; Alves et al., 2017).

Modulación de la transmisión GABAérgica mediada por astrocitos en epilepsia

Es importante mencionar que no solo la transmisión excitadora juega un papel importante en la epilepsia. En humanos se ha descrito una disminución de las concentraciones de GABA, de las densidades de los receptores de GABA_A y del número de interneuronas, lo que en conjunto podría explicar la incapacidad descrita del tono inhibitorio en suprimir la actividad convulsiva (McDonald et al., 1991; Olsen et al., 1992; During et al.; 1995). Sin embargo, han sido pocos los estudios sobre la regulación astrogliar de la transmisión inhibitoria en epilepsia a pesar de que estos se comunican bidireccionalmente con las interneuronas.

Respecto a la comunicación astrocito-interneurona en condiciones fisiológicas, se ha descrito que el glutamato liberado por los astrocitos activa receptores de kainato y mGluR 2-3 presinápticos en las terminales inhibitorias, inhibiendo la liberación de GABA en el hipocampo (Liu et al., 2004a; Liu et al., 2004b). Sin embargo, también se ha descrito un aumento de la transmisión inhibitoria en las células piramidales CA1 mediada por glutamato astrocítico y la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato AMPA/NMDA (Kang et al., 1998) indicándonos que el glutamato que se libera desde los astrocitos puede aumentar o disminuir la transmisión sináptica en las neuronas del hipocampo al actuar sobre diferentes clases de receptores.

En cuanto a la comunicación interneurona-astrocito en condiciones fisiológicas, es importante mencionar que los astrocitos expresan distintos receptores y transportadores de GABA (Boisvert et al., 2018; Doengi et al., 2009; Ribak et al., 1996). Los receptores GABA_A causan una despolarización de la membrana en el astrocito (Letellier et al., 2016; Meier et al., 2008 ; Tippens et al., 2008) capaz de activar la entrada de calcio dependiente de canales

de Ca^{2+} sensibles a voltaje (Egawa et al., 2013 ; Meier et al., 2008). Una intensa actividad GABAérgica induce la salida de Cl^- desde los astrocitos mediante este canal, regulando la fuerza impulsora de la transmisión neuronal GABAérgica mediante la modulación de las concentraciones extracelulares de Cl^- (Egawa et al., 2013).

Además, los astrocitos también expresan receptores GABA_B capaces de activar la señalización de calcio, en este caso involucrando proteínas $\text{G}_{i/o}$ y liberación de Ca^{2+} desde las reservas intracelulares (Mariotti, et al., 2018; Perea et al., 2016). La activación de receptores GABA_B en los astrocitos del hipocampo desencadena la liberación de ATP-adenosina que causa una reducción en la liberación de glutamato en las sinapsis más distales, a través de la activación de receptores presinápticos de adenosina A1R en las terminales glutamatérgicas (CA3), lo que resulta en una depresión a corto o largo plazo de los circuitos del hipocampo (Andersson et al., 2007; Chen et al., 2013; Serrano et al., 2006).

De hecho, los períodos sostenidos de actividad GABAérgica durante 90 segundos y por encima de los 10 Hz inducen la modulación sináptica mediada por el glutamato astrocítico, mientras que tiempos más cortos (30 s) pero a tasas de activación de interneuronas más altas (más de 20 Hz) evocan tanto la potenciación glutamatérgica mediada por astrocitos, como la depresión sináptica mediada por adenosina astrocítica (Covelo & Araque, 2018). Estos datos indican que los astrocitos pueden decodificar la frecuencia y duración de la actividad de las interneuronas y comunicarse al liberar diferentes gliotransmisores, evocando una modulación sináptica bifásica de las sinapsis CA3-CA1 (Covelo & Araque, 2018).

Además, la activación del transportador de GABA GAT-3 mejora la interseñalización mediada por calcio de los astrocitos (Matos et al., 2018 ; Boddum et al., 2016) haciendo que estos liberen ATP (Andersson y et al., 2007 ; Matos et al., 2018 ; Serrano et al., 2006), Este ATP al convertirse en adenosina activa receptores A1R de las células piramidales CA1 ajustando al alza la inhibición mediada por interneuronas somatostatina positivas (I-SOM) (Matos et al., 2018); y regulando negativamente la transmisión excitadora CA3-CA1

mediante la inhibición de la liberación de glutamato a través de los receptores presinápticos (CA3) de adenosina (Boddum et al., 2016).

Sin embargo, y aunque la regulación astrogial de la transmisión inhibitoria en epilepsia se conoce muy poco, recientemente se ha descrito en ratones tipo epilépticos una fuerte y progresiva acumulación astrocítica de GABA por síntesis endógena; que al ser liberado al espacio extracelular activa las corrientes tónicas mediadas por receptores GABA_A en CA1 (un tipo de inhibición mediada por la activación persistente de receptores GABA_A) reduciendo la excitabilidad de neuronas piramidales (Müller et al., 2020) y previniendo el desarrollo de una red propensa a convulsiones (Pandit et al., 2020).

Finalmente y dado que en epilepsia, se ha descrito una señalización deficiente de los receptores de adenosina: A1R (Rebola et al.; 2011) y una sobreexpresión de la enzima astrocítica: Adenosina quinasa (Boison; 2013 ; Studer et al., 2006) responsable de agregar un grupo fosfato a la adenosina formando AMP. Se sugiere, que la interrupción astrocítica de la señalización mediada por A1R está vinculada dinámicamente a la fisiopatología de esta enfermedad y al eje interneurona-astrocito como una variable importante para tener en cuenta en esta comunicación.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Finalmente, y aunque han sido variados los enfoques para estudiar el balance entre la excitación y la inhibición en hipocampo epiléptico, a la fecha este no ha sido evaluado en el modelo de PTZ, esto y en conjunto a los posibles cambios en la probabilidad de integración temporal asociada a la epileptogénesis o a la sobre-activación astrocítica es lo que nos lleva a la siguiente pregunta:

¿Cómo cambia la relación excitación-inhibición y la ventana de integración sináptica del circuito hipocampal CA3-CA1 en un modelo murino de Kindling inducido por PTZ?

HIPÓTESIS

La epileptogénesis inducida por PTZ en ratón provoca el aumento del balance E/I y de la probabilidad de disparo en la integración temporal de la sinapsis CA3-CA1.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la regulación e integración sináptica del balance E/I en sinapsis CA3-CA1 de ratones kindleados con PTZ.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el índice excitación/inhibición en neuronas piramidales de CA1 de ratones kindleados con PTZ.
- Evaluar la integración sináptica temporal en neuronas piramidales de CA1 de ratones kindleados con PTZ.
- Evaluar el papel de la señalización astroglial sobre la integración temporal en neuronas piramidales de CA1 de ratones controles.

OBJETIVOS PROCEDIMENTALES

- Determinar la duración del protocolo de epileptogénesis inducida por PTZ en ratón., estableciendo dosis, criterios de observación y clasificación del comportamiento epiléptico.
- Obtener registros intracelulares reproducibles y estables de corrientes postsinápticas excitatorias e inhibitorias: espontáneas, en miniatura, evocadas por pulsos pareados. corrientes evocadas compuestas (excitación e inhibición) producto de la estimulación de aferentes excitatorios monosinápticas (CA3-CA1) y las vías inhibitorias disinápticas (CA3-interneurona-CA1).
- Obtener registros intracelulares reproducibles y estables de potenciales postsinápticas excitatorias de dos vías independientes, potenciales de acción evocados por estimulación subumbral de dos vías independientes, potenciales de acción evocados por rampa de despolarización y pasos de corrientes despolarizantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales.

Todos los procedimientos fueron sometidos a la aprobación del comité de bioética de la Universidad de Valparaíso para experimentación con animales. Aprobado según consta en el ACTA CBC 342022. Se usaron 44 ratones macho y hembra de la cepa C57BL/6 de 30 días: 22 ratones para el grupo control y 22 ratones para el grupo PTZ. Todos los animales se alojaron en un vivero con un horario de luz/oscuridad de 12:12 horas. a una temperatura constante de $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con una humedad relativa de $55 \pm 5\%$ con acceso ad libitum a agua y alimentos durante todo el estudio.

Grupos experimentales y protocolo de administración de PTZ.

Los ratones fueron divididos en dos grupos experimentales, Grupo Control y Grupo PTZ-kindling: sometidos a inyecciones periódicas de Pentilenotetrazol (PTZ), un antagonista de receptores GABA_A usado para conseguir el modelo de epilepsia descrito por Dhir en 2012, y replicado en nuestro laboratorio por Diaz, 2019. El protocolo para el grupo PTZ consta de máximo 25 días de duración y 12 inyecciones (Fig. 1).

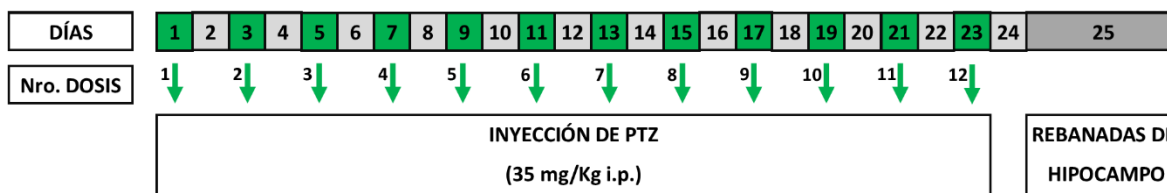


Figura 1. Modelo de Epileptogénesis inducido por PTZ. Esquema temporal del protocolo utilizado. El protocolo duró 25 días, contemplando hasta 12 dosis de 35 mg/kg i.p.; Las dosis fueron administradas en días intercalados (en verde y señalados con flecha).

Para llevar a cabo el protocolo y supervisar el procedimiento, los ratones fueron alojados en una sala especialmente diseñada, donde se controló su peso para calcular el volumen necesario de la solución de PTZ a inyectar. Se preparó diariamente una solución de PTZ (0,01 g de PTZ en 1 ml de solución salina al 0,9%) para mantener la estabilidad del fármaco y se inyectó a todos los ratones bajo las mismas condiciones. Los animales recibieron inyecciones intraperitoneales de una dosis subconvulsiva de PTZ (35 mg/kg) cada dos días durante un período de 15 a 23 días.

Después de cada inyección, se observó el comportamiento de cada animal durante una hora para verificar los estadios de las crisis epilépticas, según la escala conductual de Racine (Racine, 1972): estadio 0: no hay respuesta; estadio 1: inmovilidad y/o espasmos faciales y en las orejas; estadio 2: ondas convulsivas por todo el cuerpo; estadio 3: sacudidas mioclónicas, cola levantada, rearing; estadio 4: crisis tónico-clónicas, en posición lateral; estadio 5: crisis tónico-clónicas generalizadas, vuelco hacia el lomo, pérdida de control postural, saltos (Becker et al., 1992; Becker et al., 1997; Rütthrich et al., 2001; Bascuñana et al., 2016; Goudarzi et al., 2015; Shimada & Yamagata, 2018).

Además, durante la caracterización conductual, se midió la duración de los estadios Racine 4 o 5. Finalmente, cuando los ratones presentaron crisis entre los estadios 4 o 5 durante un mínimo de dos inyecciones consecutivas, se consideró que habían sido "kindleados". Los ratones fueron sacrificados al día siguiente bajo anestesia para obtener secciones de hipocampo.

Farmacología

A continuación, se muestra una tabla resumen de las drogas y concentraciones usadas en el baño durante los registros electrofisiológicos de esta investigación, destacando su efecto farmacológico sobre la transmisión sináptica y las razones de sus usos en los distintos experimentos descritos más abajo.

Tabla 1. Fármacos utilizados en baño durante los registros electrofisiológicos.

Fármaco	Efecto en sinapsis	Uso en experimentos
<p>APV: ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico</p> <p>Concentración en baño = 50 μM</p>	<p>Antagonista del receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato, NDMA: bloquea las corrientes excitatorias mediadas por la entrada Na^+ y Ca^{2+} (Morris 1989).</p>	<p>Prevenir la potenciación a largo plazo en los experimentos de integración sináptica temporal, disección por voltaje y balance E/I (Pouille & Scanziani, 2001; Bartley & Dobrunz, 2015).</p>
<p>CGP-62349</p> <p>Concentración en baño = 1 μM</p>	<p>Antagonista del receptor metabotrópico GABA_B (Kaupmann et al., 1997, Wood et al., 2000)</p>	<p>Prevenir la reducción dependiente de la actividad en la liberación de glutamato de los receptores localizados presinápticamente en las sinapsis colaterales de Schaffer (Pouille & Scanziani.,2001; Speed & Dobrunz, 2008).</p>
<p>CNQX: 6-Cyano-7 nitroquinoxaline-2,3-dione</p> <p>Concentración en baño = 10 μM</p>	<p>Antagonista competitivo de los receptores ionotrópicos AMPA y Kainato: bloquea las corrientes excitatorias mediadas por la entrada Na^+ y Ca^{2+} (Traynelis et al., 2010).</p>	<p>Como control de registro de la actividad excitatoria a -65 mV en los experimentos de disección por voltaje y en presencia de APV (Pouille & Scanziani, 2001).</p>
<p>PTX: Picrotoxina</p> <p>Concentración en baño = 10 μM</p>	<p>Antagonista no competitivo del receptor ionotrópicos de GABA_A: bloquea las corrientes inhibitoras mediadas por la entrada de Cl^- (Olsen, 2006).</p>	<p>Como control de registro de la actividad inhibitoria a -0 mV en los experimentos de balance E/I y disección por voltaje, en presencia de APV (Pouille & Scanziani, 2001).</p>
<p>TFLLR-NH2: L-threonyl-L-phenylalanyl-L-</p>	<p>Agonista selectivo del receptor activado por proteasa 1: PAR1, que aumenta los niveles intracelulares de calcio</p>	<p>Activación selectiva de astrocitos (Gómez-Gonzalo et al., 2010) en animales controles en los</p>

leucyl-L-leucyl-L-argininamide-NH ₂ Concentración en baño = 10 μM	específicamente de los astrocitos promoviendo la glioliberación de glutamato (Oh et al., 2012; Han et al., 2013).	experimentos de integración sináptica temporal.
TTX: Tetrodotoxina Concentración en baño = 0.1 μM	Suprime la propagación de los potenciales de acción mediante el bloqueo de canales de Na ⁺ voltajes dependientes (Narahashi et al., 1964)	caracterizar la transmisión monosináptica excitatoria e inhibitoria en los experimentos de disección por voltaje (Ahmed et al., 2021)

Obtención de rebanadas de hipocampo.

Se obtuvieron cortes de hipocampo de ratones de control y kindleados como se describe anteriormente (Bonansco et al., 2002). Brevemente, los ratones fueron anestesiados y decapitados, el cerebro se extrajo rápidamente y se colocó en líquido ceforraquídeo artificial (ACSF) enfriado con hielo (<4°C) y estabilizado mediante burbujeo de gas carbógeno (95% O₂ – 5% CO₂) que contenía (en mM): 124.0 NaCl, 2.7 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2.0 Mg₂SO₄, 26.0 NaHCO₃, 2.5 CaCl y 10.0 glucosa (pH = 7,4). Se obtuvieron cortes coronales de cerebro (300 μm) utilizando un micrótopo Vibroslice (VSL, WPI, EE. UU.). Luego se incubaron en la solución normal de ACSF durante 1 hora a temperatura ambiental, A continuación, las rebanadas se transfirieron a una cámara de registro de inmersión y se superfundieron con ACSF burbujeado con gas carbógeno (2 ml / min). Los experimentos fueron realizados entre el 11 de junio y el 30 de octubre en el barrio de playa ancha de la ciudad de Valparaíso, entre las 11:00 y 19:00 hrs y a una temperatura ambiental promedio de 14-15 °C, según datos históricos arrojados por la búsqueda realizada por el modelo de lenguaje artificial: ChatGPT desarrollada por OpenAI, donde se consultó y filtró los datos meteorológicos diarios de la Dirección Meteorológica de Chile, disponibles en: <https://climatologia.meteochile.gob.cl/application/publicaciones/reporteClimatologico>

Registro, estimulación y análisis.

Disección por voltaje:

Los registros de célula única se realizaron en la configuración de célula completa con pipetas (5-7 M Ω) llenas de solución intracelular de CsOH que contenía (en mM): 131.0 ácido glucónico, 111 CsOH, 10.0 EGTA, 10.0 EGTA, 1.8 glucosa, 1,0 CaCl₂, 8 NaCl, 5.0ATP-Mg² y 0.4 GTP-Na⁺, conectadas a un amplificador de PC ONE (Molecular Devices), filtrado a 3,0 kHz, muestreado a 4.0 kHz usando un convertidor análogo digital (Axon-Digidata 1550-Molecular Devices) y almacenado con el software Complex (Molecular Devices). Todos los experimentos de esta sección se realizaron en presencia del antagonista del receptor NDMA, ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico: APV (50 μ M), para prevenir la potenciación a largo plazo (Bartley & Dobrunz, 2015).

Todas las respuestas evocadas se obtuvieron haciendo uso de una unidad de estimulación (World Precisión Instruments, modelo: A365, USA) conectada a un electrodo septado y colocado en el estrato radiatum estimulando las colaterales de Schaffer (Fig. 3). Los experimentos/registros comenzaron después de un período de estabilización de 10 minutos después de la entrada del electrodo de parche en el medio intracelular. Las grabaciones de la pinza de voltaje fueron rechazadas cuando la resistencia de acceso aumentó un 20% durante el experimento. Todas las drogas utilizadas en este estudio fueron colocadas directamente en el sistema de perfusión de 25 mL de ACSF y se esperó 10 minutos para registrar los efectos.

Todos los registros se analizaron en el software Clamp-fit de Molecular Devices (USA) lo que permitió la detección visual de eventos. Solo los eventos con amplitudes superiores a 5,0 pA, un decaimiento exponencial y una fase ascendente monótona se consideraron corrientes espontáneas o en miniatura según sea el caso.

1. Registro de corrientes espontáneas.

Debido a que en la epilepsia se ha descrito un desbalance entre la excitación y la inhibición (Terauchi et al., 2010; Yun et al., 2019; Wang et al. , 2021) y con la finalidad de caracterizarle, evaluamos la transmisión sináptica espontánea, para ello se obtuvieron registros en fijación de voltaje de neuronas piramidales de CA1 parchadas ciegamente a dos potenciales de membrana (PM) distintos, primero fijando el potencial de membrana a 0 mV, correspondiente equilibrio de la transmisión glutamatérgica (E_R -IAMPA), donde se registraron y midieron las amplitudes y frecuencias de las corrientes postsináptica inhibitorias espontáneas (sIPSCs), luego se fijó el potencial de membrana a -65 mV, correspondiente potencial de equilibrio de la transmisión glutamatérgica (E_R -IGABA_A), donde se registraron y midieron las amplitudes y frecuencias de las corrientes postsináptica excitadoras espontáneas (sEPSCs).

2. Registro de corrientes evocadas.

Además, para evaluar el balance entre la excitación y la inhibición en la transmisión sináptica evocada, se registraron las corrientes postsinápticas resultantes de la estimulación de las colaterales de Schaffer mediante un pulso simple de corriente a un potencial de membrana intermedio entre los potenciales de equilibrio de GABA y AMPA, que osciló entre -35 y -40 mV debido a que se eligió el potencial de membrana donde las amplitudes de las respuesta excitatorias o inhibitorias fueran intermedias entre sí (ver controles más abajo). En este potencial, se pudo registrar tanto el componente excitador monosináptico como el inhibidor disináptico (Pouille & Scanziani, 2001), y se midieron las amplitudes y áreas de cada componente. La relación E/I se calculó como la división algebraica entre las amplitudes o áreas excitadoras e inhibitoras, según el método descrito por Nanou et al. (2018).

Posteriormente, y con la finalidad de estimar cambios en la probabilidad de liberación de la sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas en grupo PTZ-Kindling, se

obtuvieron registros de las corrientes postsinápticas producto de la estimulación de las colaterales de Schaffer mediante un protocolo de pulsos pareados, calculando la relación por pulsos pareados (PPR) como la diferencia en las amplitudes de los picos, entre la segunda y la primera respuesta dividida por la primera (Creager et al., 1980), en aquellos intervalos de tiempo donde dicha diferencia es máxima, la cual varía por estructural cerebral y tipo celular, por ejemplo para neuronas piramidales de CA1 en hipocampo y para la transmisión excitatoria este intervalo inter estímulo es de entre los 80 y 100 ms (Gruart et al; 2012).

Por tanto, a un potencial de membrana de 0 mV se registraron las IPSCs evocadas por pulsos pareados separados por 140 ms, uno de los intervalos donde la relación entre la segunda y primera respuesta es máxima en la transmisión inhibitoria de CA1 (Lee et al., 2021), y bajo la misma premisa pero para la transmisión excitatoria a -65mV, se evocaron las EPSCs por pulsos pareados separados por intervalos de 80 ms (Gruart et al; 2012), calculando así la PPR para cada célula y potencial.

En este mismo orden de ideas, y con el propósito de caracterizar los efectos postsinápticos del proceso de Kindling con PTZ, se calcularon los tiempos de subida y caída de las corrientes evocadas por el primer pulso de estimulación, cálculo que permite detectar posibles cambios en la conductancia de un canal producto de expresión diferencial de subunidades (Rajasekaran et al. 2007). Esta medición se hizo tanto para las corrientes inhibitorias evocadas obtenidas a 0 mV, como para las corrientes excitadoras evocadas obtenidas a -65 mV.

3. Registro de corrientes espontáneas en miniatura.

Se caracterizó la transmisión sináptica espontánea independiente de potenciales de acción, en presencia TTX y APV se registraron y midieron las corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura (mIPSCs), y las corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (mEPSCs) en neuronas piramidales de CA1, parchadas a potenciales de membrana de 0mV y -65mV respectivamente. El TTX se

utilizó para imposibilitar la entrada excitatoria proveniente de las colaterales de Schaffer sobre las interneuronas PV y CCK, interrumpiendo el circuito sináptico CA3-Interneurona-CA1 (Ahmed et al., 2021) y de esta forma, también caracterizar la transmisión sináptica espontánea monosináptica tanto para el componente excitador como para el inhibidor.

4. Controles.

Se registraron las sEPSCs a -65 mV en presencia de APV, y se evaluó el efecto del antagonista del receptor AMPA, Cianquixalina: CNQX (10 μ M), así como las sIPSCs a 0 mV en presencia de APV y el efecto del antagonista del receptor GABA_A, Picrotoxina: PTX (10 μ M). Además, se llevó a cabo un protocolo para demostrar el potencial de equilibrio de la transmisión excitatoria (ER-IAMPA = 0 mV) e inhibitoria (ER-IGABA_A = -65 mV) en nuestra solución antes de cada experimento de esta sección. Para ello, se fijó el voltaje de membrana desde -80 mV hasta +20 mV en pasos de 10 mV, y se estimularon las Colaterales de Schaffer. Esto permitió observar cuando las amplitudes de las respuestas evocadas compuestas E/I eran intermedias entre sí (Fig. 2). Por ejemplo, el registró de una célula a -35 mV, responde al hecho de que a -30 mV esta célula presentó una amplitud máxima del componente inhibidor con respecto al excitador, mientras que a -40 mV la amplitud de la excitación era máxima con respecto a la inhibición.

Finalmente, se registró la respuesta compuesta en una célula epiléptica a un potencial de membrana de aproximadamente -35/-40 mV, con y sin PTX para eliminar el componente inhibitorio y evaluar solo el componente excitatorio de la respuesta compuesta E/I (Fig. 6B).

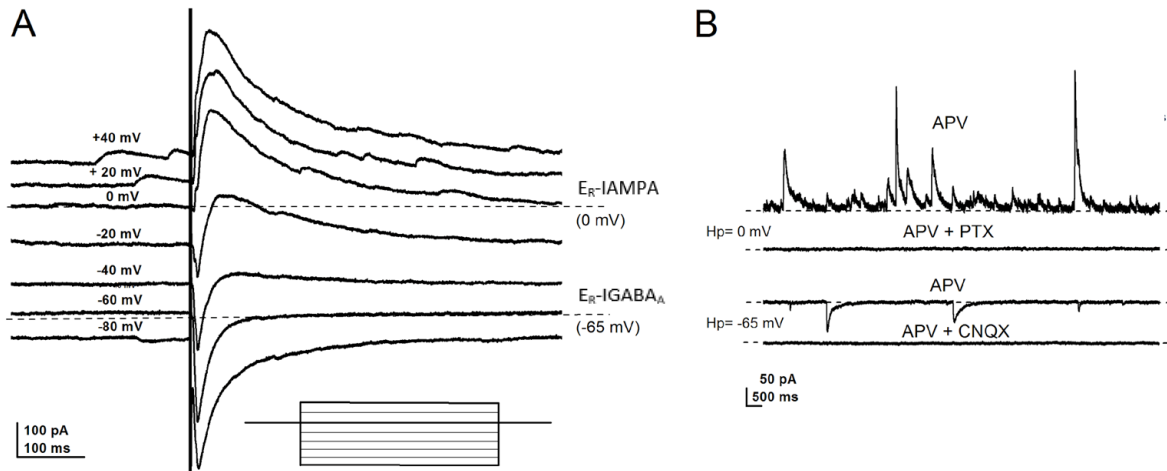


Figura 2. Controles de la disección por voltaje. (A) Potencial de equilibrio para R-IGABA_A (-65 mV) y R-IAMPA (0 mV). (B) Arriba, sIPSCs a 0 mV con y sin PTX; Abajo, sEPSCs a -65 mV con y sin CNQX. E = Potencial de equilibrio.

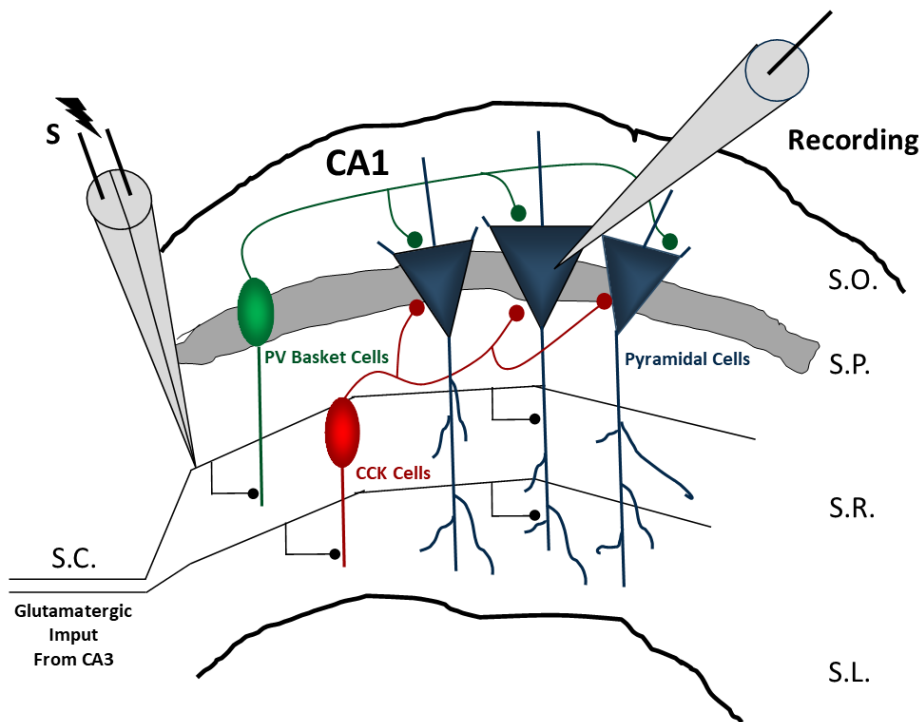


Figura 3. Configuración de registro y estimulación en la disección por voltaje. Fibra de las colaterales de Schaffer estimulada para el balance E/I de una neurona piramidal CA1. S: Electro de estimulación, S.C.: Colaterales de Schaffer, CA1: Cornu Ammonis 1, PV Basket Cells: interneuronas en canasta parvoalbumina positivas, CCK Cells: interneuronas colecistoquinina positivas, Pyramidal Cells: Células piramidales de CA1, S.O.: Stratum Oriens, S.P.: Stratum Pyramidale, S.R.: Stratum Radiatum, S.L.: Stratum Lacunosum-moleculare.

Integración temporal de células piramidales de CA1.

El registro en configuración de célula entera y fijación de corriente se realizaron en CA1 con pipetas de parche (4-7 M Ω) llenas de una solución interna de metil-sulfato de potasio que contenía (en mM): 135.0 KMeSO₄, 10.0 KCL, 10.0 HEPES-K⁺, 5.0 NaCl, 5.0 ATP-Mg²⁺ y 0.4 GTP-Na⁺. El protocolo se llevó a cabo con dos unidades de estimulación (World Precisión Instruments, modelo: A365, USA) conectadas a dos electrodos de estimulación septados independientes. Todos los registros se analizaron en el software Clamp-fit de Molecular Devices (USA) lo que permitió la detección visual de eventos.

Los experimentos/registros comenzaron después de un período de estabilización de 10 minutos después de la entrada del electrodo de parche en el medio intracelular. Las grabaciones de la pinza de corriente fueron rechazadas cuando la resistencia de acceso aumentó un 20% durante el experimento. Todas las drogas utilizadas en este estudio fueron colocadas directamente en el sistema de perfusión de 25 mL de ACSF y se esperó 10 minutos para registrar los efectos.

Todos los experimentos de esta sección debido a la gran cantidad de estímulos proporcionados por el protocolo descrito más adelante se realizaron en presencia del antagonista del receptor GABA_B: CGP-62349 (1 μ M), para prevenir la reducción dependiente de la actividad en la liberación de glutamato de los receptores localizados presinápticamente en las sinapsis colaterales de Schaffer (Pouille & Scanziani, 2001; Speed & Dobrunz, 2008). y el antagonista del receptor de NMDA: APV (50 μ M) para bloquear las corrientes mediadas por el receptor NMDA y prevenir la potenciación a largo plazo (Pouille & Scanziani, 2001; Bartley & Dobrunz, 2015).

1. Protocolo de integración temporal.

El balance excitación/inhibición es fundamental para regular la actividad neuronal y sincronizar los potenciales de acción en las neuronas postsinápticas (Carvalho y Buonomano, 2009; Wehr & Zador, 2003; Pouille et al., 2009; Isaacson & Scanziani, 2011). En el hipocampo, la excitación proveniente de CA3 puede activar tanto a las neuronas piramidales como a las interneuronas PV y CCK positivas que regulan la actividad perisomática en CA1 (Tamás et al., 2004). En animales controles, esto resulta en una ventana de integración muy breve de aproximadamente 2 milisegundos (Pouille y Scanziani, 2001). Dado que la desregulación del balance E/I se ha asociado con la epileptogénesis en el hipocampo, decidimos evaluar la probabilidad de disparo de las neuronas piramidales de CA1 mediante un protocolo de integración temporal en animales controles y animales con PTZ-Kindling, donde se espera una desregulación del balance E/I.

Dicho protocolo de integración temporal, comprendió la estimulación subumbral de dos vías independientes (SC1 y SC2, ver figura 4), con un retraso en la estimulación de la segunda vía con respecto a la primera (y viceversa) de 0 ms a 14 ms en intervalos de 0.5 ms; se ajustaron las intensidades de estimulación a modo que a 0 ms de retraso se evocaran en al menos un 90% de los intentos un potencial de acción; para ello, se colocaron dos electrodos en el estrato radiatum estimulando las colaterales de Schaffer y separados unos 300 a 600 μm de la célula registrada como se muestra en la figura 4., y tal como se describe en Pouille & Scanziani, 2001., Finalmente se calculó la probabilidad de disparo como el número de veces en el cual se evocaba un potencial de acción cuando el protocolo se repetía 10 veces para cada intervalo de retraso.

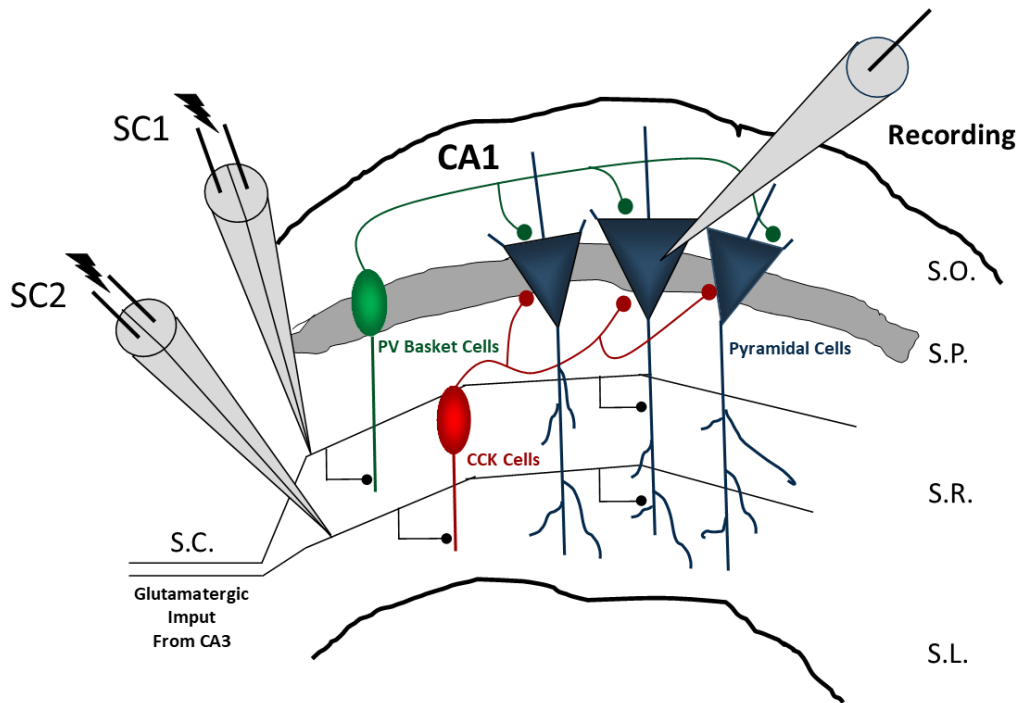


Figura 4. Configuración de registro y estimulación de dos vías independientes. Fibras de las colaterales de Schaffer estimuladas para registrar la integración temporal de una neurona piramidal CA1. SC1: Electrodo de estimulación 1, SC2: Electrodo de estimulación, S.C.: Colaterales de Schaffer, CA1: Cornu Ammonis 1, PV Basket Cells: interneuronas en canasta parvoalbumina positivas, CCK Cells: interneuronas colecistoquinina positivas, Pyramidal Cells: Células piramidales de CA1, S.O.: Stratum Oriens, S.P.: Stratum Pyramidale, S.R.: Stratum Radiatum, S.L.: Stratum Lacunosum-moleculare.

2. Sobre-activación astrocítica e Integración temporal.

Debido a que en los focos epileptogénicos se han descrito niveles elevados de glutamato extracelular, lo que se asocia con una hiperreactividad astrocítica que desencadena un patrón anormal de elevaciones espontáneas de Ca^{2+} en estas células, se ha propuesto que la gliotransmisión de glutamato y la liberación de glutamato neuronal mediante activación del receptor mGluR-5 presináptico podrían estar involucrados en la patogénesis de la epilepsia (Álvarez-Ferradas et al., 2015; Wellmann et al., 2018). Con el objetivo de evaluar el papel de la gliotransmisión en la ventana de integración temporal en animales controles, se decidió sobre-activar astrocitos y esperar conseguir una probabilidad de disparo comparable a los niveles

obtenidos en el grupo PTZ-Kindling, utilizando el mismo protocolo de integración temporal descrito anteriormente.

Por consiguiente, la sobre-activación de los astrocitos se logró colocando directamente sobre la de la cámara de registro (midiendo previamente su volumen aprox. = 1 mL), el agonista del receptor activado por proteasa 1 (PAR1): TFLLR-NH₂ (10μM) un péptido que aumenta específicamente los niveles intracelulares de calcio de los astrocitos (Wang et al., 2002, b; Lee et al., 2007; Shigetomi et al., 2008; Vandell et al., 2008; Hermann et al., 2009; Han et al., 2011; Oh et al., 2012) y promueve la glioliberación de glutamato (Oh et al., 2012; Han et al., 2013). La sobre activación de astrocitos se realizó solo en ratones controles y únicamente en intervalos de retrasos donde se observó previamente un 50% de probabilidad de disparo promedio (6.5 a 7.5 ms, ver fig. 8).

3. Controles.

Antes de iniciar el protocolo de integración temporal, se llevó a cabo una prueba de independencia de las vías. Para ello, se estimularon ambas vías con una separación de 80 ms, en las configuraciones SC1-SC2 (primero se estimulaba con el electrodo 1 o vía 1, y 80 ms después se estimulaba la vía 2) o configuración SC2-SC1. Si las vías eran independientes, no se observaría una facilitación por pulsos pareados a 80 ms, por lo contrario, si los dos electrodos estuvieran en la misma vía, esto provocaría una facilitación por pulsos pareados debido a la plasticidad a corto plazo (PPR config. SC1-SC2, WT = 0.87 ± 0.08 , n=8 vs PTZ = 0.84 ± 0.11 , n=8; p=0.9983; PPR config. SC2-SC1: WT = 1.05 ± 0.18 , n=8; vs PTZ = 1.09 ± 0.14 , n=8; p=0.6405, ver figura 8).

Finalmente, para determinar si los cambios observados en este estudio fueron atribuibles a alteraciones en las propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales de CA1, se evaluaron diversas características electrofisiológicas de estas células, incluyendo el potencial umbral, la frecuencia de disparo, la resistencia de entrada, el potencial de membrana en reposo, la capacitancia y la constante de

tiempo Tau. Los resultados de la tabla 2 indicaron que no hubo diferencias significativas entre el grupo control y el grupo PTZ-Kindling en ninguna de estas medidas, lo que sugiere que los cambios observados en la integración temporal no se debieron a alteraciones en las propiedades intrínsecas de las neuronas.

Tabla 2. Efecto del PTZ-kindling en las propiedades intrínsecas de neuronas piramidales de CA1.

Propiedad intrínseca	WT	PTZ	Significancia (p)
Potencial umbral (mV)	-42.30±1.46	-43.00±1.34	0.8493 ^ϕ
Frecuencia de disparo (Hz)	2.13±0.23	2.50±0.31	0.5281 ^ϕ
Resistencia de entrada (MΩ)	148.17±9.21	141.32±5.73	0.5274
Potencial de membrana en reposo (mV)	-61.54±0.40	-61.89±0.59	0.9999 ^ϕ
Capacitancia (pF)	248.50±11.98	294.52±23.89	0.1147
Tau (ms)	36.39±2.10	42.03±4.08	0.2510

Los datos se obtuvieron de un total de 9 células piramidales controles y 10 PTZ. Estadística: Test de Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov para distribuciones, prueba t de Student para comparaciones simples para distribuciones normales y prueba no paramétrica de Mann-Whitney de comparación de rangos para distribuciones no normales^ϕ.

Análisis estadísticos.

Se realizó un análisis de distribución con las pruebas de Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov. Los datos con distribución normal se compararon con la prueba t de Student o ANOVA de una vía, mientras que los datos no normales se compararon con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Los datos se presentan como media ± SEM y las diferencias con p <0,05 se consideraron estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Fenotipificación del comportamiento epileptogénico en PTZ-kindling.

Cada día y posteriormente a la inyección de PTZ, los animales fueron observados para analizar su comportamiento durante una hora, analizándose dos componentes fenotípicos: el promedio de los estadios alcanzados en cada día de inyección y el promedio de la duración del estadio 5 (Fig. 5). Destacamos que a medida que el protocolo avanza, tanto la severidad de los estadios (Fig. 5A) como la duración de crisis de estadio 5 promedio aumenta (Fig 2B Día 1: $2,31 \pm 2,32$ seg. $n=1$ vs día 7: $33,31 \pm 4,36$ seg. $n=21$). 22 animales fueron utilizados en el grupo PTZ-kindling donde un 96% sobrevivió al protocolo ($n=21$) y un 4% murió en uno de los días de inyección ($n=1$).

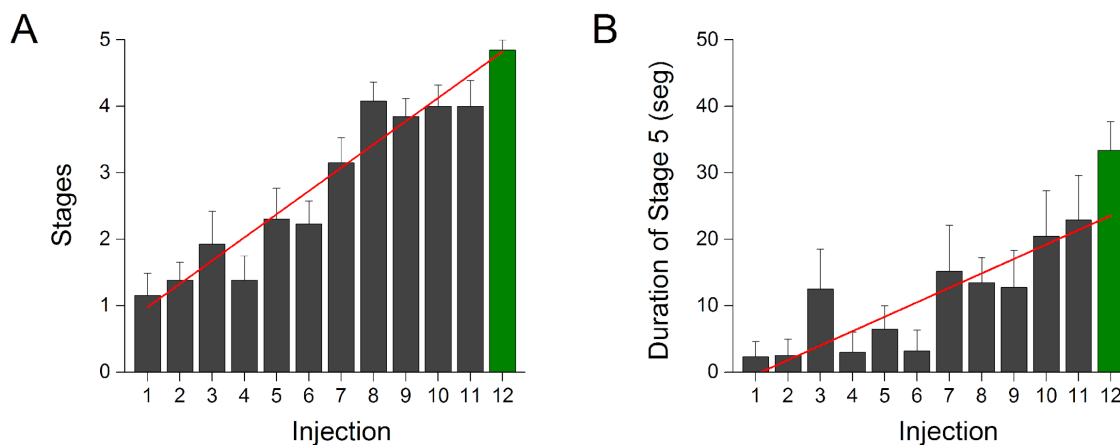


Figura 5. Fenotipo de comportamiento epileptogénico inducido por PTZ. (A) Promedio de los estadios alcanzados en cada dosis administrada. (B) Duración media de las crisis estadio 5. En las dos figuras se muestra un ajuste de regresión lineal (línea roja) con un valor r de Pearson de 0,98 (Sub-fig. A); 0,86 (Sub-fig. B).

Efecto del PTZ-kindling en el balance Excitación/Inhibición evocado en neuronas piramidales de CA1.

La hiperexcitabilidad neuronal descrita en la red epiléptica se ha asociado con un aumento de la neurotransmisión glutamatérgica concomitante a una disminución de la neurotransmisión GABAérgica (Stief et al., 2007; Kondziella et al., 2003; El-Hassar et al., 2007). Sin embargo, no se sabe bien si se produce un desequilibrio sináptico excitatorio/inhibitorio (E/I) en el modelo de PTZ-kindling.

Se evaluó la transmisión glutamatérgica y GABAérgica registrando las EPSCs y el IPSCs evocados por la estimulación eléctrica de las colaterales de Schäffer mediante un protocolo de pulsos pareados en una misma neurona piramidal de CA1. Tanto en el grupo PTZ-kindling como en el control, en promedio las IPSCs (registrando al potencial de membrana de 0 mV) mostraron una respuesta no facilitadora de PPR al protocolo de pulso pareados, sin diferencias significativas entre los grupos (Figura 6A, arriba; PTZ; 0.66 ± 0.04 , $n = 17$, vs control; 0.74 ± 0.07 , $n=13$; $P=0.3245$). Sin embargo, al analizar el tiempo de subida del primer IPSC encontramos un aumento significativo en el grupo PTZ (Figura 6A, arriba; PTZ; 16.81 ± 1.58 ms, $n = 17$, vs control; 10.53 ± 2.23 ms, $n=8$; $P=0.0323$) sin cambios significativos en el tiempo de decaimiento (Figura 6A, arriba; PTZ; 98.35 ± 15.54 ms, $n = 7$, vs control; 83.60 ± 2.43 ms, $n=5$; $P=0.2896$). En cuanto los EPSCs (registrado en a un potencial de membrana de -65 mV) mostró una menor PPR en PTZ que el control (Figura 6A, abajo; PTZ; 1.02 ± 0.06 , $n=17$, vs control; 1.52 ± 0.12 , $n=13$; $P=0.0007$), sin cambios significativos en el tiempo de subida (Figura 6A, abajo; PTZ; 6.97 ± 0.54 ms , $n=16$, vs control; 6.09 ± 0.39 ms, $n=10$; $P=0.2375$) o en el de decaimiento (Figura 6A, abajo; PTZ; 41.24 ± 2.47 ms, $n=16$, vs control; 44.40 ± 2.56 ms, $n=10$; $P=0.4053$) del primer EPSC.

Estos hallazgos sugieren que en el grupo PTZ la probabilidad de liberación (P_r) de las sinapsis glutamatérgicas es mayor que el control, mientras que para la sinapsis GABAérgicas es similar al control, mostrándonos un cambio presináptico. Sin embargo, debido al aumento del tiempo de subida de las IPSCs evocadas descritas en el grupo PTZ

probablemente los receptores de GABA_A posean una menor conductancia, indicándonos un cambio de la transmisión inhibitoria asociada a la postsinápsis en el modelo de PTZ-kindling.

En segundo lugar, comparamos las corrientes en las neuronas piramidales de CA1 evocadas por la estimulación de aferentes excitatorios monosinápticas (CA3-CA1) y las vías inhibitoras disinápticas (CA3-interneurona-CA1) a un potencial de membrana de entre -35mV a -40 mV calculando la relación E/I. Encontramos que tanto la amplitud como el área de la relación E/I fueron mayores en el grupo PTZ en contraste con el grupo control (Figura 6B; Amplitud; PTZ; 1.98 ± 0.30 , n=12, vs control; 0.82 ± 0.10 , n=9; P=0.0039; Área, PTZ, 0.3045 ± 0.0780 , n=12, vs control, 0.1055 ± 0.0256 , n=9, P =0,0334). Además, y como control en una célula epiléptica y a aprox. -35/-40 mV se registró la respuesta compuesta con o sin presencia de PTX, eliminando el componente inhibitor y solo dejando excitador de la respuesta compuesta E/I.

Juntos, estos hallazgos sugieren fuertemente que en ratones PTZ, la transmisión glutamatérgica se encuentra al alza, interrumpiendo el índice E/I hacia la excitación por encima de la inhibición en las vías sinápticas que controlan la función de entrada/salida de neuronas piramidales CA1.

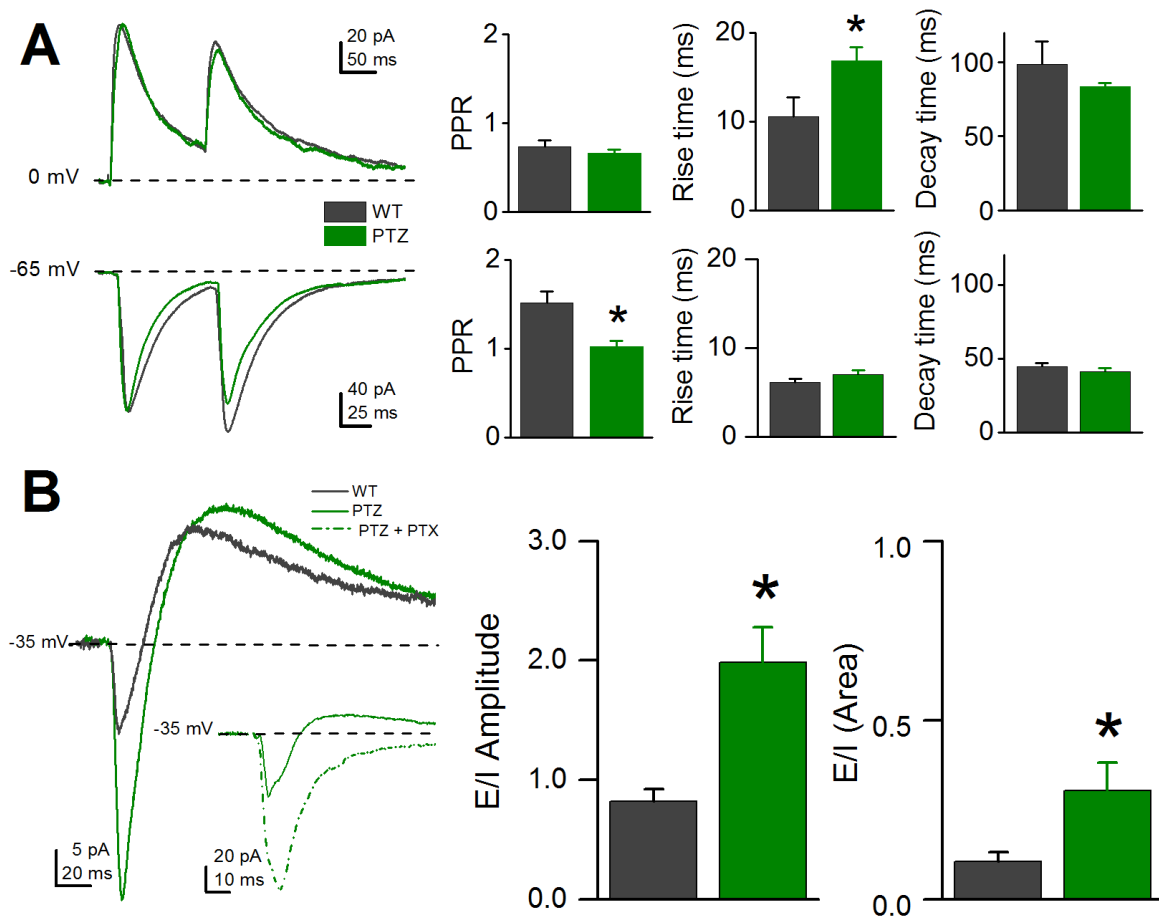


Figura 6. Efecto del PTZ-kindling en la relación Excitación/Inhibición de la transmisión sináptica evocada. (A) Izquierda: Trazos representativos de IPSCs (arriba) y EPSCs (abajo) evocadas por protocolo de pulsos pareados. Derecha: Relación de pulsos pareados, Tiempo de subida y decaimiento del primer pulso de la transmisión inhibitoria (arriba) y excitatoria (abajo) evocada. (B) Izquierda: Trazos representativos de las corrientes postsinápticas compuesta por excitación e inhibición en presencia de APV a -35 mV con y sin presencia de PTX. Derecha: Índice Excitación/Inhibición como la división algebraica de la amplitud o área de las corrientes Excitadoras/Inhibidoras. Estadística: Test de Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov para distribuciones, prueba t de Student para comparaciones simples (* $p < 0,05$).

Efecto del PTZ-Kindling en la transmisión espontánea de neuronas piramidales de CA1.

Para evaluar cómo cambian los componentes excitadores e inhibidores de la sinapsis de neuronas piramidales de CA1 en el modelo de PTZ-kindling, se caracterizó la transmisión espontánea. Primero, evaluando la vía GABAérgica y glutamatérgica a la neurona piramidal CA1, registrando las corrientes postsinápticas inhibitorias y excitatorias espontáneas (sIPSC y sEPSC, respectivamente). Tanto los ratones de control como los PTZ mostraron valores similares de frecuencias sIPSC (Figura 7A, izquierda; control; 3.66 ± 0.51 , $n = 7$ frente a PTZ; 4.12 ± 0.30 , $n = 8$; $p=0.0811$). Sin embargo, el grupo PTZ mostró valores de frecuencia de sEPSC más altos que el grupo control (Figura 7A, derecha; control; 0.27 ± 0.04 , $n=8$ frente a PTZ; 1.29 ± 0.21 , $n=10$; $p=0.0394$). Las amplitudes sIPSC y sEPSC mostraron valores medios similares entre los grupos (sIPSC; PTZ; 10.23 ± 1.15 , $n=8$, vs control; 9.79 ± 0.71 , $n=7$; $P=0.7618$. sEPSC; PTZ; 7.62 ± 0.51 , $n=10$, vs control; 8.11 ± 0.44 , $n=8$; $p=0.4845$, datos no mostrados).

Luego, evaluamos la vía monosináptica directa GABAérgica (interneurona-CA1) y glutamatérgica (CA3-CA1) a la neurona piramidal CA1, registrando en presencia de TTX ($0.1 \mu\text{M}$) las corrientes postsinápticas excitatorias e inhibitorias en miniatura (mIPSCs y mEPSCs, respectivamente). En ratones PTZ, la frecuencia de mIPSCs fue mayor que la del control (Figura 7B, izquierda; PTZ; 1.77 ± 0.20 , $n=8$, control; 0.88 ± 0.25 , $n=7$; $p=0.0500$), así como la frecuencia de mEPSCs, que mostró valores más altos en comparación con el grupo control (Figura 7B, derecha; PTZ; 0.41 ± 0.05 , $n=10$, control; 0.27 ± 0.04 , $n=8$; $p=0.0500$). Las amplitudes de mIPSCs y mEPSCs mostraron valores medios similares entre los grupos (mIPSCs; PTZ; 10.23 ± 1.15 , $n=8$, vs control; 9.79 ± 0.71 , $n=7$; $p=0.7618$. mEPSCs; PTZ; 7.62 ± 0.51 , $n=10$, vs control; 8.11 ± 0.44 , $n=8$; $p=0.4845$. datos no mostrados).

Juntos, estos hallazgos sugieren fuertemente que en los ratones PTZ-kindling, la probabilidad de liberación de glutamato es mayor en comparación con el grupo control tanto en la transmisión espontánea disináptica como en la monosináptica. Sin embargo, la transmisión GABAérgica se encuentra únicamente aumentada en su vía monosináptica

directa, lo cual podría sugerir un posible mecanismo de compensación mediado por la transmisión inhibitoria en la epilepsia.

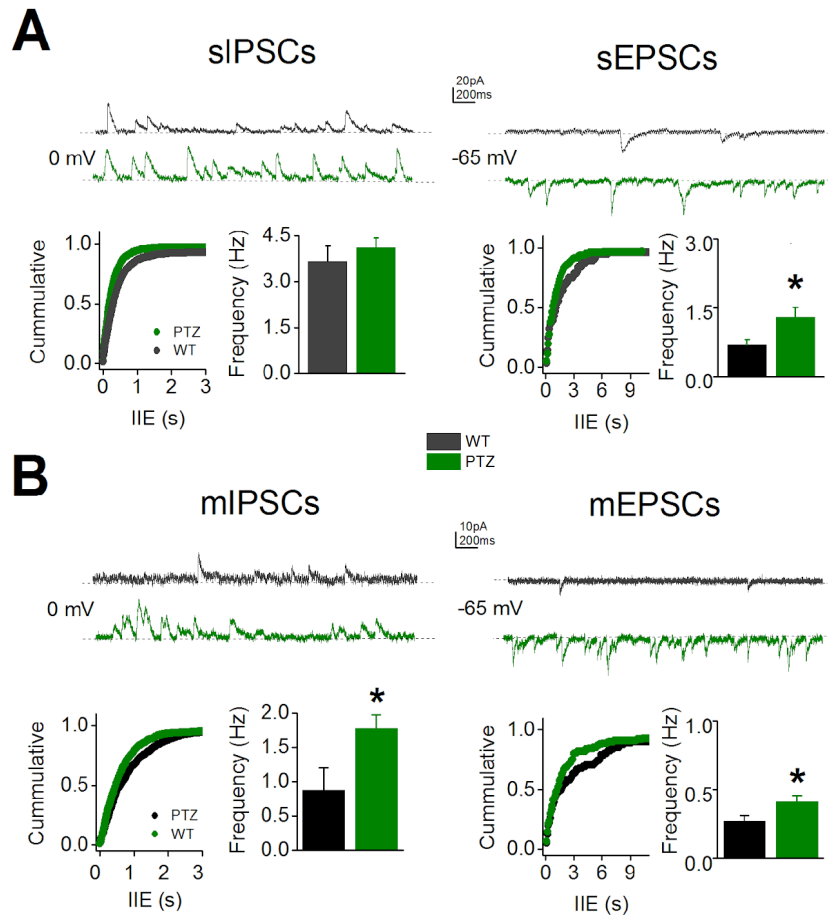


Figura 7. Efecto del PTZ-kindling en la transmisión disináptica y monosináptica espontánea. (A) Izquierda: trazos representativos de las sIPSCs (arriba), respectivo gráfico de probabilidad acumulada de intervalos Inter-Evento y gráfico de barras para la frecuencia media (abajo). Derecha: trazos representativos de las sEPSCs (arriba), respectivo gráfico de probabilidad acumulada de intervalos Inter-Evento y gráfico de barras para la frecuencia media (abajo). (B) Izquierda: trazos representativos de las mIPSCs (arriba), respectivo gráfico de probabilidad acumulada de intervalos Inter-Evento y gráfico de barras para la frecuencia media (abajo). Derecha: trazos representativos de las mEPSCs (arriba), respectivo gráfico de probabilidad acumulada de intervalos Inter-Evento y gráfico de barras para la frecuencia media (abajo). Estadística: Test de Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov para distribuciones, prueba t de Student para comparaciones simples para distribuciones normales (Frecuencia de sIPSCs, mIPSCs y mEPSCs) y prueba no paramétrica de Mann-Whitney de comparación de rangos para distribuciones no normales (Frecuencia de sEPSCs) (* $p < 0,05$).

Efecto del PTZ-kindling y sobre-activación astrocítica en la probabilidad de disparo de neuronas de CA1.

Debido a que la transmisión glutamatérgica se encuentra al alza en el modelo de PTZ-kindling interrumpiendo la relación E/I hacia la excitación por encima de la inhibición en las vías sinápticas que controlan la función de entrada/salida de Neuronas piramidales de CA1, y destacando que el balance E/I es importante para regular el nivel general de actividad en las neuronas postsinápticas (Carvalho & Buonomano, 2009), controlando la integración de múltiples entradas y la sincronización de potenciales de acción (Wehr & Zador, 2003 ; Pouille et al. , 2009 ; Isaacson & Scanziani, 2011), se evaluó la probabilidad de disparo de neuronas piramidales de CA1, cuando dos vías independientes fueron estimuladas subumbralmente, con retrasos del segundo pulso con respecto al primero de 0 ms hasta 14 ms (Figura 8A y 8B, arriba).

La independencia de las vías se probó estimulando dos vías con un retraso de 80 ms en la configuración SC1-SC2 (primero se estimulaba con electrodo SC1 y, 80 ms después el SC2) o configuración SC2-SC1 (figura 8A, arriba). Si las vías son independientes, entonces no debería verse una facilitación por pulsos pareados a 80 ms; si los dos electrodos estuvieran en la misma vía, esto provocaría una facilitación por pulsos pareados debido a la plasticidad a corto plazo, supuesto que al no cumplirse al comparar las PPR de cada configuración entre grupos (Figura 8A, abajo; PPR config. SC1-SC2, WT = 0.87 ± 0.08 , n=8 vs PTZ = 0.84 ± 0.11 , n=8; p=0.9983; PPR config. SC2-SC1: WT = 1.05 ± 0.18 , n=8; vs PTZ = 1.09 ± 0.14 , n=8; p=0.6405) o entre configuraciones (Figura 8A, abajo; WT SC1-SC2 vs SC2-SC1, p = 0.7635; PTZ SC1-SC2 vs SC2-SC1, p=0.5374) nos asegura la independencia de vías. Posteriormente se ajustaron las intensidades subumbrales de estimulación hasta evocar en al menos en un 90% de los intentos un potencial de acción en neuronas piramidales cuando los dos electrodos estimulan simultáneamente (figura 8B. arriba-izquierda, 0 ms de retraso).

Una vez configurado el sistema, se retrasó el segundo pulso con respecto al primero en ambas configuraciones en pasos de 0.5 ms desde los 0 ms hasta los 14 ms; registrando durante 10 barridos/por retraso la probabilidad de disparo producto de la suma de los

estímulos separados temporalmente, encontrándose que 0 ms las probabilidades de disparo de ambos grupos eran prácticamente del 100% (Figura 8B, abajo, 0 ms delay; PTZ; $99.05 \pm 0.66 \%$, n=10, vs control; $95.71 \pm 1.73 \%$, n=7; P=0.0718) mientras que a retrasos de entre 6.5 a 7.5 ms los animales controles presentaban una probabilidad cercana del 50% y los animales PTZ una probabilidad de disparo significativamente mayor (Figura 8B, abajo, 6.5-75 ms delay; PTZ; $75.15 \pm 3.58 \%$, n=10, vs control; $49.04 \pm 6.84 \%$, n=7; p=0.0030).

Estos hallazgos sugieren que la hiperexcitabilidad descrita en la epilepsia podría aumentar la ventana de tiempo durante la cual las células piramidales de CA1 son capaces de integrar múltiples entradas, permitiendo que dos estímulos subumbrales y menos coincidentes desencadenan un potencial de acción, probablemente aumentando la excitabilidad de salida del circuito hipocampal.

Además, debido a que se ha descrito niveles elevados de glutamato extracelular en focos epileptogénicos (Glass & Dragunow, 1995), asociados a una hiperreactividad astrocítica que desencadena un patrón anormal de elevaciones espontáneas de Ca^{2+} en estas células, mejorando la gliotransmisión de glutamato y la liberación de glutamato neuronal mediante activación del receptor mGluR-5 presináptico (Álvarez-Ferradas et al., 2015; Wellmann et al., 2018), decidimos evaluar el papel de la gliotransmisión en la ventana de integración temporal de animales controles.

Encontramos que la sobre-activación astrocítica con el agonista del receptor activado por proteasa 1 (PAR1): TFLLR-NH2 ($10\mu M$) que promueve la glioliberación de glutamato (Oh et al. 2012; Woo et al. 2012; Han et al. 2013), aumenta la probabilidad de disparo de neuronas de CA1 en animales controles de manera significativa y a niveles comparables con lo registrado en tejido epiléptico (Figura 8B, abajo-derecha. 6.5-75 ms delay; WT-TFLLR; $79.15 \pm 5.68 \%$, n=4, vs control, p=0.0078); vs PTZ p=0.8787). En conjunto, estos resultados sugieren que los astrocitos participan activamente en la regulación de la probabilidad de disparo de neuronas piramidales de CA1.

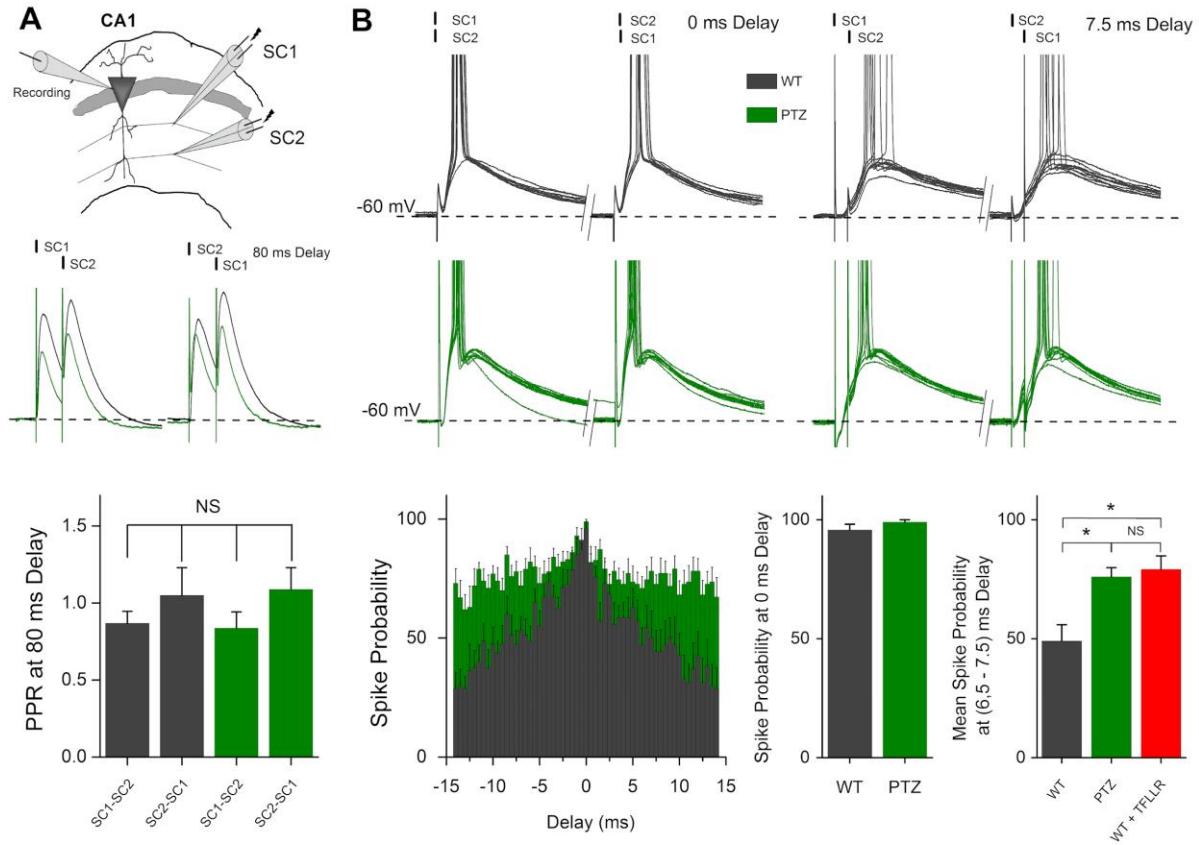


Figura 8. Efecto del PTZ-kindling y sobre-activación astrocítica en la probabilidad de disparo de CA1. (A) Arriba: Configuración de registro y estimulación de dos vías (fibras) independientes y trazos de representativos de EPSPs evocados con 80 ms de retraso entre vías independientes. Abajo: Relación de pulsos pareados de EPSPs evocados con 80 ms de retraso entre vías independientes para las configuraciones SC1-SC2 y SC2-SC1 (B) Arriba: 10 trazos representativos de potenciales de acción (aciertos) o EPSPs (fallos) evocados por estimulación de dos vías independientes con 0 ms de retraso inter-estímulos (izquierda) y con 7.5 ms de retraso inter-estímulos (derecha) para el grupo control (WT) en gris y para el grupo experimental (PTZ) en verde. Abajo: Probabilidad de disparo graficada contra el retraso del segundo estímulo (izquierda), gráficos de barras para probabilidad de disparo a 0 ms de retraso (mitad) y para la probabilidad de disparo promedio entre 6.5 y 7.5 ms de retraso, para los grupos control, PTZ y control en presencia de TFLLR (derecha). Estadística: Test de Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov para distribuciones, Anova de un factor para comparaciones múltiples (* $p < 0,05$).

DISCUSIÓN

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la regulación del balance E/I en sinapsis CA3-CA1 de ratones kindleados con PTZ, caracterizando los cambios en la relación E/I al registrar corrientes evocadas compuestas, generadas por la estimulación de aferentes excitatorios monosinápticos (CA3-CA1) y vías inhibitoras disinápticas (CA3-interneurona-CA1). Además, y sabiendo que el balance E/I es importante para regular el nivel de actividad en las neuronas postsinápticas, se caracterizó la probabilidad de disparo producto de integración temporal de neuronas piramidales de CA1 en animales PTZ, y su probable relación con activación astrocítica en animales controles.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que en el hipocampo de ratones sometidos a PTZ-kindling, la transmisión glutamatérgica se encuentra aumentada, lo que genera un desequilibrio en el balance E/I favoreciendo la excitación por encima de la inhibición. Esto se debe al incremento en la eficacia sináptica glutamatérgica, el cual se evidencia por el aumento en la probabilidad de liberación en las sinapsis glutamatérgicas del circuito CA3-CA1. Además, se ha observado una posible disminución en la conductancia de los canales de GABA_A y un aumento en la frecuencia de la transmisión inhibitoria en miniatura.

Finalmente, se observa que la probabilidad de disparo producto de la integración temporal de neuronas piramidales de CA1, inducida por estimulación de dos vías independientes, está significativamente incrementada en animales sometidos a PTZ-Kindling. Además, se evidencia que la sobreactivación astrocítica en animales controles aumenta la probabilidad de disparo a niveles similares a los obtenidos en tejido epiléptico.

Aumento de la excitación en el balance E/I en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo epiléptico.

La epilepsia se ha asociado con la pérdida del equilibrio normal entre la actividad sináptica glutamatérgica y GABAérgica, lo que altera la modulación de la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal (Álvarez-Ferradas et al., 2015; Wellmann et al., 2018; McDonald et al., 1991; Olsen et al., 1992; During et al., 1995; Khazipov et al., 2015; Campbell & Hablitz, 2004; Demarque et al., 2004). Estudios in vitro e in vivo de modelos preclínicos de convulsiones han demostrado que este desequilibrio interrumpe el umbral de excitación y resulta en la aparición de convulsiones (Sánchez & Loddenkemper, 2014).

En nuestro modelo de PTZ-Kindling, hemos obtenido resultados que concuerdan con datos publicados en un modelo de epileptogénesis de kindling químico inducido por pilocarpina. Durante el período de latencia del proceso de epileptogénesis, la transmisión glutamatérgica se encuentra aumentada en la frecuencia y amplitud de sus sEPSCs en neuronas de CA1, pero sin cambios en la transmisión GABAérgica a nivel somático (El-Hassar et al., 2007). Esto demuestra que los cambios globales hacia mayor actividad glutamatérgica en la región de CA1 son característicos de la epileptogénesis.

Aumento de la eficacia sináptica en transmisión glutamatérgica CA3-CA1 de hipocampo epiléptico.

Los resultados obtenidos sugieren que la epileptogénesis inducida por PTZ-Kindling ratones conduce a un aumento en la excitabilidad glutamatérgica, que se relaciona con una mayor probabilidad de liberación de glutamato, tal como se evidencia en la disminución de la facilitación por pulsos pareados (Fig. 6A) y el aumento en la frecuencia de las corrientes excitatorias espontáneas y en miniatura (Fig. 7A y 7B) en el grupo PTZ-Kindling. Este efecto podría estar relacionado con una mayor susceptibilidad del tejido nervioso a desarrollar hiperactividad y crisis convulsivas, lo que puede reducir el umbral de convulsiones y aumentar la sensibilidad al estímulo inductor. Estas características son comunes a los modelos de kindling químico y eléctrico (Gilbert & Goodman, 2006; Perea & Araque, 2007;

Navarrete & Araque, 2010; Morales et al., 2014; Álvarez-Ferradas et al., 2015; Wellmann et al., 2018).

Los cambios relacionados con el aumento de la probabilidad de liberación de glutamato coinciden ampliamente con otras investigaciones realizadas mediante kindling eléctrico en ratas, pues se describe una disminución de la PPR excitatoria en registros intracelulares y un aumento de la frecuencia de las mEPSCs en neuronas de CA1 (Álvarez-Ferradas et al., 2015; Davoudi M. et al., 2013), mientras que ratas con kindling químico mediado por 4-aminopirimidina la facilitación de pulso pareado se pierde totalmente transformándose en una depresión (Peña et al., 2002). Nuestra investigación, en conjunto con otras, corrobora el aumento en la liberación de glutamato y de la actividad de sus receptores (Leung & Au, 1994; Morrisett et al., 1989). Por ejemplo, ya se ha descrito en epilepsia un aumento de la actividad glutamatérgica, asociada a la activación de receptores presinápticos de glutamato metabotrópicos del grupo 1 y 5 (Perea & Araque 2007; Navarrete & Araque 2010; Álvarez-Ferradas et al., 2015; Wellmann et al., 2018).

Finalmente, el aumento de la excitabilidad descrito concuerda con lo obtenido en Omrani otras investigaciones que han usado el PTZ-Kindling en roedores. Además de ser observados niveles altos de glutamato en corteza y amígdala (Rocha et al., 1996), se ha informado ampliamente que a pesar de que la pendiente del potencial postsináptico excitatorio de campo (fEPSP) no se ve afectada, la amplitud de la espiga poblacional aumenta por el tratamiento con PTZ en hipocampo (Zhao & Leung, 1991; Palizvan et al., 2001; Gholami et al., 2020), formando deformaciones (potenciales de acción) dobles o múltiples del fEPSP en neuronas piramidales de CA1 (Zhao & Leung, 1991; Qian et al., 2011) o en células granulares del giro dentado (Stringer, 1995; Robinson et al., 1991; Fathollahi et al., 1997; Rüttrich et al., 2001). Este fenómeno es un signo de la epileptogénesis y del aumento de la hiperexcitabilidad en el circuito hipocampal, dado que la amplitud de la espiga poblacional refleja el número y la sincronía de las descargas de las neuronas piramidales.

Cambios en la transmisión inhibitoria del hipocampo epiléptico: componentes pre y postsinápticos.

Nuestros resultados indican que los ratones kindleados con PTZ presentan una posible disminución de la conductancia de los canales de GABA_A, evidenciada por el aumento del tiempo de subida de las IPSCs evocadas (Fig. 6A) e indicando una disminución de la fuerza de la transmisión inhibitoria asociada con la postsinápsis. Sin embargo, la transmisión inhibitoria se encuentra aumentada únicamente en su vía monosináptica directa y debido a un alza en frecuencia de las mIPSCs, un fenómeno directamente asociado con la presinápsis (Fig. 7B), sugiriéndonos un posible mecanismo de compensación mediado por GABA en la epileptogénesis.

Estudios previos también han informado sobre cambios en la transmisión inhibitoria en modelos de epilepsia. Por ejemplo, en un modelo de Kindling eléctrico en ratas, se ha descrito un aumento del tiempo de subida de las sIPSC en tejido epiléptico del tálamo dorsomedial y paraventricular (Rajasekaran et al. 2007), lo cual es consistente con nuestros resultados en ratones kindleados con PTZ. Asimismo, en ratas kindleadas con PTZ, se ha reportado una disminución en la captación de Cl⁻ dependiente de receptores GABA_A en la corteza cerebral (Corda et al., 1990), lo cual podría estar relacionado con una menor unión del GABA a los receptores de benzodiazepinas en este modelo (Rocha et al. 1996). Estos hallazgos sugieren que los cambios en la transmisión inhibitoria en modelos de epilepsia están asociados a modificaciones postsinápticas mediadas por GABA.

En consecuencia, el aumento del tiempo de subida de las IPSCs evocadas sugiere que la administración de PTZ puede resultar en una importante disminución de los sistemas inhibidores, lo que contribuiría al aumento de la excitabilidad mencionado previamente. Cabe destacar que este efecto no estaría relacionado con el mecanismo de acción del PTZ sobre el R-GABA_A, ya que registros de canal único realizados por el grupo de Huang en 2001 indicaron que el PTZ reduce la probabilidad de apertura al prolongar los estados cerrados, pero no tiene ningún efecto sobre la conductancia de un solo canal o la duración del estado abierto.

Los parámetros de las IPSCs pueden verse afectados por factores pre y postsinápticos, como se ha reportado en estudios previos (Edwards et al., 1990; Otis & Mody, 1992; Ropert et al., 1990). Por ejemplo, la frecuencia de las IPSCs puede ser influenciada por el número de entradas presinápticas y la probabilidad de liberación presináptica. En el presente estudio de epileptogénesis, se observó un aumento en la frecuencia de la transmisión inhibitoria en miniatura (vía monosináptica directa). Estos hallazgos contrastan con lo reportado en modelos de epilepsia crónica con PTZ en ratas, donde se ha observado una disminución de la frecuencia y/o amplitud de las mIPSCs en CA1 y giro dentado después de protocolos que incluyen la duplicación o triplicación del tiempo y número de inyecciones de PTZ (Li et al., 2020; Zhang et al., 2023; Kobayashi & Buckmaster, 2003), en comparación con el número de inyecciones utilizadas en nuestro estudio.

Es importante destacar que el aumento de las frecuencias de las mIPSCs no es exclusivo de nuestro modelo PTZ-Kindling, ya que se ha descrito en otros modelos de epilepsia por kindling eléctrico, por lesión del tejido o deleciones génicas en zonas distintas al hipocampo, como el tálamo paraventricular (Rajasekaran et al., 2007), el tálamo en sí (Tan et al., 2008) y en la capa V de la corteza (Prince & Jacobs, 1998). Además, en un modelo de kindling químico de epileptogénesis mediado por pilocarpina en hipocampo, se demostró que las neuronas GABAérgicas se caracterizan por una regulación al alza del transportador vesicular de GABA: VGAT, lo que probablemente refleja un aumento de la actividad presináptica en los estados de latencia de la epileptogénesis (Boulland et al., 2007). Este hallazgo puede ser un posible mecanismo que explique el aumento de las mIPSCs que hemos descrito en nuestro modelo PTZ-Kindling.

Finalmente y a pesar de esta aparente discrepancia, no podemos descartar que otros mecanismos específicos permitan explicar nuestros hallazgos, pudiéndose involucrar otros factores presinápticos dependientes de la duración del protocolo de administración del PTZ, así entonces, saber si el aumento en frecuencia de las mIPSCs obtenido en nuestro estudio, representa un mecanismo de compensación mediado por la transmisión inhibitoria en la epileptogénesis, es una pregunta que deberá ser estudiada en profundidad.

Aumento de la probabilidad de disparo producto de la integración temporal de neuronas piramidales de CA1 relacionado con hipocampo epiléptico e inducido por sobre-activación astrocítica.

En primer lugar, es importante destacar que la inhibición de la retroalimentación disináptica regula fuertemente la ventana temporal necesaria para sumar la actividad sináptica (Pouille & Scanziani, 2001; Lamsa et al., 2005; Luna & Schoppa, 2008). Durante poco más de dos milisegundos, dos estímulos subumbrales son sumados produciendo un potencial de acción en aproximadamente el 90-100% de las veces. Esto responde al breve retraso con el que la inhibición de la retroalimentación inhibitoria disináptica (CA3-Interneurona-CA1) sigue a la excitación monosináptica (CA3- CA1) (Pouille & Scanziani, 2001).

En este estudio, se muestra por primera vez que el PTZ-Kindling y la sobre-activación astrocítica aumentan la probabilidad de disparo en las células piramidales de CA1 cuando se trata de integración temporal (Fig. 8B). Estos hallazgos sugieren que la hiperexcitabilidad y el aumento en la probabilidad de disparo en la integración temporal descrita en nuestro modelo de epileptogénesis podría influir en la ventana de tiempo durante la cual las células piramidales de CA1 son capaces de integrar múltiples entradas subumbrales y producir un potencial de acción. Los cambios asociados con el aumento del balance E/I reducen la fidelidad de sincronización de espigas, aumentando la probabilidad de disparo y ensanchando la ventana de integración cuando se evalúa en presencia de PTX (Lamsa et al., 2005; Pouille & Scanziani, 2001).

Así mismo, se ha descrito que los circuitos necesarios para explicar una ventana estrecha se asientan sobre la base de la excitación monosináptica y la inhibición disináptica, y debido a que una potenciación selectiva de la excitación monosináptica (como la obtenida en nuestro modelo, Fig. 7B), es análoga a un debilitamiento relativo de la inhibición disináptica, esta potenciación también provoca un aumento de la probabilidad de disparo y por tanto el ensanchamiento de la ventana de neuronas piramidales de CA1, como se sabe sucede al inducir LTP en hipocampo (Lamsa et al., 2005).

En otros modelos se ha demostrado que la gliotransmisión mediada por glutamato está aumentada en el hipocampo de rata kindleada, presumiblemente como consecuencia de una hiperexcitabilidad astrogliar aumentando la excitación (Álvarez-Ferradas et al. 2015). Basado en ello, en esta investigación se decidió evaluar el papel de la gliotransmisión en la probabilidad de disparo asociada a la integración temporal, encontrando que la sobreactivación de astrocitos en hipocampo del grupo control aumenta la probabilidad de disparo a niveles epileptogénicos, demostrando un papel importante del astrocito dentro la integración de múltiples entradas. Estos hallazgos sugieren que el aumento del balance E/I en ratas kindleadas con PTZ así como la sobre-activación de astrocitos en animales controles parecen ser un nuevo mecanismo de regulación dependiente del astrocito, el cual permitiría regular la ventana de la integración sináptica en el circuito hipocampal.

CONCLUSIONES

1. El modelo PTZ-kindling genera un desbalance de la relación E/I aumentando la excitación por sobre la inhibición.
2. El modelo PTZ-kindling genera un aumento en la probabilidad de liberación en terminales glutamatérgicos de las sinapsis de CA3-CA1, aumentando el tono glutamatérgico en el hipocampo.
3. El modelo PTZ-kindling genera un deterioro de la transmisión inhibitoria asociado a cambios postsinápticos, evidenciados por el aumento el tiempo de subida de las IPSCs evocadas y, una posible menor conductancia del receptor de GABA_A.
4. El modelo PTZ-kindling genera un aumento de la transmisión espontánea monosináptica tanto excitatoria como inhibitoria.
5. El modelo PTZ-kindling produce un aumento de la probabilidad de disparo en neuronas de CA1 producto de una integración temporal.
6. Los astrocitos aumentan la probabilidad de disparo en neuronas de CA1 producto de una integración temporal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed N, Headley DB, Paré D. Optogenetic study of central medial and paraventricular thalamic projections to the basolateral amygdala. *J Neurophysiol.* 2021 Oct 1;126(4):1234-1247. doi: 10.1152/jn.00253.2021. Epub 2021 Sep 1. PMID: 34469705; PMCID: PMC8560422.
2. Akyuz E, Polat AK, Eroglu E, Kullu I, Angelopoulou E, Paudel YN. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. *Life Sci.* 2021 Jan 15;265:118826. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118826. Epub 2020 Nov 28. PMID: 33259863.
3. Álvarez-Ferradas C, Morales JC, Wellmann M, Nualart F, Roncagliolo M, Fuenzalida M, Bonansco C. Enhanced astroglial Ca²⁺ signaling increases excitatory synaptic strength in the epileptic brain. *Glia.* 2015 Sep;63(9):1507-21. doi: 10.1002/glia.22817. Epub 2015 May 15. PMID: 25980474.
4. Alves M, Gomez-Villafuertes R, Delanty N, Farrell MA, O'Brien DF, Miras-Portugal MT, Hernandez MD, Henshall DC, Engel T. Expression and function of the metabotropic purinergic P2Y receptor family in experimental seizure models and patients with drug-refractory epilepsy. *Epilepsia.* 2017 Sep;58(9):1603-1614. doi: 10.1111/epi.13850. Epub 2017 Jul 21. PMID: 28733972
5. Andersson M, Blomstrand F, Hanse E. Astrocytes play a critical role in transient heterosynaptic depression in the rat hippocampal CA1 region. *J Physiol.* 2007 Dec 15;585(Pt 3):843-52. doi: 10.1113/jphysiol.2007.142737. Epub 2007 Oct 25. PMID: 17962333; PMCID: PMC2375509.
6. Angulo, M. C., Kozlov, A. S., Charpak, S., & Audinat, E. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 24,6920–6927. 2004.
7. Speed HE, Dobrunz LE. Developmental decrease in short-term facilitation at Schaffer collateral synapses in hippocampus is mGluR1 sensitive. *J Neurophysiol.* 2008 Feb;99(2):799-813. doi: 10.1152/jn.00625.2007. Epub 2007 Nov 21. PMID: 18032567.
8. Bartley AF, Dobrunz LE. Short-term plasticity regulates the excitation/inhibition ratio and the temporal window for spike integration in CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci.* 2015 May;41(11):1402-15. doi: 10.1111/ejn.12898. Epub 2015 Apr 23. PMID: 25903384; PMCID: PMC4767019.
9. Araque, A., Carmignoto, G., & Haydon, P. G. (2001). Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annual Review of Physiology*, 63, 795–813.
10. Bang J, Kim HY, Lee H. Optogenetic and chemogenetic approaches for studying astrocytes and gliotransmitters [Internet]. Vol. 25, *Experimental Neurobiology*. Korean Society for Neurodegenerative Disease; 2016 [cited 2021 Jan 26]. p. 205–21. Available from: /pmc/articles/PMC5081467/?report=abstract
11. Bascuñana P, Javela J, Delgado M, Fernández de la Rosa R, Shiha AA, García-García L, Pozo MÁ. [(18)F]FDG PET Neuroimaging Predicts Pentylentetrazole (PTZ) Kindling Outcome in Rats. *Mol Imaging Biol.* 2016 Oct;18(5):733-40. doi: 10.1007/s11307-016-0950-0. PMID: 27043223.
12. Bazyan AS, Zhulin VV, Karpova MN, Klishina NY, Glebov RN. Long-term reduction of benzodiazepine receptor density in the rat cerebellum by acute seizures and kindling and its recovery 6 months later by a pentylentetrazole challenge. *Brain Res.* 2001 Jan 12;888(2):212-220. doi: 10.1016/s0006-8993(00)03045-6. PMID: 11150477.

13. Becker A, Grecksch G. dTyr-D-Phe3 (Pro-D-Phe-Pro-Gly) interacts specifically with amygdaloid-kindled seizures and is capable of preventing the learning deficit occurring after kindling. *Peptides*. 1992 Jan-Feb;13(1):73-6. doi: 10.1016/0196-9781(92)90142-p. PMID: 1620659.
14. Becker A, Krug M, Schröder H. Strain differences in pentylenetetrazol-kindling development and subsequent potentiation effects. *Brain Res*. 1997 Jul 18;763(1):87-92. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00409-5. PMID: 9272832.
15. Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., Vescovi, A., Bagetta, G., Kollias, G., Meldolesi, J., & Volterra, A. (2001a). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: Amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nature Neuroscience*, 4, 702–710.
16. Binder DK, Steinhäuser C. Astrocytes and Epilepsy. *Neurochem Res*. 2021 Mar 4. doi: 10.1007/s11064-021-03236-x. Epub ahead of print. PMID: 33661442.
17. Boddum K, Jensen TP, Magloire V, Kristiansen U, Rusakov DA, Pavlov I, Walker MC. Astrocytic GABA transporter activity modulates excitatory neurotransmission. *Nat Commun*. 2016 Nov 25;7:13572. doi: 10.1038/ncomms13572. PMID: 27886179; PMCID: PMC5133667.
18. Boison D. Adenosine dysfunction and adenosine kinase in epileptogenesis. *Open Neurosci J*. 2010 Jan 1;4:93-101. doi: 10.2174/1874082001004020093. PMID: 20730044; PMCID: PMC2923809.
19. Boisvert, M. M. , Erikson, G. A. , Shokhirev, M. N. , & Allen, N. J. (2018). The aging astrocyte transcriptome from multiple regions of the mouse brain. *Cell Reports*, 22, 269–285.
20. Bonansco C, Couve A, Perea G, Ferradas CÁ, Roncagliolo M, Fuenzalida M. Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *Eur J Neurosci*. 2011 Apr;33(8):1483-92. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07631.x. Epub 2011 Mar 14. PMID: 21395864.
21. Bonansco C, Fuenzalida M. Plasticity of Hippocampal Excitatory-Inhibitory Balance: Missing the Synaptic Control in the Epileptic Brain. *Neural Plast*. 2016;2016:8607038. doi: 10.1155/2016/8607038. Epub 2016 Feb 24. PMID: 27006834; PMCID: PMC4783563.
22. Bonansco C, González de la Vega A, González Alegre P, Borde M, Garcá-Segura LM, Buño W. Tetanic stimulation of schaffer collaterals induces rhythmic bursts via NMDA receptor activation in rat CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus*. 2002;12(4):434-46. doi: 10.1002/hipo.10023. PMID: 12201628.
23. Boulland JL, Ferhat L, Tallak Solbu T, Ferrand N, Chaudhry FA, Storm-Mathisen J, Esclapez M. Changes in vesicular transporters for gamma-aminobutyric acid and glutamate reveal vulnerability and reorganization of hippocampal neurons following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol*. 2007 Jul 20;503(3):466-85. doi: 10.1002/cne.21384. PMID: 17503488.
24. Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2005). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of Neuroscience*, 22, 183–192.
25. Campbell SL, Hablitz JJ. Glutamate transporters regulate excitability in local networks in rat neocortex. *Neuroscience*. 2004;127(3):625-35. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.05.030. PMID: 15283962.
26. Carmody S, Brennan L. Effects of pentylenetetrazole-induced seizures on metabolomic profiles of rat brain. *Neurochem Int*. 2010 Jan;56(2):340-4. doi: 10.1016/j.neuint.2009.11.004. Epub 2009 Nov 11. PMID: 19913064.

27. Carvalho TP, Buonomano DV. Differential effects of excitatory and inhibitory plasticity on synaptically driven neuronal input-output functions. *Neuron*. 2009 Mar 12;61(5):774-85. doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.013. PMID: 19285473; PMCID: PMC2676350.
28. Chen LL, Feng HF, Mao XX, Ye Q, Zeng LH. One hour of pilocarpine-induced status epilepticus is sufficient to develop chronic epilepsy in mice, and is associated with mossy fiber sprouting but not neuronal death. *Neurosci Bull*. 2013 Jun;29(3):295-302. doi: 10.1007/s12264-013-1310-6. Epub 2013 Mar 8. PMID: 23471864; PMCID: PMC5561839.
29. Corda MG, Giorgi O, Longoni B, Orlandi M, Biggio G. Decrease in the function of the gamma-aminobutyric acid-coupled chloride channel produced by the repeated administration of pentylentetrazol to rats. *J Neurochem*. 1990 Oct;55(4):1216-21. doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb03127.x. PMID: 1697889.
30. Covelo, A. , & Araque, A. (2018). Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *eLife*, 7, e32237. doi: 10.7554/eLife.32237
31. Creager R, Dunwiddie T, Lynch G. Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. *J Physiol*. 1980 Feb;299:409-24. doi: 10.1113/jphysiol.1980.sp013133. PMID: 7381775; PMCID: PMC1279233.
32. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*. 2008 Jul 30;172(2):143-57. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.04.019. Epub 2008 Apr 26. PMID: 18550176; PMCID: PMC2518220.
33. Datta Chaudhuri A, Dasgheyb RM, DeVine LR, Bi H, Cole RN, Haughey NJ. Stimulus-dependent modifications in astrocyte-derived extracellular vesicle cargo regulate neuronal excitability. *Glia*. 2020 Jan;68(1):128-144. doi: 10.1002/glia.23708. Epub 2019 Aug 30. PMID: 31469478.
34. Demarque M, Villeneuve N, Manent JB, Becq H, Represa A, Ben-Ari Y, Aniksztejn L. Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex. *J Neurosci*. 2004 Mar 31;24(13):3289-94. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5338-03.2004. PMID: 15056708; PMCID: PMC6730015.
35. Dhir A. Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci*. 2012;Chapter 9:Unit9.37. doi: 10.1002/0471142301.ns0937s58. PMID: 23042503t
36. Diaz García, F.F. (2019). Alteración astrogliar en epileptogénesis inducida por Pentilenotetrazol en hipocampo de ratón. [Tesis de magíster, Universidad de Valparaíso]
37. Ding S, Fellin T, Zhu Y, Lee SY, Auberson YP, Meaney DF, Coulter DA, Carmignoto G, Haydon PG. Enhanced astrocytic Ca²⁺ signals contribute to neuronal excitotoxicity after status epilepticus. *J Neurosci*. 2007 Oct 3;27(40):10674-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2001-07.2007. PMID: 17913901; PMCID: PMC2917229.
38. Doengi, M. , Hirnet, D. , Coulon, P. , Pape, H. C. , Deitmer, J. W. , & Lohr, C. (2009). GABA uptake-dependent Ca²⁺ signaling in developing olfactory bulb astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 17570–17575.
39. Duffy S, MacVicar BA. Modulation of neuronal excitability by astrocytes. *Adv Neurol*. 1999;79:573-81. PMID: 10514846.
40. During MJ, Ryder KM, Spencer DD. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature*. 1995 Jul 13;376(6536):174-7. doi: 10.1038/376174a0. PMID: 7603569.
41. During MJ, Spencer DD. Adenosine: a potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann Neurol*. 1992 Nov;32(5):618-24. doi: 10.1002/ana.410320504. PMID: 1449242.

42. Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B. Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J Physiol.* 1990 Nov;430:213-49. doi: 10.1113/jphysiol.1990.sp018289. PMID: 1707966; PMCID: PMC1181735.
43. Egawa, K. , Yamada, J. , Furukawa, T. , Yanagawa, Y. , & Fukuda, A. (2013). Cl(-) homeodynamics in gap junction-coupled astrocytic networks on activation of GABAergic synapses. *The Journal of Physiology*, 591, 3901–3917.
44. Eid T, Gruenbaum SE, Dhaher R, Lee TW, Zhou Y, Danbolt NC. The Glutamate-Glutamine Cycle in Epilepsy. *Adv Neurobiol.* 2016;13:351-400. doi: 10.1007/978-3-319-45096-4_14. PMID: 27885637.
45. Eid T, Thomas MJ, Spencer DD, Rundén-Pran E, Lai JC, Malthankar GV, Kim JH, Danbolt NC, Ottersen OP, de Lanerolle NC. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet.* 2004 Jan 3;363(9402):28-37. doi: 10.1016/s0140-6736(03)15166-5. PMID: 14723991.
46. Ekonomou A, Smith AL, Angelatou F. Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazole-induced 'kindling' model of epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001 Nov 1;95(1-2):27-35. doi: 10.1016/s0169-328x(01)00230-3. PMID: 11687274.
47. El-Hassar L, Milh M, Wendling F, Ferrand N, Esclapez M, Bernard C. Cell domain-dependent changes in the glutamatergic and GABAergic drives during epileptogenesis in the rat CA1 region. *J Physiol.* 2007 Jan 1;578(Pt 1):193-211. doi: 10.1113/jphysiol.2006.119297. Epub 2006 Sep 28. PMID: 17008374; PMCID: PMC2075107.
48. Eloqayli H, Dahl CB, Götestam KG, Unsgård G, Sonnewald U. Changes of glial-neuronal interaction and metabolism after a subconvulsive dose of pentylenetetrazole. *Neurochem Int.* 2004 Oct;45(5):739-45. doi: 10.1016/j.neuint.2004.02.002. PMID: 15234117.
49. Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2018 Jan;139:73-79. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2017.11.015. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29197668.
50. Fathollahi Y, Motamedi F, Semnani S, Zardoshti M. Examination of persistent effects of repeated administration of pentylenetetrazol on rat hippocampal CA1: evidence from in vitro study on hippocampal slices. *Brain Res.* 1997 May 30;758(1-2):92-8. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00164-9. PMID: 9203537.
51. Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P. G., & Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron*, 43, 729–743.
52. Ferecskó AS, Jiruska P, Foss L, Powell AD, Chang WC, Sik A, Jefferys JG. Structural and functional substrates of tetanus toxin in an animal model of temporal lobe epilepsy. *Brain Struct Funct.* 2015 Mar;220(2):1013-29. doi: 10.1007/s00429-013-0697-1. Epub 2014 Jan 18. PMID: 24442865; PMCID: PMC4341026.
53. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* 2014 Apr;55(4):475-82. doi: 10.1111/epi.12550. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24730690.
54. Getova DP, Dimitrova DS. Effects of the anticholinesterase drug tacrine on the development of PTZ kindling and on learning and memory processes in mice. *Folia Med (Plovdiv).* 2000;42(4):5-9. PMID: 15359505.

55. Davoudi M, Shojaei A, Palizvan MR, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J. Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylenetetrazol kindled seizures in the rat. *Epilepsy Res.* 2013 Sep;106(1-2):54-63. doi: 10.1016/j.eplesyres.2013.03.016. Epub 2013 Apr 22. PMID: 23619005.
56. Gholami M, Hosseinmardi N, Mirnajafi-Zadeh J, Javan M, Semnani S, Naghdi N, Fathollahi Y. Long-term potentiation enhancing effect of epileptic insult in the CA1 area is dependent on prior-application of primed-burst stimulation. *Exp Brain Res.* 2020 Apr;238(4):897-903. doi: 10.1007/s00221-020-05766-2. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32166345.
57. Gilbert, M., Goodman, J., (2006). Chemical kindling. In: Pitkänen, A., Schwartzkroin, P.A., Moshé, S.L. (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 379–391.
58. Glass M, Dragunow M. Neurochemical and morphological changes associated with human epilepsy. *Brain Res Brain Res Rev.* 1995 Jul;21(1):29-41. doi: 10.1016/0165-0173(95)00005-n. PMID: 8547953.
59. Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol.* 1969 Nov;25(3):295-330. doi: 10.1016/0014-4886(69)90128-9. PMID: 4981856.
60. Gómez-Gonzalo M, Losi G, Chiavegato A, Zonta M, Cammarota M, Brondi M, Vetri F, Uva L, Pozzan T, de Curtis M, Ratto GM, Carmignoto G. An excitatory loop with astrocytes contributes to drive neurons to seizure threshold. *PLoS Biol.* 2010 Apr 13;8(4):e1000352. doi: 10.1371/journal.pbio.1000352. PMID: 20405049; PMCID: PMC2854117.
61. Gorter JA, van Vliet EA, Lopes da Silva FH. Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models? *J Neurosci Methods.* 2016 Feb 15;260:96-108. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.03.025. Epub 2015 Apr 1. PMID: 25842270.
62. Goudarzi E, Elahdadi Salmani M, Lashkarbolouki T, Goudarzi I. Hippocampal orexin receptors inactivation reduces PTZ induced seizures of male rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015 Mar;130:77-83. doi: 10.1016/j.pbb.2015.01.006. Epub 2015 Jan 17. PMID: 25600753.
63. Grecksch G, Becker A, Rauca C. Effect of age on pentylenetetrazol-kindling and kindling-induced impairments of learning performance. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997 Apr;56(4):595-601. doi: 10.1016/s0091-3057(96)00418-2. PMID: 9130283.
64. Gröticke I, Hoffmann K, Löscher W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp Neurol.* 2007 Oct;207(2):329-49. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.06.021. Epub 2007 Jul 12. PMID: 17714705.
65. Gruart A, Benito E, Delgado-García JM, Barco A. Enhanced cAMP response element-binding protein activity increases neuronal excitability, hippocampal long-term potentiation, and classical eyeblink conditioning in alert behaving mice. *J Neurosci.* 2012 Nov 28;32(48):17431-41. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4339-12.2012. PMID: 23197734; PMCID: PMC6621850.
66. Gupta YK, Veerendra Kumar MH, Srivastava AK. Effect of *Centella asiatica* on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003 Feb;74(3):579-85. doi: 10.1016/s0091-3057(02)01044-4. PMID: 12543222.
67. Hadera MG, Eloqayli H, Jaradat S, Nehlig A, Sonnewald U. Astrocyte-neuronal interactions in epileptogenesis. *J Neurosci Res.* 2015 Jul;93(7):1157-64. doi: 10.1002/jnr.23584. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25782696.
68. Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J. H., & Haydon, P. G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *The Journal of Neuroscience*, 27, 6473–6477.

69. Hammer J, Alvestad S, Osen KK, Skare Ø, Sonnewald U, Ottersen OP. Expression of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in the latent phase and chronic phase in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Glia*. 2008 Jun;56(8):856-68. doi: 10.1002/glia.20659. PMID: 18381650.
70. Han KS, Mannaioni G, Hamill CE, Lee J, Junge CE, Lee CJ, Traynelis SF. Activation of protease activated receptor 1 increases the excitability of the dentate granule neurons of hippocampus. *Mol Brain*. 2011 Aug 10;4:32. doi: 10.1186/1756-6606-4-32. PMID: 21827709; PMCID: PMC3170262.
71. Han KS, Woo J, Park H, Yoon BJ, Choi S, Lee CJ. Channel-mediated astrocytic glutamate release via Bestrophin-1 targets synaptic NMDARs. *Mol Brain*. 2013 Jan 16;6:4. doi: 10.1186/1756-6606-6-4. PMID: 23324492; PMCID: PMC3577500.
72. Wang Y, Zhou Y, Szabo K, Haft CR, Trejo J. Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1. *Mol Biol Cell*. 2002 Jun;13(6):1965-76. doi: 10.1091/mbc.e01-11-0131. PMID: 12058063; PMCID: PMC117618.
73. Hansen SL, Sperling BB, Sánchez C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004 Jan;28(1):105-13. doi: 10.1016/j.pnpbp.2003.09.026. PMID: 14687864.
74. Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Mar;2(3):185-93. doi: 10.1038/35058528. PMID: 11256079.
75. Hellier JL, Patrylo PR, Buckmaster PS, Dudek FE. Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 1998 Jun;31(1):73-84. doi: 10.1016/s0920-1211(98)00017-5. PMID: 9696302.
76. Hermann GE, Van Meter MJ, Rood JC, Rogers RC. Proteinase-activated receptors in the nucleus of the solitary tract: evidence for glial-neural interactions in autonomic control of the stomach. *J Neurosci*. 2009 Jul 22;29(29):9292-300. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6063-08.2009. PMID: 19625519; PMCID: PMC2773000.
77. Isaacson JS, Scanziani M. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):231-43. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.027. PMID: 22017986; PMCID: PMC3236361.
78. Kang, J., Jiang, L., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neuroscience*, 1, 683–692.
79. Karler R, Murphy V, Calder LD, Turkanis SA. Pentylenetetrazol kindling in mice. *Neuropharmacology*. 1989 Aug;28(8):775-80. doi: 10.1016/0028-3908(89)90166-4. PMID: 2571101.
80. Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W et al.. (1997) Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 386 (6622): 239-46. [PMID:9069281]
81. Khazipov R, Valeeva G, Khalilov I. Depolarizing GABA and developmental epilepsies. *CNS Neurosci Ther*. 2015 Feb;21(2):83-91. doi: 10.1111/cns.12353. Epub 2014 Dec 1. PMID: 25438879; PMCID: PMC6495283.
82. Kobayashi M, Buckmaster PS. Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2003 Mar 15;23(6):2440-52. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-06-02440.2003. PMID: 12657704; PMCID: PMC6741996.
83. Kondziella D, Hammer J, Sletvold O, Sonnewald U. The pentylenetetrazole-kindling model of epilepsy in SAMP8 mice: glial-neuronal metabolic interactions. *Neurochem Int*. 2003 Dec;43(7):629-37. doi: 10.1016/s0197-0186(03)00093-7. PMID: 12892650.

84. Koshal P, Kumar P. Neurochemical modulation involved in the beneficial effect of liraglutide, GLP-1 agonist on PTZ kindling epilepsy-induced comorbidities in mice. *Mol Cell Biochem.* 2016 Apr;415(1-2):77-87. doi: 10.1007/s11010-016-2678-1. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26965494.
85. Lado FA, Moshé SL. How do seizures stop? *Epilepsia.* 2008 Oct;49(10):1651-64. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01669.x. Epub 2008 May 21. PMID: 18503563; PMCID: PMC2738747.
86. Lamsa K, Heeroma JH, Kullmann DM. Hebbian LTP in feed-forward inhibitory interneurons and the temporal fidelity of input discrimination. *Nat Neurosci.* 2005 Jul;8(7):916-24. doi: 10.1038/nn1486. PMID: 15937481.
87. Lee CJ, Mannaioni G, Yuan H, Woo DH, Gingrich MB, Traynelis SF. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J Physiol.* 2007 Jun 15;581(Pt 3):1057-81. doi: 10.1113/jphysiol.2007.130377. Epub 2007 Apr 5. PMID: 17412766; PMCID: PMC2170820.
88. Lee SH, Bolshakov VY, Shen J. Inactivation of Presenilin in inhibitory neurons results in decreased GABAergic responses and enhanced synaptic plasticity. *Mol Brain.* 2021 May 25;14(1):85. doi: 10.1186/s13041-021-00796-5. PMID: 34034776; PMCID: PMC8152317.
89. Letellier, M. , Park, Y. K. , Chater, T. E. , Chipman, P. H. , Gautam, S. G. , Oshima-Takago, T. , & Goda, Y. (2016). Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, E2685–E2694.
90. Leung LS, Au AS. Long-term potentiation as a function of test pulse intensity: a study using input/output profiles. *Brain Res Bull.* 1994;33(4):453-60. doi: 10.1016/0361-9230(94)90289-5. PMID: 8124583.
91. Lévesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013 Dec;37(10 Pt 2):2887-99. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.10.011. Epub 2013 Oct 30. PMID: 24184743; PMCID: PMC4878897.
92. Li R, Wu B, He M, Zhang P, Zhang Q, Deng J, Yuan J, Chen Y. HAP1 Modulates Epileptic Seizures by Regulating GABAAR Function in Patients with Temporal Lobe Epilepsy and in the PTZ-Induced Epileptic Model. *Neurochem Res.* 2020 Sep;45(9):1997-2008. doi: 10.1007/s11064-020-03052-9. Epub 2020 May 17. PMID: 32419121.
93. Liu X, Wu Y, Huang Q, Zou D, Qin W, Chen Z. Grouping Pentylentetrazol-Induced Epileptic Rats According to Memory Impairment and MicroRNA Expression Profiles in the Hippocampus. *PLoS One.* 2015 May 11;10(5):e0126123. doi: 10.1371/journal.pone.0126123. PMID: 25962166; PMCID: PMC4427457.
94. Liu, Q. S., Xu, Q., Arcuino, G., Kang, J., & Nedergaard, M. (2004a). Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 3172–3177.
95. Liu, Q. S., Xu, Q., Kang, J., & Nedergaard, M. (2004b). Astrocyte activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors modulates hippocampal inhibitory synaptic transmission. *Neuron Glia Biology*, 1, 307–316
96. Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx.* 2005 Jan;2(1):86-98. doi: 10.1602/neurorx.2.1.86. PMID: 15717060; PMCID: PMC539326.
97. Löscher W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *Eur J Pharmacol.* 2009 May 21;610(1-3):1-11. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.03.025. Epub 2009 Mar 16. PMID: 19292981.

98. Löscher W. The Search for New Screening Models of Pharmacoresistant Epilepsy: Is Induction of Acute Seizures in Epileptic Rodents a Suitable Approach? *Neurochem Res.* 2017 Jul;42(7):1926-1938. doi: 10.1007/s11064-016-2025-7. Epub 2016 Aug 8. PMID: 27502939.
99. Luna VM, Schoppa NE. GABAergic circuits control input-spike coupling in the piriform cortex. *J Neurosci.* 2008 Aug 27;28(35):8851-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2385-08.2008. PMID: 18753387; PMCID: PMC2606149.
100. Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav.* 2009 Dec 7;98(5):579-86. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.09.005. Epub 2009 Sep 20. PMID: 19772866.
101. Mariotti, L. , Losi, G. , Lia, A. , Melone, M. , Chiavegato, A. , Gomez-Gonzalo, M. , ... Carmignoto, G. (2018). Interneuron-specific signaling evokes distinctive somatostatin-mediated responses in adult cortical astrocytes. *Nature Communications*, 9, 82.
102. Matos, M., Bosson, A., Riebe, I., Reynell, C., Vallée, J., Laplante, I., Panatier, A., Robitaille, R. y Lacaille, JC (2018). Astrocytes detect and upregulate transmission at inhibitory synapses of somatostatin interneurons onto pyramidal cells. *Nature communications* , 9 (1), 4254. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06>
103. McDonald JW, Garofalo EA, Hood T, Sackellares JC, Gilman S, McKeever PE, Troncoso JC, Johnston MV. Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* 1991 May;29(5):529-41. doi: 10.1002/ana.410290513. PMID: 1650160
104. McNamara JO, Bonhaus DW, Shin C, Crain BJ, Gellman RL, Giacchino JL. The kindling model of epilepsy: a critical review. *CRC Crit Rev Clin Neurobiol.* 1985;1(4):341-91. PMID: 3915977.
105. McNamara JO, Byrne MC, Dasheiff RM, Fitz JG. The kindling model of epilepsy: a review. *Prog Neurobiol.* 1980;15(2):139-59. doi: 10.1016/0301-0082(80)90006-4. PMID: 6109361.
106. Mederos S, González-Arias C, Perea G. Astrocyte–Neuron Networks: A Multilane Highway of Signaling for Homeostatic Brain Function. *Frontiers in Synaptic Neuroscience.* 2018 Nov 27;10
107. Mederos S, Sánchez-Puelles C, Esparza J, Valero M, Ponomarenko A, Perea G. GABAergic signaling to astrocytes in the prefrontal cortex sustains goal-directed behaviors. *Nature Neuroscience.* 2021 Jan 1;24(1):82–92.
108. Meier, S. D. , Kafitz, K. W. , & Rose, C. R. (2008). Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *Glia*, 56, 1127–1137.
109. Moghim N, Corne DW. Predicting epileptic seizures in advance. *PLoS One.* 2014 Jun 9;9(6):e99334. doi: 10.1371/journal.pone.0099334. Erratum in: *PLoS One.* 2015;10(3):e0119194. PMID: 24911316; PMCID: PMC4049812.
110. Morales JC, Alvarez-Ferradas C, Roncagliolo M, Fuenzalida M, Wellmann M, Nualart FJ, Bonansco C. A new rapid kindling variant for induction of cortical epileptogenesis in freely moving rats. *Front Cell Neurosci.* 2014 Jul 23;8:200. doi: 10.3389/fncel.2014.00200. PMID: 25100948; PMCID: PMC4107828.
111. Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol.* 2004 May;73(1):1-60. doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.03.009. PMID: 15193778.
112. Morris RG. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor

- antagonist AP5. *J Neurosci.* 1989 Sep;9(9):3040-57. doi: 10.1523/JNEUROSCI.09-09-03040.1989. PMID: 2552039; PMCID: PMC6569656.
113. Morrisett RA, Chow C, Nadler JV, McNamara JO. Biochemical evidence for enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate in the hippocampal formation of kindled rats. *Brain Res.* 1989 Sep 4;496(1-2):25-8. doi: 10.1016/0006-8993(89)91048-2. PMID: 2553202.
 114. Müller J, Timmermann A, Henning L, Müller H, Steinhäuser C, Bedner P. Astrocytic GABA Accumulation in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *Front Neurol.* 2020 Dec 18;11:614923. doi: 10.3389/fneur.2020.614923. PMID: 33391173; PMCID: PMC7775561.
 115. Nadkarni S, Jung P. Synaptic inhibition and pathologic hyperexcitability through enhanced neuron-astrocyte interaction: a modeling study. *J Integr Neurosci.* 2005 Jun;4(2):207-26. doi: 10.1142/s0219635205000811. PMID: 15988798.
 116. Nanou E, Lee A, Catterall WA. Control of Excitation/Inhibition Balance in a Hippocampal Circuit by Calcium Sensor Protein Regulation of Presynaptic Calcium Channels. *J Neurosci.* 2018 May 2;38(18):4430-4440. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0022-18.2018. Epub 2018 Apr 13. PMID: 29654190; PMCID: PMC5932646.
 117. Narahashi t, Moore jw, Scott wr. tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *j gen physiol.* 1964 may;47(5):965-74. doi: 10.1085/jgp.47.5.965. pmid: 14155438; pmcid: pmc2195365.
 118. Navarrete, M., & Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, 57, 883–893.
 119. Navarrete, M., & Araque, A. (2010). Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*, 68, 113–126.
 120. Needs, H. I., Henley, B. S., Cavallo, D., Gurung, S., Modebadze, T., Woodhall, G., & Henley, J. M. (2019). Changes in excitatory and inhibitory receptor expression and network activity during induction and establishment of epilepsy in the rat Reduced Intensity Status Epilepticus (RISE) model. *Neuropharmacology*, 158, 107728. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107728>
 121. Han KS, Woo J, Park H, Yoon BJ, Choi S, Lee CJ. Channel-mediated astrocytic glutamate release via Bestrophin-1 targets synaptic NMDARs. *Mol Brain.* 2013 Jan 16;6:4. doi: 10.1186/1756-6606-6-4. PMID: 23324492; PMCID: PMC3577500.
 122. Nikolic L, Shen W, Nobili P, Virenque A, Ulmann L, Audinat E. Blocking TNF α -driven astrocyte purinergic signaling restores normal synaptic activity during epileptogenesis. *Glia.* 2018 Dec;66(12):2673-2683. doi: 10.1002/glia.23519. Epub 2018 Nov 5. PMID: 30394583.
 123. Oh SJ, Han KS, Park H, Woo DH, Kim HY, Traynelis SF, Lee CJ. Protease activated receptor 1-induced glutamate release in cultured astrocytes is mediated by Bestrophin-1 channel but not by vesicular exocytosis. *Mol Brain.* 2012 Oct 12;5:38. doi: 10.1186/1756-6606-5-38. PMID: 23062602; PMCID: PMC3539998.
 124. Olsen RW, Bureau M, Houser CR, Delgado-Escueta AV, Richards JG, Möhler H. GABA/benzodiazepine receptors in human focal epilepsy. *Epilepsy Res Suppl.* 1992;8:383-91. doi: 10.1016/b978-0-444-89710-7.50053-7. PMID: 1329826.
 125. Olsen RW. Picrotoxin-like channel blockers of GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 18;103(16):6081-2. doi: 10.1073/pnas.0601121103. Epub 2006 Apr 10. PMID: 16606858; PMCID: PMC1458832.
 126. Omrani A, Fathollahi Y, Almasi M, Semnanian S, Mohammad S, Firoozabadi P. Contribution of ionotropic glutamate receptors and voltage-dependent calcium channels to the potentiation phenomenon induced by transient pentylenetetrazol in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res.* 2003 Jan 3;959(1):173-81. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03830-1. PMID: 12480172.

127. OMS . 2018. Epilepsia: hechos clave. Hoja de datos de la OMS.
128. Ota Y, Zanetti AT, Hallock RM. The Role of Astrocytes in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory Formation. *Neural Plasticity* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jan 26];2013:11. Available from: <http://dx>.
129. Otis TS, Mody I. Differential activation of GABAA and GABAB receptors by spontaneously released transmitter. *J Neurophysiol.* 1992 Jan;67(1):227-35. doi: 10.1152/jn.1992.67.1.227. PMID: 1348084.
130. Palizvan MR, Fathollahi Y, Semnianian S, Hajezadeh S, Mirnajafizadh J. Differential effects of pentylenetetrazol-kindling on long-term potentiation of population excitatory postsynaptic potentials and population spikes in the CA1 region of rat hippocampus. *Brain Res.* 2001 Apr 13;898(1):82-90. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02146-1. PMID: 11292451.
131. Pandit S, Neupane C, Woo J, Sharma R, Nam MH, Lee GS, Yi MH, Shin N, Kim DW, Cho H, Jeon BH, Kim HW, Lee CJ, Park JB. Bestrophin1-mediated tonic GABA release from reactive astrocytes prevents the development of seizure-prone network in kainate-injected hippocampi. *Glia.* 2020 May;68(5):1065-1080. doi: 10.1002/glia.23762. Epub 2019 Dec 13. PMID: 31833596.
132. Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan 24;109(4):E197-205. doi: 10.1073/pnas.1111098109. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22167804; PMCID: PMC3268269.
133. Patel DC, Tewari BP, Chaunsali L, Sontheimer H. Neuron-glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nat Rev Neurosci.* 2019 May;20(5):282-297. doi: 10.1038/s41583-019-0126-4. PMID: 30792501
134. Pavlov I, Walker MC. Tonic GABA(A) receptor-mediated signalling in temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology.* 2013 Jun;69:55-61. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.04.003. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22538087.
135. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, Parpura V, Hol EM, Sofroniew MV, Verkhratsky A. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol.* 2016 Mar;131(3):323-45. doi: 10.1007/s00401-015-1513-1. Epub 2015 Dec 15. PMID: 26671410.
136. Peña F, Bargas J, Tapia R. Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo. *Neuropharmacology.* 2002 May;42(6):807-12. doi: 10.1016/s0028-3908(02)00024-2. PMID: 12015207.
137. Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science.* 2007 Aug 24;317(5841):1083-6. doi: 10.1126/science.1144640. PMID: 17717185.
138. Perea G, Araque A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci.* 2005 Mar 2;25(9):2192-203. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3965-04.2005. Erratum in: *J Neurosci.* 2005 Mar 16;25(11):3022. PMID: 15745945; PMCID: PMC6726085.
139. Perea, G. , Gomez, R. , Mederos, S. , Covelo, A. , Ballesteros, J. J. , Schlosser, L. , ... Araque, A. (2016). Activity-dependent switch of GABAergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. *eLife*, 5, e20362. doi: 10.7554/eLife.20362.
140. Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: Astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, 32, 421–431..

141. Pirttimäki TM, Parri HR. Astrocyte plasticity: implications for synaptic and neuronal activity. *Neuroscientist*. 2013 Dec;19(6):604-15. doi: 10.1177/1073858413504999. Epub 2013 Oct 10. PMID: 24122819.
142. Pitkänen A, Lukasiuk K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2009 Jan;14 Suppl 1:16-25. doi: 10.1016/j.yebeh.2008.09.023. Epub 2008 Oct 19. PMID: 18835369.
143. Pouille F, Marin-Burgin A, Adesnik H, Atallah BV, Scanziani M. Input normalization by global feedforward inhibition expands cortical dynamic range. *Nat Neurosci*. 2009 Dec;12(12):1577-85. doi: 10.1038/nn.2441. Epub 2009 Nov 1. PMID: 19881502.
144. Pouille F, Scanziani M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1159-63. doi: 10.1126/science.1060342. PMID: 11498596.
145. Pourmotabbed A, Nedaei SE, Cheraghi M, Moradian S, Touhidi A, Aeinfar M, Seyfi Z, Pourmotabbed T. Effect of prenatal pentylenetetrazol-induced kindling on learning and memory of male offspring. *Neuroscience*. 2011 Jan 13;172:205-11. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.001. Epub 2010 Nov 9. PMID: 21070837.
146. Prince DA, Jacobs K. Inhibitory function in two models of chronic epileptogenesis. *Epilepsy Res*. 1998 Sep;32(1-2):83-92. doi: 10.1016/s0920-1211(98)00042-4. PMID: 9761311.
147. Qian B, Sun Y, Wu Z, Wan L, Chen L, Kong S, Zhang B, Zhang F, Wang ZY, Wang Y. Epileptiform response of CA1 neurones to convulsant stimulation by cyclothiazide, kainic acid and pentylenetetrazol in anaesthetized rats. *Seizure*. 2011 May;20(4):312-9. doi: 10.1016/j.seizure.2010.12.016. Epub 2011 Jan 26. PMID: 21269843.
148. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972 Mar;32(3):269-79. doi: 10.1016/0013-4694(72)90176-9. PMID: 4110396.
149. Rajasekaran K, Kapur J, Bertram EH. Alterations in GABA(A) receptor mediated inhibition in adjacent dorsal midline thalamic nuclei in a rat model of chronic limbic epilepsy. *J Neurophysiol*. 2007 Nov;98(5):2501-8. doi: 10.1152/jn.00139.2007. Epub 2007 Sep 12. PMID: 17855591.
150. Rattka M, Brandt C, Löscher W. Do proconvulsants modify or halt epileptogenesis? Pentylenetetrazole is ineffective in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci*. 2012 Aug;36(4):2505-20. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08143.x. Epub 2012 Jun 5. PMID: 22672239.
151. Rebola N, Simões AP, Canas PM, Tomé AR, Andrade GM, Barry CE, Agostinho PM, Lynch MA, Cunha RA. Adenosine A2A receptors control neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction. *J Neurochem*. 2011 Apr;117(1):100-11. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07178.x. Epub 2011 Feb 9. PMID: 21235574.
152. Ribak, C. E. , Tong, W. M. , & Brecha, N. C. (1996). GABA plasma membrane transporters, GAT-1 and GAT-3 display different distributions in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 367, 595–606.
153. Robinson GB, Scwabassi RJ, Berger TW. Kindling-induced potentiation of excitatory and inhibitory inputs to hippocampal dentate granule cells. I. Effects on linear and non-linear response characteristics. *Brain Res*. 1991 Oct 18;562(1):17-25. doi: 10.1016/0006-8993(91)91181-y. PMID: 1799869.
154. Rocha L, Ackermann RF, Engel J Jr. Chronic and single administration of pentylenetetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study. *Epilepsy Res*. 1996 Jun;24(2):65-72. doi: 10.1016/0920-1211(95)00104-2. PMID: 8796354.

155. Ropert N, Miles R, Korn H. Characteristics of miniature inhibitory postsynaptic currents in CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus. *J Physiol.* 1990 Sep;428:707-22. doi: 10.1113/jphysiol.1990.sp018236. PMID: 2231430; PMCID: PMC1181671.
156. Rüthrich H, Grecksch G, Krug M. Development of long-lasting potentiation effects in the dentate gyrus during pentylenetetrazol kindling. *Int J Dev Neurosci.* 2001 Jun;19(3):247-54. doi: 10.1016/s0736-5748(01)00008-9. PMID: 11337193.
157. Sánchez Fernández I, Loddenkemper T. Subunit composition of neurotransmitter receptors in the immature and in the epileptic brain. *Biomed Res Int.* 2014;2014:301950. doi: 10.1155/2014/301950. Epub 2014 Sep 11. PMID: 25295256; PMCID: PMC4180637
158. Santello M, Cali C, Bezzi P. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv Exp Med Biol.* 2012;970:307-31. doi: 10.1007/978-3-7091-0932-8_14. PMID: 22351062.
159. Santiago MF, Veliskova J, Patel NK, Lutz SE, Caille D, Charollais A, Meda P, Scemes E. Targeting pannexin1 improves seizure outcome. *PLoS One.* 2011;6(9):e25178. doi: 10.1371/journal.pone.0025178. Epub 2011 Sep 16. PMID: 21949881; PMCID: PMC3175002.
160. Sanz P, Garcia-Gimeno MA. Reactive Glia Inflammatory Signaling Pathways and Epilepsy. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 8;21(11):4096. doi: 10.3390/ijms21114096. PMID: 32521797; PMCID: PMC7312833.
161. Sasaki, T., Kuga, N., Namiki, S., Matsuki, N., & Ikegaya, Y. (2011). Locally synchronized astrocytes. *Cerebral Cortex.* [Epub ahead of print].
162. Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia.* 2005 Jun;46(6):858-77. doi: 10.1111/j.1528-1167.2005.54904.x. PMID: 15946327.
163. Seifert G, Carmignoto G, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Res Rev.* 2010 May;63(1-2):212-21. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.10.004. Epub 2009 Oct 31. PMID: 19883685.
164. Seifert G, Steinhäuser C. Neuron-astrocyte signaling and epilepsy. *Exp Neurol.* 2013 Jun; 244:4-10. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.08.024. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21925173.
165. Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci.* 2006 May 17;26(20):5370-82. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006. PMID: 16707789; PMCID: PMC6675310.
166. Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew MV, Khakh BS. Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2008 Jun 25;28(26):6659-63. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1717-08.2008. PMID: 18579739; PMCID: PMC2866443.
167. Shimada T, Yamagata K. Pentylenetetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *J Vis Exp.* 2018 Jun 12;(136):56573. doi: 10.3791/56573. PMID: 29985308; PMCID: PMC6101698.
168. Singh T, Mishra A, Goel RK. PTZ kindling model for epileptogenesis, refractory epilepsy, and associated comorbidities: relevance and reliability. *Metab Brain Dis.* 2021 Oct;36(7):1573-1590. doi: 10.1007/s11011-021-00823-3. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34427842.
169. Sloviter RS. The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* 1994 Jun;35(6):640-54. doi: 10.1002/ana.410350604. PMID: 8210220.
170. Stief F, Zuschratter W, Hartmann K, Schmitz D, Draguhn A. Enhanced synaptic excitation-inhibition ratio in hippocampal interneurons of rats with temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci.* 2007 Jan;25(2):519-28. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05296.x. PMID: 17284194.

171. Stringer JL. Pentylentetrazol causes polysynaptic responses to appear in the dentate gyrus. *Neuroscience*. 1995 Sep;68(2):407-13. doi: 10.1016/0306-4522(95)00127-5. PMID: 7477951.
172. Studer FE, Fedele DE, Marowsky A, Schwerdel C, Wernli K, Vogt K, Fritschy JM, Boison D. Shift of adenosine kinase expression from neurons to astrocytes during postnatal development suggests dual functionality of the enzyme. *Neuroscience*. 2006 Sep 29;142(1):125-37. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.06.016. Epub 2006 Jul 42.
173. Tamás G, Szabadics J, Lörincz A, Somogyi P. Input and frequency-specific entrainment of postsynaptic firing by IPSPs of perisomatic or dendritic origin. *Eur J Neurosci*. 2004 Nov;20(10):2681-90. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03719.x. PMID: 15548211.
174. Tan HO, Reid CA, Chiu C, Jones MV, Petrou S. Increased thalamic inhibition in the absence seizure prone DBA/2J mouse. *Epilepsia*. 2008 May;49(5):921-5. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01536.x. Epub 2008 Feb 18. PMID: 18294204; PMCID: PMC3354993.
175. Terauchi, A., Johnson-Venkatesh, E. M., Toth, A. B., Javed, D., Sutton, M. A., & Umemori, H. (2010). Distinct FGFs promote differentiation of excitatory and inhibitory synapses. *Nature*, 465(7299), 783–787. <https://doi.org/10.1038/nature09041>
176. Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med*. 2005 Sep;11(9):973-81. doi: 10.1038/nm1277. Epub 2005 Aug 14. PMID: 16116433; PMCID: PMC1850946.
177. Tippens, A. L. , Pare, J. F. , Langwieser, N. , Moosmang, S. , Milner, T. A. , Smith, Y. , & Lee, A. (2008). Ultrastructural evidence for pre- and postsynaptic localization of Cav1.2 L-type Ca²⁺ channels in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 506, 569–583.
178. Tourov A, Ferri R, Del Gracco S, Elia M, Musumeci SA, Stefanini MC. Spike morphology in PTZ-induced generalized and cobalt-induced partial experimental epilepsy. *Funct Neurol*. 1996 Sep-Oct;11(5):237-45. PMID: 9119266.
179. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 2010 Sep;62(3):405-96. doi: 10.1124/pr.109.002451. Erratum in: *Pharmacol Rev*. 2014 Oct;66(4):1141. PMID: 20716669; PMCID: PMC2964903.
180. Vandell AG, Larson N, Laxmikanthan G, Panos M, Blaber SI, Blaber M, Scarisbrick IA. Protease-activated receptor dependent and independent signaling by kallikreins 1 and 6 in CNS neuron and astroglial cell lines. *J Neurochem*. 2008 Nov;107(3):855-70. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05658.x. Epub 2008 Sep 6. PMID: 18778305; PMCID: PMC2692621.
181. Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. 2017;222:2017–29.
182. Vasil'ev DS, Tumanova NL, Lavrent'eva VV, Starshinova LA, Zhabko EP, Lukomskaia NIa, Zhuravin IA, Magazanik LG. [The ability of NMDA glutamate receptor blockers to prevent a pentylentetrazole kindling in mice and morphological changes in the hippocampus]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2013 Sep;99(9):1023-35. Russian. PMID: 25434216.
183. Velisek L. (2006). Models of chemically-induced acute seizures. In: A Pitkänen, PA Schwartzkroin, SL Moshe´ (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, pp. 127–152.
184. Ventura, R., & Harris, K. M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 19, 6897–6906

185. Vida I, Halasy K, Szinyei C, Somogyi P, Buhl EH. Unitary IPSPs evoked by interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum-moleculare border in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro. *J Physiol.* 1998 Feb 1;506 (Pt 3)(Pt 3):755-73. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.755bv.x. PMID: 9503336; PMCID: PMC2230758.
186. Volterra, A., & Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 626–640.
187. Wang, Z., Xie, R., Yang, X., Yin, H., Li, X., Liu, T., Ma, Y., Gao, J., Zang, Z., Ruan, R., Li, Y., Huang, K., Chen, Q., Shen, K., Lv, S., Zhang, C., Yang, H., Warner, M., Gustafsson, JA, Liu, S.,... Fan, X. (2021). Los ratones hembra que carecen de ERβ muestran un desequilibrio sináptico excitador / inhibitorio para impulsar la patogénesis de la epilepsia del lóbulo temporal. *Theranostics* , 11 (12), 6074–6089. <https://doi.org/10.7150/thno.56331>
188. Wehr M, Zador AM. Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature.* 2003 Nov 27;426(6965):442-6. doi: 10.1038/nature02116. PMID: 14647382.
189. Wellmann M, Álvarez-Ferradas C, Maturana CJ, Sáez JC, Bonansco C. Astroglial Ca²⁺-Dependent Hyperexcitability Requires P2Y₁ Purinergic Receptors and Pannexin-1 Channel Activation in a Chronic Model of Epilepsy. *Front Cell Neurosci.* 2018 Nov 23;12:446. doi: 10.3389/fncel.2018.00446. PMID: 30542266; PMCID: PMC6277884.
190. Wetherington J, Serrano G, Dingledine R. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron.* 2008 Apr 24;58(2):168-78. doi: 10.1016/j.neuron.2008.04.002. PMID: 18439402; PMCID: PMC4124883.
191. Wood MD, Murkitt KL, Rice SQ, Testa T, Punia PK, Stammers M, Jenkins O, Elshourbagy NA, Shabon U, Taylor SJ et al.. (2000) The human GABA(B1b) and GABA(B2) heterodimeric recombinant receptor shows low sensitivity to phaclofen and saclofen. *Br J Pharmacol*, 131 (6): 1050-4. [PMID:11082110]
192. Zhang XL, Zhou JY, Zhang P, Lin L, Mei R, Zhang FL, Chen YM, Li R. Clptm1, a new target in suppressing epileptic seizure by regulating GABAA R-mediated inhibitory synaptic transmission in a PTZ-induced epilepsy model. *Kaohsiung J Med Sci.* 2023 Jan;39(1):61-69. doi: 10.1002/kjm2.12629. Epub 2022 Dec 15. PMID: 36519412.
193. Zhang YV, Ormerod KG, Littleton JT. Astrocyte Ca²⁺ Influx Negatively Regulates Neuronal Activity. *eNeuro.* 2017 Mar 10;4(2):ENEURO.0340-16.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0340-16.2017. PMID: 28303263; PMCID: PMC5348542.
194. Zhao D, Leung LS. Effects of hippocampal kindling on paired-pulse response in CA1 in vitro. *Brain Res.* 1991 Nov 15;564(2):220-9. doi: 10.1016/0006-8993(91)91457-c. PMID: 1810623.
195. Ziburkus J, Cressman JR, Barreto E, Schiff SJ. Interneuron and pyramidal cell interplay during in vitro seizure-like events. *J Neurophysiol.* 2006 Jun;95(6):3948-54. doi: 10.1152/jn.01378.2005. Epub 2006 Mar 22. Erratum in: *J Neurophysiol.* 2006 Aug;96(2):965. PMID: 16554499; PMCID: PMC1469233.
196. Žiburkus J, Cressman JR, Schiff SJ. Seizures as imbalanced up states: excitatory and inhibitory conductances during seizure-like events. *J Neurophysiol.* 2013 Mar;109(5):1296-306. doi: 10.1152/jn.00232.2012. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23221405; PMCID: PMC3602838.
197. Engel J Jr. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist.* 2001 Aug;7(4):340-52. doi: 10.1177/107385840100700410. PMID: 11488399.