

**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCION NEUROCIENCIA**

**Papel del astrocito en la reducción de la plasticidad sináptica del
hipocampo en un modelo de ratas epilépticas**

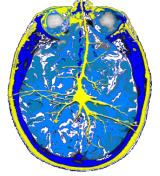
ANDRÉS FRANCISCO JAVIER MARTORELL HENRÍQUEZ

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

Director de Tesis:

Prof. Dr. Christian Bonansco

2 0 1 9



**PROGRAMA MAGISTER EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS, MENCIÓN
NEUROCIENCIAS**

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Coordinación de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

ANDRÉS FRANCISCO JAVIER MARTORELL HENRÍQUEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia, en el examen de defensa de Tesis rendido el ___ de () de 20..

Director de Tesis:

Prof. Dr. Christian Bonansco Herrera

Evaluadores:

Prof. Dr. Marco Fuenzalida

Prof. Dr. Agustín Martínez

Prof. Dr. Magdalena Sanhueza

Para y por: Ofelia y la familia

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por la educación y la responsabilidad, especialmente a mi madre, quién con esfuerzo permitió ser la persona que hoy soy. A mis hermanas por ser cotidiano ejemplo de amor y lucha. A Carla y Juan, que con menor o mayor paciencia me enseñaron el trabajo de la ciencia y la amistad. A Franco por las risas, conversaciones, y muy especialmente el apoyo. A Mario por la ayuda desinteresada. A mi profesor, Christian, a quien le debo la oportunidad de aprender de la fisiología, la importancia del método, y por confiar en mí muchas veces más que yo. A Marco Fuenzalida por ser siempre una voz crítica y constructiva del trabajo aquí realizado.

A Romina, mi compañera, amiga, amor y hoy luz del fruto de vivir con pasión y calidez. A ti te debo saber quién soy. Y al fruto, Ofelia, eres la razón de porqué todo lo que parezca inalcanzable merece la pena intentarlo, siempre.

Finalmente a un profesor que nos dijo una vez: “La vida es un juego, pero que debes jugar en serio“.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue desarrollado con el financiamiento de:

- FONDECYT regular 1130491 a cargo del profesor Christian Bonansco.
- DIPUV CID 1/2006.
- **Programa de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso**

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	14
Plasticidad sináptica y Potenciación a largo plazo.....	15
Astroцитos y plasticidad sináptica.....	18
Mecanismos de comunicación astrocito-astrocito.....	20
Función de los astroцитos en la actividad sináptica.....	21
Función de los astroцитos en la plasticidad sináptica y la potenciación a largo plazo.....	22
Epilepsia y plasticidad sináptica.....	24
Fisiopatología de la epilepsia.....	24
Epilepsia del lóbulo temporal (ELT).....	27
Plasticidad sináptica y potenciación a largo plazo en la ELT.....	28
Epilepsia y astroцитos.....	29
Rol de los astroцитos en la epileptogénesis y los modelos epilépticos.....	29
Modelos de inducción de la actividad tipo epiléptico y de la epileptogénesis.....	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
Hipótesis.....	34
Objetivo general.....	34
Objetivos específicos.....	34
METODOLOGÍA	35
Cirugía estereotáxica.....	35
Protocolo de kindling.....	35
Obtención de rebanadas de hipocampo.....	36
Registros electrofisiológicos.....	37
Registro de las oscilaciones de Ca ²⁺ astroglial.....	38
Farmacología.....	40
Análisis estadístico.....	40
RESULTADOS	41
Hiperexcitabilidad en sinápsis glutamatérgicas en el hipocampo epiléptico y disminución de la LTP en registros de campo.....	41
Disminución de la LTP en sinápsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico en registros unicelulares.....	44
La aplicación reiterada del protocolo de inducción de potenciación no induce LTP en sinápsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico.....	46
Recuperación de la LTP en sinápsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico a través del bloqueo de la comunicación astroglial a través de receptores PDY ₁	47
Modificación en los patrones de ondas de Ca ²⁺ gatillada por la estimulación eléctrica.....	49
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIÓN	62
BIBLIOGRAFÍA	63

ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina.

AD: Postdescarga epiléptica.

AMPA: Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico de glutamato.

ATP: Trifosfato de adenosina.

Ca²⁺: Ion calcio.

CB₁R: Receptor cannabinoide tipo 1.

Cx30: Conexina 30.

Cx43: Conexina 43.

Cxs: Conexinas.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

ECG: Electrocardiografía.

EGTA: 10.0 ácido etilén-bis(oxonitrilo)-tetracético.

ELT: Epilepsia de lóbulo temporal

EPSC: Corrientes postsinápticas excitatorias.

Fluo-4 AM: Indicador fluorescente de Ca²⁺ en forma de éster.

FT: Oscilaciones rápidas de Ca²⁺.

GABA: Ácido γ -aminobutírico.

GABA_A: Receptor de GABA tipo A.

GABA_B: Receptor de GABA tipo B.

GJ: Unión en hendidura.

GluR: Subtipo de astrocitos que presentan en su membrana canales iónicos.

GluT: Subtipo de astrocitos que presentan en su membrana transportadores de glutamato.

GPCRs: Receptores metabotrópicos acoplados a proteína G.

HEPES: 10.0 4-(2-hidroxietil)-1-piperacina-ácido etanolsulfónico.

HFS: Estimulación a alta frecuencia (high frequency stimulation)

Hz: Hercio.

IP3: Inositol trisfosfato.

K⁺: Ion potasio.

KD: Kindling.

LCA: Líquido cerebroespinal artificial.

LTD: Depresión a largo plazo.

LTP: Potenciación a largo plazo.

mAChRs: Receptores muscarínicos de acetilcolina.

mEPSC: Corrientes postsinápticas excitatorias miniatura.

mGluR1: Receptor metabotrópico de glutamato tipo 1.

mGluR2/3: Receptores metabotrópicos de glutamato tipos 2 y 3.

mGluR: Receptores metabotrópicos de glutamato.

ml: Mililitros.

mM: Milimolar.

MRS2179: N(6)-metil-2'-deoxiadenosina 3',5'-difosfato.

MΩ: Mega ohm.

NMDAR: Receptor ácido N-metil-D-aspartico de glutamato.

P2_X: Receptores purinérgicos ionotrópicos de ATP.

P2_{Y1}R: Receptor metabotrópico purinérgico de ATP tipo 1.

P2_{Y2}R: Receptor metabotrópico purinérgico de ATP tipo 2.

pA: Picoamperio.

PLC: Fosfolipasa C.

Pr: Probabilidad de liberación de neurotransmisor.

PTX: Picrotoxina.

Px1: Panexina 1.

RK: Kindling rápido.

SICs: Corrientes de entrada lenta.

SN: Sistema nervioso.

SNARE: Proteínas involucradas en la movilización y fusión vesicular (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor).

SNC: Sistema nervioso central.

SR101: Sulforrodamina 101.

ST: Oscilaciones lentas de Ca^{2+}

TBS: Theta burst stimulation

TEA: Tetraetilamonio.

TTX: Tetrodotoxina.

$\Delta F/F_0$: Cambios en la señal de fluorescencia por sobre la fluorescencia basal.

μl : Microlitro.

μM : Micromolar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hiperexcitabilidad en sinapsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico y disminución de la LTP.....	43
Figura 2. Disminución de la LTP en sinápsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico en registros unicelulares.....	45
Figura 3. Inducción de la saturación de la LTP en sinápsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico.....	47
Figura 4. Recuperación de la LTP en sinápsis del hipocampo epiléptico.....	49
Figura 5. Modificación en los patrones de ondas de Ca ²⁺ gatillada por la estimulación eléctrica.....	51

RESUMEN

En la mayoría de las formas de epilepsia hay un desbalance de la neurotransmisión excitatoria/inhibitoria, acompañada por la activación sincrónica en una población neuronal específica, y en donde la modulación sináptica astrogliar juega un importante papel en el control de este balance. La progresión de la epilepsia requiere una forma de potenciación dependiente de la actividad de la transmisión glutamatérgica, similar a las descritas en las formas convencionales de potenciación a largo plazo (LTP). Si bien hay evidencias sobre alteraciones en la expresión de LTP en modelos de epilepsia, existe escaso conocimiento del cómo la epilepsia interfiere con la capacidad de expresar plasticidad sináptica y cómo la comunicación astrogliar podría estar contribuyendo en esta alteración. Utilizando técnica de registro extracelular y patch clamp en CA1 de rebanadas de hipocampo, comparamos la tasa de potenciación en ratas adultas control y kindling –un modelo de epilepsia crónica- en presencia de un antagonista específico de receptores purinérgicos P2Y₁ (MRS2179), claves en la comunicación astrocito-astrocito. En ratas kindleadas, la estimulación a alta frecuencia (HFS) y protocolos estimulación a ritmo theta (TBS) de las colaterales de las Schaffer generó menor tasa de LTP respecto de ratas control. Interesantemente, la aplicación de un segundo TBS después de 30 min de la TBS inicial, no induce cambios en la tasa de LTP en kindling, mientras que en los controles se observó una segunda potenciación sostenida en respuesta al segundo TBS. La capacidad de expresión de LTP en kindling fue rescatada en presencia de MRS2179, un atagonista purinérgico que inhibe las elevaciones de Ca²⁺ astrogliar. Finalmente, al registro de oscilaciones del Ca²⁺ astrogliar mostró que a la estimulación con TBS, hubo un cambio en la distribución de las oscilaciones rápidas y lentas, espeiclamente en el grupo control y kindling en presencia de MRS2179. Estos resultados sugieren que la plasticidad glutamatérgica está disminuida en ratas epilépticas, debido a un estado de

saturación de los mecanismos astrogiales responsables de regular el umbral de inducción de la plasticidad sináptica, como consecuencia de la hiper-actividad astrogial durante la progresión de la epilepsia.

SUMMARY

In most forms of epilepsy exist an imbalance of excitatory/inhibitory neurotransmission, accompanied by synchronous activation in a specific neuronal population, and where astroglial synaptic modulation plays an important role in controlling this balance. The progression of epilepsy requires a form of potentiation dependent on the activity of glutamatergic transmission, similar to those described in conventional forms of long-term potentiation (LTP). Although there is evidence of alterations in the expression of LTP in epilepsy models, there is little knowledge of how epilepsy interferes with the ability to express synaptic plasticity and how astroglial communication could be contributing to this alteration. Using the extracellular recording technique and CA1 patch clamp of hippocampal slices, we compared the potentiation rate in adult control and kindling rats -a model of chronic epilepsy- in the presence of a specific purinergic receptor antagonist P2Y₁ (MRS2179), keys in astrocyte-astrocyte communication. In kindleated rats, high frequency stimulation and theta burst stimulation (TBS) protocols of the Schaffer collaterals generated lower LTP rate than control rats. Interestingly, the application of a second TBS after 30 min of the initial TBS did not induce changes in the rate of LTP in kindling, whereas in control a second sustained potentiation was observed in response to the second TBS. The expression capacity of LTP in kindling was rescued in the presence of MRS2179, a purinergic atagonist that inhibits astroglial Ca²⁺ elevations. Finally, the recording of astroglial Ca²⁺ oscillations showed that upon stimulation with TBS, there was a change in the distribution of the fast and

slow oscillations, especially in the control and kindling group in the presence of MRS2179. These results suggest that glutamatergic plasticity is diminished in epileptic rats, due to a state of saturation of the astroglial mechanisms responsible for regulating the threshold of induction of synaptic plasticity, as a consequence of astroglial hyper activity during the progression of epilepsy.

INTRODUCCIÓN

Durante los pasados 50 años, la plasticidad sináptica ha sido estudiada en distintos modelos como los cambios de la eficacia de la transmisión sináptica entre neuronas (Aranda y Luco., 1964; Kandel et al., 1968). Sin embargo, durante los últimos años se ha establecido la importancia que otras células del tejido nervioso, como las células gliales y especialmente los astrocitos, tienen en esta comunicación (Araque et al., 1999; Perea et al., 2009; Nedergaard et al., 2012). Comprender cómo la interacción entre neuronas y astrocitos puede regular la plasticidad sináptica es hasta ahora pobremente entendido, no solo desde una perspectiva fisiológica, si no también en el contexto de diversas enfermedades degenerativas que afectan el cerebro, tales como la enfermedad de Alzheimer (Delekate., 2014), Parkinson (Braidy et al., 2013), y la epilepsia (Eid et al., 2008; Carmignoto y Haydon., 2012; Bedner et al., 2015). Esta última, es una enfermedad que modifica la forma en que las células nerviosas se comunican entre sí, llevándolas a la producción de descargas eléctricas exacerbadas que generan una modificación del funcionamiento nervioso y en casos de mayor severidad, la muerte neuronal y la esclerosis hipocampal (Keyser et al., 2008; Devinsky et al., 2013). Dentro de las repercusiones más importantes se encuentran diversas alteraciones cognitivas, especialmente a nivel de la memoria espacial en animales, la memoria episódica en humanos y el aprendizaje en diversos modelos (Comper et al., 2017; Reyes et al., 2019). En el caso de la epilepsia de lóbulo temporal se desconoce cómo contribuyen los astrocitos este estado patológico y los mecanismos por los cuales podrían estar afectando la plasticidad. Si bien existen diversas publicaciones que han reportado algunos de los mecanismos involucrados (Bonansco et al., 2011; Alvestad et al., 2013; Álvarez-Ferradas et al., 2015), la mayoría son realizados en animales jóvenes. Este trabajo busca establecer la participación de los astrocitos pueden afectar la plasticidad sináptica de neuronas piramidales hipocampales, utilizando un

modelo de epilepsia de lóbulo temporal en ratas adultas. Para ello, se utilizó el modelo de kindling eléctrico (Morales et al., 2014) que desarrolla condiciones similares a las observadas en otros modelos animales y en humanos, siendo el kindling el modelo de epilepsia crónica más utilizado para el estudio de sus características, pues evoluciona de manera progresiva, desarrolla esclerosis hipocampal y altera las mismas estructuras que la ELT (Morimoto et al., 2004). Finalmente, determinar nuevos mecanismos relativos a esta patología es fundamental dada su alta fármaco-resistencia a nivel mundial (Weibe et al., 2001; Hauser et al., 2018).

Plasticidad sináptica y Potenciación a largo plazo

La pregunta sobre cómo las memorias son almacenadas en diversas estructuras ha intentado ser respondida desde mediados del siglo XX (Hebb D., 1949), logrando describir de manera parcial -pero fundamental- los mecanismos básicos que subyacen bajo estos sistemas (Luco y Aranda., 1964; Kandel et al., 1968; Kandel et al., 2014). Si bien gran parte del parénquima cerebral posee la capacidad de modificarse, el hipocampo se ha llevado ampliamente la atención y la caracterización de ser una de las estructuras más importantes en el almacenaje de la información y una de las cuales nos permite recordar, mantener/almacenar y evocar información previamente aprendida (Scoville y Milner., 1957; Penfield y Milner., 1958; Milner., 1962; Milner et al., 1968; Warrington y Weiskrantz., 1968; Squire, 1992; Schacter y Tulving., 1994). Los cambios observados en la eficacia de la transmisión sináptica y/o en la excitabilidad sináptica producidos por la estimulación repetitiva por Bliss y Lomo (1973) y por Bliss y Gardner (1973) dieron pie al estudio de los cambios plásticos de la transmisión sináptica y la fisiología de la memoria. Desde la descripción del método de “theta burst stimulations” (TBS) por Larson et al (1986) comenzó a utilizarse este tipo de estimulación por sus ventajas y alta eficacia. Entre sus propiedades

para el estudio de circuitos hipocampales, la TBS es altamente similar a los patrones vistos en registros de espigas complejas ligados a una conducta y si su tasa de repetición es óptima se asemeja a los ritmos theta característicos de las neuronas hipocampales (relacionado con el establecimiento de memorias) (Larson y Munkácsy, 2014). La aplicación de un estímulo repetitivo a una frecuencia de 5 Hz activará diversas sinapsis excitatorias (glutamatérgicas) de tipo mono sinápticas y a su vez sinapsis inhibitorias disinápticas tipo GABAérgicas en la misma neurona piramidal. Al activarse receptores tipo AMPA, NMDA, GABA_A y metabotrópicos GABA_B resultará en una efectiva suma temporal depolarizante. El aumento de la latencia entre un tren de estímulos y el siguiente permitiría la reactivación de receptores GABA_B, el aumento de IPSP (Potenciales post-sinápticos inhibitorios) y la disminución de la suma temporal de los EPSP (Potenciales post-sinápticos excitatorios), por lo cual se ha observado que los tiempos similares a 200 ms inter-estímulo son los de mayor efectividad (Larson y Munkácsy, 2014). En cuanto al sustrato biológico de la LTP es ampliamente reconocido hoy como un fenómeno fundamentalmente post-sináptico, ligado al reclutamiento y la mejora de la respuesta excitatoria mediada por receptores AMPA (Harvey and Svoboda, 2007; Lee et al., 2009; Matsuzaki et al., 2004), consecuencia del aumento de la actividad de receptores NMDA, seguida de la activación de CAMKII, aunque no es restrictiva de la actividad asociada a receptores NMDA (Nicoll y Malenka, 1995; Nicoll y Schmitz, 2005). Además, se ha visto un aumento en el volumen de las espinas dendríticas luego de la aplicación de un protocolo de potenciación a largo plazo (Harvey y Svoboda, 2007; Lee et al., 2009; Matsuzaki et al., 2004). A partir de esta última perspectiva, la plasticidad sináptica podría interpretarse como un fenómeno homeostático de contrapeso, con el objetivo de mantener la estabilidad neuronal global (Turrigiano y Nelson., 2000; Turrigiano., 2008; Pozo y Goda., 2010). Siendo la plasticidad sináptica un correlato biológico

de la memoria, consideraremos esta última como cualquier perturbación en un sistema, causada por la estimulación externa, que persiste después del cese de la estimulación inicial y altera la capacidad de respuesta del sistema a la estimulación posterior. Así, la memoria, en los términos más amplios, es una adaptación al pasado (Kukushkin y Carew., 2017). Se han caracterizado distintas clasificaciones de la plasticidad sináptica. La distinción entre plasticidad a corto, mediano y largo plazo se basa en los requisitos mecanicistas para su formación (Goelet et al., 1986). La plasticidad a corto plazo, denominada así debido a que dura solo algunos segundos, depende de las modificaciones postraduccionales de las proteínas preexistentes y requiriendo síntesis de nuevas proteínas para su mantención a minutos y horas (Sutton et al., 2002), requiriendo de modificaciones genéticas para su consolidación a horas o más tiempo (Kandel et al., 2014). Por otro lado, la plasticidad puede expresarse como un aumento (potenciación) o una disminución (depresión) de la fuerza o eficacia sináptica. Así, la plasticidad se puede expresar de manera presináptica, postsináptica o ambas, con distintos tiempos de duración (Kandel et al., 2014). Para llevar a cabo un proceso de plasticidad, distintos eventos dentro y fuera de la célula deben ocurrir de manera concertada en ajustados rangos de tiempo. En el caso de la plasticidad de neuronas glutamatérgicas, los receptores NMDA son un importante regulador de este fenómeno de coincidencia temporal. Su permeabilidad a iones de Ca^{+2} permite la activación de la cascada intracelular descrita previamente en este capítulo. Para ello, el receptor debe estar expuesto a glutamato y generar una despolarización de la membrana post-sináptica (Markram et al., 1997; Spruston et al., 1995; Yuste et al., 1999). Estos eventos deben ocurrir en una precisa ventana de tiempo, utilizando formas de aumentar estos rangos de tiempo como por ejemplo a través de potenciales de acción retro propagados (Blanke and VanDongen, 2009; Spruston et al., 1995; Stuart et al., 1997), los cuáles generan una despolarización de mayor duración

que los potenciales axónicos. Siendo el tiempo un factor importante en la inducción de la plasticidad sináptica y la memoria, la estimulación externa de una sinapsis parece ser más proclive a generar aumento de la eficacia en la transmisión cuando es deliberada en tiempos específicos que cuando se hace de manera masiva (Smolen et al., 2016). Esta observación posee un correlato morfológico claro: el alargamiento de un set de espinas dendríticas es mayor cuando la estimulación se aplica con espacios temporales previamente determinados, mejorando por consecuencia la efectividad sináptica (Kramár et al., 2012; Lynch et al., 2013). Una posible explicación es que, a la estimulación repetida y debidamente espaciada en tiempo de una célula, la primera estimulación generaría un efecto de cebado (priming) en las espinas dendríticas, consolidándose estas últimas en las siguientes estimulaciones (Rex et al., 2009). Si bien se desconocen las bases detrás de este fenómeno, una posibilidad es que el tiempo entre cada estimulación (ej. 60-90 min) es suficiente para que se activen algunos procesos de transcripción como CREB (elementos de respuesta a AMPc) (Silva et al., 1998; Kandel., 2001; Smolen et al., 2016). De esta manera, contrastar esta visión eminentemente neuronal con el papel del astrocito en la plasticidad fisiológica y el desconocimiento de su mal funcionamiento en la fisiopatología de enfermedades como la epilepsia, permitirá comprender de manera más precisa los mecanismos involucrados.

Astrocitos y plasticidad sináptica

Mecanismos de comunicación astrocito-neurona

El glutamato, ATP y D-serina son las principales moléculas neuroactivas reconocidas como gliotransmisores (Guček et al., 2012; Henneberger et al., 2012; Papura and Haydon, 2009; Perea et al., 2009; Theis y Giaume, 2012). Se ha observado que la gliotransmisión mediada por glutamato, una de las más estudiadas, puede inducir cambios plásticos en la

transmisión sináptica. A nivel presináptico, el glutamato astrogial actúa sobre receptores metabotrópicos tipo 1 (mGluR1), siendo su liberación espontánea un factor determinante en el establecimiento de la probabilidad de liberación (Pr) basal en sinapsis glutamatérgicas, regulando además el umbral de inducción de plasticidad a largo plazo en hipocampo (Bonansco et al., 2011). Además, la exocitosis vesicular Ca^{2+} -dependiente de glutamato astrogial produce potenciación en sinapsis únicas, a través de un aumento en la Pr mediada por la activación de receptores mGluR1 en la presinapsis (Perea and Araque, 2007). Además, se ha observado que la liberación retrograda de endocannabinoides activa receptores tipo I de canabinoide (CB_1R) en los astrocitos, aumentando la incidencia de oscilaciones de Ca^{2+} astrogial y con ello la liberación vesicular del gliotransmisor glutamato (Min and Nevian, 2012; Navarrete and Araque, 2010). En el hipocampo, la liberación de glutamato astrogial mediada por la activación de CB_1R induce a través de la activación de receptores NMDA presinápticos potenciación heterosináptica a largo plazo (Navarrete and Araque, 2010). El glutamato liberado desde los astrocitos también modula la transmisión inhibitoria, potenciándola a través de la activación de receptores de kainato presinápticos (Liu et al., 2004a); o deprimiéndola a través de la activación mGluR de los grupos II y III ubicados en los terminales sinápticos (Liu et al., 2004b). A nivel postsináptico, el glutamato astrogial actúa sobre receptores NMDA extrasinápticos evocando corrientes de entrada lenta (SICs) (Araque et al., 1998; Shigetomi et al., 2008; Álvarez-Ferradas et al., 2015), las cuales sincronizan la actividad de grupos de neuronas piramidales en el hipocampo (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004), pudiendo incluso desencadenar el disparo de potenciales de acción (Fellin et al., 2006), modulando así la excitabilidad y sincronía neuronal. De esta manera la evidencia indica que la gliotransmisión constituye un elemento clave en la fisiología del SN,

modulando diferencialmente la plasticidad sináptica a corto y largo plazo mediante distintos mecanismos (Parpura y Haydon, 2009; Perea et al., 2009; Zorec et al., 2012).

Mecanismos de comunicación astrocito-astrocito

Diversas formas de señalización astrocito – astrocito han sido descritas, permitiendo la propagación de ondas de Ca^{2+} principalmente a través de dos vías: una intracelular, por medio de difusión de IP_3 vía gap junctions (GJ) formadas por conexinas Cx43 y Cx30 (Enkvist y McCarthy, 1992; Scemes et al., 1998; Suadicani et al., 2004; Leybaert y Sanderson, 2012); y otra extracelular, mediada principalmente por ATP y P_2Y_R presentes en la membrana de astrocitos vecinos (i.e.: $\text{P}_2\text{Y}_1\text{R}$ y $\text{P}_2\text{Y}_2\text{R}$) (Hassinger et al., 1996; Guthrie et al., 1999; Cotrina et al., 2000; Gallagher y Salter, 2003; Weissman et al., 2004; Suadicani et al., 2006; Bowser and Khakh, 2007; Kang et al., 2008; Di Castro et al., 2011; Torres et al., 2012). La señalización inter-astrocito mediada por ATP y P_2Y_R es considerada la principal vía de propagación de ondas de Ca^{2+} (Guthrie et al., 1999; Cotrina et al., 2000; Stout et al., 2002; Sul et al., 2004; Suadicani et al., 2006; Bowser y Khakh, 2004, 2007; Torres et al., 2012; Pascual et al., 2012). Se ha observado que el ATP astroglial puede liberarse al medio extracelular a través de exocitosis vesicular Ca^{2+} -dependiente (Bowser and Khakh, 2007; Zhang et al., 2007), mediada por HC formados por Cx43 y Cx30 (Cotrina et al., 1998; Stout et al., 2002; Kang et al., 2008; Orellana et al., 2011; Torres et al., 2012). Al alcanzar el medio extracelular, el ATP permite la regeneración de la oscilación de Ca^{2+} en astrocitos vecinos mediante la activación $\text{P}_2\text{Y}_1\text{R}$ y $\text{P}_2\text{Y}_2\text{R}$, los cuales inician una cascada de señalización canónica mediada por PLC/ IP_3 y permiten la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (Salter and Hicks, 1995; Venance et al., 1997; Gallagher and Salter, 2003; Di Castro et al., 2011), provocando la liberación de gliotransmisores (Verderio and Matteoli, 2001; Domercq et al., 2006; Pascual et al., 2012; Cali et al., 2014). Junto con ello, se ha

observado que la velocidad y radio de propagación de la onda de Ca^{2+} depende del tipo de receptor purinérgico y del ligando involucrado (Gallagher y Salter, 2003), lo cual sugiere que los astrocitos son capaces de discriminar la actividad sináptica de la producida por astrocitos vecinos (Perea et al., 2009)..

Función de los astrocitos en la actividad sináptica

Los astrocitos son un tipo de célula clasificada como macroglía que presentan un pequeño soma del cuál emergen procesos en múltiples direcciones que caracterizan su forma estrellada (Ramón y Cajal, 1909; Peters et al., 1991). Se unen entre sí por gap junctions (GP), a través de conexina 30 (Cx30) y conexina 43 (Cx43; Jabs et al., 2008) y forman contactando con vasos sanguíneos la barrera hematoencefálica (Sofroniew and Vinters, 2010). Algunos astrocitos presentan transportadores de glutamato (i.e.: astrocitos GluT) o canales iónicos (i.e.: astrocitos GluR). Estos últimos se caracterizan por recibir entradas sinápticas de neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas (Jabs et al., 2008). Más allá de las funciones clásicas de los astrocitos asociadas a ser parte de la barrera hematoencefálica, el control de la concentración de algunas moléculas a nivel extracelular y ser una célula de sosten en el SNC, se ha reportado sistemáticamente que los astrocitos modulan la transmisión sináptica (Araque et al., 1998; Kang et al., 1998; Zhang et al., 2003; Bezzi et al., 2001; Perea and Araque, 2007; Jourdain et al., 2007), la plasticidad sináptica (Henneberger et al., 2010; Bonansco et al., 2011; Min and Nevian, 2012) y la excitabilidad sináptica (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004, 2006; D'Ascenzo et al., 2007) a través de la liberación Ca^{2+} -dependiente de gliotransmisores como glutamato, ATP y D-serina. Como consecuencia de lo anterior es que se acuñó, a finales de los 90', el concepto de sinapsis tripartita (Araque et al., 1999). Además, hoy los astrocitos se han relacionado con entre otras funciones la regulación

de fibras colinérgicas septales en el hipocampo, claves en procesos de aprendizaje (Pabst et al., 2016), y la transferencia de partículas de mitocondria desde el astrocito hacia neuronas vecinas en condiciones patológicas, contribuyendo a través de mecanismos hasta hoy desconocidos a la neuroprotección (Hayakawa et al., 2016). Como los astrocitos no son células eléctricamente excitables, utilizan variaciones de las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} para enviar señales a otras células (Zorec et al., 2012; Parpura and Verkhratsky, 2012). Estas oscilaciones de Ca^{2+} astroglial ocurren en respuesta a la liberación tanto de neurotransmisores como de gliotransmisores debido a la presencia de receptores metabotrópicos (i.e.: mGluRs, GABA_B, P2_Y, mAChRs, A₁₋₃) e ionotrópicos (i.e.: NMDA, AMPA, P2X, GABA_A) en la astrogliá (Parpura and Haydon, 2009). Esto permite enviar señales desde y hacia neuronas vecinas y otros astrocitos (Volterra et al., 2014). En el caso de los receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (GPCRs) su activación provoca la síntesis de fosfolipasa C lo cuál genera un aumento de la producción de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3) en el citosol del astrocito, permitiendo que el Ca^{2+} difunda desde el retículo endoplasmático hacia el citoplasma a través de receptores IP3 (Salter and Hicks, 1995; Parri and Crunelli, 2003; Di Castro et al., 2011). Así, el aumento de Ca^{2+} intracelular genera la liberación de gliotransmisores (Araque et al., 2000; Zhang et al., 2007).

Función de los astrocitos en la plasticidad sináptica y la potenciación a largo plazo

Los astrocitos pueden mediar el desarrollo neuronal, el metabolismo de distintos iones y neurotransmisores, además de inducir la transmisión de señales nerviosas (Banerji et al, 1980; Ephrussi et al, 1985; Singh et al, 1986; Kimelberg, 2010; Araque et al, 2014). De acuerdo con los mecanismos ya descritos, el aumento del Ca^{2+} proveniente desde los astrocitos es capaz de modular la probabilidad de liberación y evocar plasticidad a largo plazo

en sinapsis del hipocampo, sin necesariamente modificar la sensibilidad post-sináptica (Perea & Araque., 2007). La inclusión de los astrocitos en los procesos de plasticidad sináptica extiende el concepto clásico de aprendizaje "Hebbiano" (Hebbian learning), considerando un nuevo actor en la relación pre y post-sináptica, ahora considerando el contexto de una sinapsis tripartita (Araque et al., 1999). Si bien en un principio al describir el rol de los astrocitos en la plasticidad sináptica era referido como menor, hoy es sabido que través de la liberación de ATP, glutamato y D – serina (Zhang and Haydon., 2005) es cada vez más protagonista. Henneberger et al., 2010 describieron la necesidad de la liberación de D – serina originaria de los astrocitos para el establecimiento de la LTP en sinápsis hipocampales. La D – serina funciona como agonista de las uniones de la glicina en receptores NMDA y es liberada a través de ondas de Ca^{2+} en astrocitos del hipocampo (Mothet et al., 2000; Mothet et al., 2005). Con ello, la liberación de glutamato es fundamental para el establecimiento de la LTP (Diamond J et al, 1998; Kandel E, 2001), activando receptores NMDA, estimulando la liberación de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP), uniéndose esta a proteínas CREB y activando proteínas quinasas (CaMKII) que promoveran al inserción de nuevos receptores tipo AMPA. Además del ATP y sus metabolitos señalados anteriormente, se han descrito otras moléculas liberadas desde los astrocitos las cuales han sido implicadas en fenómenos de plasticidad neuronal. La efrina-A que promueve la retracción de las espinas dendríticas y la efrina-B que regula la liberación de D-serina, entre otras (Ota Y et al, 2013). Desde una perspectiva morfológica, los astrocitos pueden influir en la formación de sinápsis (Ullian et al., 2001), a través de la liberación de Apolipoproteína E (ApoE) y factores neurotróficos derivados del cerebro (BDNF), entre otros (Elmariah et al., 2005). Junto con ello, se ha observado que los astrocitos tienen un rol en la traslocación de AMPAR gracias a la liberación de factores de necrosis tumoral ($TNF\alpha$) (Kaneko et al., 2008). Además, los

astrocitos son importantes para la maduración y la sobrevivencia de espinas dendríticas, haciéndolas más estables, contribuyendo a la mantención de la LTP (Nishida & Okabe., 2007). Recientemente se observó que la estimulación de los astrocitos en el hipocampo de ratones no sólo es necesaria para la inducción de LTP NMDA-dependiente, sino que puede ser incluso suficiente para una mejora en tareas de memoria espacial y episódica (Adamsky et al., 2018). En conjunto, estos antecedentes sugieren que los astrocitos pueden identificar de forma autónoma información específica de la tarea basada en la actividad neuronal vecina, comunicándose nuevamente con el circuito neuronal. Estos antecedentes permiten considerar entonces al astrocito como una célula excitable, que responde de manera activa a la actividad neuronal, capaz de modular la excitabilidad y transmisión sináptica, participando de manera activa en los mecanismos implicados en la plasticidad neuronal y la organización de los circuitos neuronales.

Epilepsia y plasticidad sináptica

Fisiopatología de la epilepsia

La epilepsia es un trastorno que se caracteriza por interrupciones recurrentes y abruptas del funcionamiento cerebral, llamadas crisis epilépticas. Estas últimas son estados de actividad eléctrica anormal, breves, con un claro inicio y final, además de asociarse a una respuesta conductual, sensorial, motora y/o autonómica evidente (Fisher et al., 2005). En el caso de la epilepsia implica usualmente una correlación electroencefalografía (EEG) sumado a la presencia de una predisposición a generar otras crisis epilépticas (Fisher et al., 2014). Clínicamente es una enfermedad de la cual se han descrito más de 40 tipos distintos (ILAE., 1989) agrupados en parciales y generalizados según la cantidad de estructuras cerebrales involucradas y la presencia o no de pérdida de conciencia, estando ausente es la de tipo

parcial. Al menos el 10% de las personas han experimentado una crisis epiléptica durante su vida y es la tercera enfermedad neurológica de mayor prevalencia a nivel mundial, afectando al menos a 65 millones de personas en el mundo (Hauser & Beghi., 2008; Ngugi et al., 2010).

De las estructuras cerebrales involucradas en la epilepsia tanto el neocórtex como el hipocampo son proclives al desarrollo de condiciones favorables para la aparición de crisis epilépticas. Dentro de estas condiciones está la presencia de múltiples conexiones excitatorias de tipo recurrential, la necesidad de regulación inhibitoria sobre estas redes excitatorias y la capacidad de estas redes de hacerse más fuertes o débiles tras estimulación eléctrica repetida (Jefferys et al., 1998; Delgado-Escueta et al., 1999). En EEG el correlato básico de una crisis epiléptica es la actividad inter-ictal (entre crisis) en forma de espigas (spikes). Característicamente son breves (80-200 ms), alargadas y con la forma ya mencionada. En la mayoría de las oportunidades reflejan el foco de inicio epileptogénico. El correlato intracelular es un cambio despolarizante de tipo paroxístico (paroxysmal depolarizing shift, PDS), producido usualmente en neuronas de tipo piramidal y asociado a un aumento de la excitabilidad neuronal o de un desbalance entre la actividad excitatorias e inhibitoria de neuronas GABAérgicas usualmente (Mody., 1998; McCormick & Contreras., 2001). En el caso del hipocampo existen abundantes conexiones desde las células granuladas hasta neuronas piramidales en CA3, relevando a neuronas piramidales en CA1, sumadas a extensas conexiones recurrentes y comisurales entre ambos hipocampos y hacia cortezas entorrinales y subiculum (Freund & Buzsaki., 1996). Esta compleja estructuración que funcionalmente permite realizar diversas tareas cognitivas genera una condición altamente sensible a verse afectada por desbalances de la actividad exitatoria/inhibitoria y a su propagación hacia otras estructuras. Otra condición que favorece esta actividad aberrante es la capacidad que tienen las neuronas piramidales en el hipocampo, especialmente en CA1,

de generar ráfagas (burst) de potenciales de acción a altas frecuencias en su soma y/o en el cono axónico provisto de abundantes canales de Na^+ dependientes de despolarización (Azouz et al., 1996). A consecuencia de esta sobre activación excitatoria se produce una amplificación de las respuestas post-sinápticas excitatorias (EPSPs), que, generadas en alta frecuencia, pueden producir una suma temporal e incrementar la efectividad sináptica. A través de conexiones axónicas colaterales, estos burst pueden excitar otras neuronas vecinas, dando origen a una red de neuronas que pueden generar una activación recurrente excitatoria (Markram., 1997). Si esta actividad ocurre en los tiempos correctos, es capaz de generar alta sincronía en la activación excitatoria de dichas redes (Miles et al., 1983; Traub et al., 1993; Jiruska et al., 2010; Staba & Bragin., 2011). Un factor importante en la predisposición a generar esta hiperactividad excitatoria y en su regulación es la concentración de diversos iones en el medio extracelular. Así, se ha observado que posterior a la actividad sináptica en burst aumenta la concentración de K^+ y disminuye la de Ca^{2+} (Heinemann et al., 1977; Jensen & Yaari., 1997). Este último mecanismo involucrado permite considerar factores peri-sinápticos en la actividad epileptiforme. El término de la actividad tipo bursting ha sido asociado a la activación de corrientes de salida de K^+ y a la inactivación de corrientes de entrada (Alger & Williamson., 1988). Existen variados tipos de canales de K^+ según su activación, cinética y sensibilidad a segundos mensajeros (Ca^{2+}) como el caso de corrientes I_C e I_{AHP} . (Vergara & Latorre et al., 1998) relacionados con la generación de prolongados periodos de hiperpolarización posterior a bursting (Schwindt et al., 1989; Sanchez-Vives et al., 2000). Otros mecanismos importantes en el control de estos burst o ráfagas en neuronas piramidales excitatorias es la activación de conductancias tanto receptores GABA_A como GABA_B (McCormick., 1989; Scanziani et al., 1994). Dentro de su fenotipo, la epilepsia puede alterar el aprendizaje tanto desde una perspectiva biológica como cognitiva/conductual

(Hannenson et al., 2000; Mortazavi et al., 2005), no sólo modificando el funcionamiento neuronal, si no además gliales e interesantemente astrocíticos.

Epilepsia del lóbulo temporal (ELT)

Como se mencionó anteriormente, existen diversos tipos de epilepsia, siendo la ELT una de las de mayor prevalencia y resistencia farmacológica (Wieser et al., 2004). Dentro de las estructuras involucradas se ha determinado al sistema límbico y particularmente el hipocampo, la corteza entorrinal y la amígdala como las zonas de mayor alteración (Bartolomei et al., 2005). Además, suele encontrarse esclerosis hipocampal unilateral como producto de la atrofia, la pérdida de neuronas piramidales, proliferación patológica de interneuronas y gliosis asociada (Mathern et al., 1997). Dentro de los cambios estructurales presentes en la ELT destacan los brotes de fibras musgosas provenientes de células granulares. Estas fibras aberrantes inervarían células inhibitorias tipo basket cells localizadas en la capa granulosa del hipocampo, disminuyendo la excitabilidad neuronal (Sloviter et al., 2006). Otro cambio importante es la gliosis reactiva (Devinsky et al., 2013) asociada no solo a un estado ya avanzado, sino también al inicio y desarrollo de la epilepsia (epileptogénesis) (Ortinski et al., 2010; Robel et al., 2015). La activación microglial es uno de los primeros cambios observados, siendo capaz de ser detectada desde el inicio de status epilépticos, activar astrocitos y modular la actividad neuronal en la epilepsia (Eyo et al., 2017). La microglia puede ser activada a través de moléculas de ATP (utilizando receptores P2Y2) y algunos neurotransmisores liberados por células dañadas como neuronas, astrocitos y células endoteliales (Glutamato, BDNF, entre otros) (Rodgers et al. 2009; Trang et al., 2009). Otras modificaciones que ocurren en los procesos epileptogénicos y su cronicidad pueden involucrar cambios genéticos. Entre los más destacados está la sobre-regulación de genes a asociados a canales tipo T de calcio (e.g Cav3.2) (Dezsi et al., 2013) y mutaciones en canales

de Na⁺ voltaje dependiente (Catterall., 2012). De manera paralela, otros mecanismos involucrados se asocian a la liberación desde los astrocitos de neuro-esteroides que promueven la inhibición de receptores GABA_A como el allopregnanolone (Biagini et al., 2013) en la epileptogénesis al parecer claves en el establecimiento de la ELT.

Plasticidad sináptica y potenciación a largo plazo en la ELT

Producto de la re-organización anatómica y funcional que sufren producto de la epilepsia estructuras límbicas y paralímbicas, con especial atención en el hipocampo, se desarrolla además una modificación en las propiedades de las membranas celulares en las células involucradas. Dentro de estas modificaciones, tanto receptores metabotrópicos como ionotrópicos se pueden ver alterados y modificar así la plasticidad sináptica de dichas células (Morimoto et al., 2004). La ocurrencia de frecuentes crisis convulsivas puede producir fenómenos plásticos que conducirán a un proceso epileptogénico en el cerebro, que con el tiempo aumentará la intensidad de las crisis afectando a neuronas glutamatérgicas y a interneuronas GABAérgicas, observado por ejemplo en modelos in vitro (Bausch et al., 2006; Lopantsev et al., 2009). En el caso de las neuronas inhibitorias GABAérgicas se ha reportado en distintos modelos animales, como también en humanos, una disminución de la densidad de receptores ionotrópicos GABA_A asociado a procesos de re-estructuración post crisis convulsivas (Gibson et al., 2010; Thom et al., 2002). En el caso de los receptores NMDA se han observado al alza en hipocampos de pacientes con ELT post mortem, especialmente receptores NMDA ricos en subunidades NR2A y NR2B (Mathern et al., 1999; DeMoura et al., 2012; Wearick-Silva et al., 2019). Diversos estudios han puesto su atención en el rol que tiene el aumento en la eficacia de la transmisión glutamatérgica como uno de los mecanismos principales detrás de la epilepsia (Mori y Wada., 1987; Ueda et al., 2000).

Sin ir mas lejos, la estimulación con glutamato puede producir descargas tipo epilépticas y si es de manera repetitiva un tipo de kindling (kindling glutamatérgico) (Croucher y Bradford., 1989; Croucher and Bradford., 1990^a). Se ha reportado que la aplicación de NMDA aplicada previamente a un kindling eléctrico, en un animal sin convulsiones, facilitará a posterior la inducción de la actividad tipo epiléptica (Croucher et al., 1997). Desde esta perspectiva y considerando cómo la mejora en la eficacia sináptica, glutamatérgica especialmente, facilita la inducción de la epilepsia en modelos animales, es posible considerar la epileptogénesis como un proceso patológico de plasticidad sináptica y re organización morfofuncional del cerebro. Finalmente, se ha observado que la inducción de modelos epilépticos en ratas ha incrementado de manera la amplitud de EPSP poblacionales en el sistema límbico (Racine et al., 1972; Douglas y Goddard, 1975; Sutula y Steward, 1986; Maru y Goddard, 1987a; de Jonge y Racine, 1987).

Epilepsia y astrocitos

Rol de los astrocitos en la epileptogénesis y los modelos epilépticos

Tal es la importancia que tienen los astrocitos en el funcionamiento normal del sistema nervioso central que cualquier disrupción a este puede modificar el comportamiento glial y específicamente en los astrocitos. Durante los últimos años se han reportado diversos estudios en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y epilepsia (Tian et al., 2005; Maragakis and Rothstein, 2006; Vargas and Johnson, 2010; Vincent et al., 2010; Carmignoto and Haydon, 2012; Parpura et al., 2012), relacionando los astrocitos con estas heterogéneas entidades semiológicas. Un hallazgo común en numerosas alteraciones del SNC es la astrogliosis reactiva, la cual evidencia hipertrofia e hiperplasia astrogliar, alteraciones metabólicas y cambios en la expresión de proteínas (Sofroniew and Vinters, 2010). En la enfermedad de Alzheimer por ejemplo utilizando modelos animales, se ha

demostrado in vivo que la actividad basal Ca^{2+} -dependiente de la red astrogliar se encuentra aumentada, observándose una hipersincronía astrocítica acompañada de un aumento en la incidencia de ondas de Ca^{2+} (Kuchibhotla et al., 2009). Se ha sugerido recientemente que aquello requiere de la liberación de ATP astrogliar a través de hemicanales (HC) formados por Conexinas (Cx) y la activación de receptores purinérgicos tipo $\text{P2Y}_1\text{R}$, los cuales están sobreexpresados en astrocitos reactivos (Delekate et al., 2014). Los $\text{P2Y}_1\text{R}$ son receptores de tipo metabotrópicos ubicados en la membrana de diversos astrocitos, activados por vías extracelulares que permiten la propagación de ondas de Ca^{2+} previamente descritos (Kang et al., 2008; Di Castro et al., 2011; Torres et al., 2012). La facultad que tiene el astrocito de regular la transmisión sináptica (Bonansco et al., 2011) y la abundante evidencia que posicionan a las alteraciones gliales en el marco de la epilepsia y la epileptogénesis (Devinsky et al., 2011; Ortinski et al., 2010; Robel et al., 2015; Boison et al., 2016; Steinhäuser et al., 2016), sugieren el rol que tiene el astrocito en la epileptogénesis. Considerando la importancia en procesos plásticos de la comunicación astrocito-neurona y las vías de señalización astrocito-astrocito indicadas, en el cerebro epiléptico, los astrocitos reactivos exhiben diversos cambios en la expresión de proteínas que regulan las señales purinérgicas y la concentración de ATP y sus metabolitos (Cx43, Panx1, P2r, entre otros) (Gouder et al., 2004; Cieslax et al., 2017). De hecho, evidencia reciente sugiere que algunos cambios en la señalización purinérgica puede estar asociada de manera específica a la fisiopatología epiléptica y a la generación de crisis convulsivas (Ding et al., 2007; Santiago et al., 2011; Pascual et al., 2012; Alves et al., 2017), observándose un patrón anormal en las señales de Ca^{2+} astrogliales en el hipocampo de ratas bajo un modelo de epilepsia crónica, requiriendo la actividad de HC de Panx1 y $\text{P2Y}_1\text{R}$, siendo este último probablemente el gatillante de las ondas anormales de Ca^{2+} (Wellmann et al., 2018). Otros estudios realizados

en cultivos de corteza fetal humana han observado que las señales de Ca^{2+} mediadas por ATP son principalmente controladas por receptores PDY_1 , sin contribución de receptores PDX (Muller et al., 2017). Al parecer las alteraciones en esta familia de receptores purinérgicos no se limita a la propagación de señales de Ca^{2+} anormales que modifican la interacción con neuronas vecinas, si no que también en modelos epilépticos al parecer son claves en la sinaptogénesis de este fenómeno, regulando la señalización de ciertas vías fundamentales para este proceso (TSP-1/TGF- β 1) (Sun et al., 2018).

Modelos de inducción de la actividad tipo epiléptico y de la epileptogénesis

La creación de modelos que simulen actividad epileptiforme en animales para su estudio ha sido fundamental en el conocimiento actual de la enfermedad y su fisiopatología. Los dos modelos más utilizados son los de inducción de un estado epiléptico y el kindling. Ambos han provisto información sobre cómo en la epilepsia se producen cambios a largo plazo en el funcionamiento sináptico, como por ejemplo cambios en mRNA, en los neurotransmisores, receptores, canales iónicos, mensajeros intracelulares y cambios neurotróficos (Morimoto et al, 2004). Los modelos de estado epiléptico más utilizados es la inducción de agentes convulsivantes como el kainato, picrotoxina y la pilocarpina (Loscher, 2002) o en otros casos el uso de 4-aminopiridina (4-AP) (Perreault y Avoli, 1992). Estos fármacos además son usualmente utilizados en el caso de estudios in vitro en presencia de una solución de registro que favorezca la probabilidad de liberación excitatoria como en soluciones libres de Mg^{2+} . En cuanto al kindling es un método que utiliza la electroestimulación de estructuras cerebrales y es uno de los pocos métodos epileptogénicos, es decir que logra el desarrollo crónico de un estado epiléptico (Goddard, 1967; Racine, 1972b), siendo más preciso en el control y la progresión de un foco epiléptico (Goddard,

1969). Una pregunta ampliamente buscada en estas investigaciones es cómo determinar de manera funcional la actividad epileptiforme más allá de los registros eléctricos. Una solución a esto ha sido el marcaje de ^{14}C -2-desoxiglucosa (Handforth & Ackermann, 1995) y el de C-Fos con mayor especificidad en relación con las regiones de activación neuronal durante fenómenos epileptiformes (Dragunow and Robertson, 1987). Durante etapas tempranas del kindling en estructuras límbicas la expresión de c-fos se limita al hipocampo de manera bilateral (Sato et al., 1998), sugiriendo que la extensión a estructuras externas es un proceso que involucra conectividad funcional. En la medida que los fenómenos epileptogénicos progresan, una de las primeras estructuras cerebrales en aumentar la expresión de c-fos es la corteza piriforme, sugiriendo un rol clave en reclutar la circuitería clave para llegar a otras estructuras, como por ejemplo la corteza motora. En el caso específico del kindling inducida por estimulación de la amígdala basolateral las primeras estructuras en aumentar su activación son el núcleo amigdaliano y cortezas piriformes, insulares, perinasales y endopiriformes (Sato., 1998). El hipocampo en estos últimos modelos no es crucial en la generalización de la actividad epileptiforme, siendo ocasional la expresión de niveles más altos de c-fos (Dragunow et al., 1988; Clark et al., 1991; Hosford et al., 1995; Ebert and Loscher, 1995b; Sato et al., 1998). Aún así, dada su susceptibilidad endógena, el hipocampo expresa cambios de excitabilidad propios del foco epileptogénico.

Existiendo distintos métodos en el kindling que varían en el tiempo utilizado y en la intensidad del estímulo, clasificados como sub-umbral y supra-umbral. Comúnmente los protocolos sub-umbral son de lenta aplicación y mantienen relativamente intactas las estructuras estimuladas. En cuanto a los protocolos supra-umbral si bien no poseen esta característica, tienen la ventaja de ser de rápida aplicación (Morimoto et al, 2004) en el trabajo propuesto se utilizará un método recientemente publicado de inducción rápida de

kindling que además trabaja con intensidad sub-umbral (Morales J et al, 2014) y que a través de la estimulación eléctrica periódica de la amígdala se logra un modelo crónico de ELT.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En resumen, las evidencias planteadas en los párrafos anteriores, indican que:

- La plasticidad sináptica es un fenómeno tripartito donde los astrocitos tienen un rol fundamental en su inducción y expresión.
- La epilepsia de lóbulo temporal es una forma aberrante de plasticidad sináptica la cual puede afectar la capacidad de expresar LTP.
- Los astrocitos participan activamente en la generación y mantención de la actividad epiléptica.

Por lo que la problemática central de este estudio es:

¿Contribuyen los astrocitos reactivos en las alteraciones de la inducción de LTP en neuronas piramidales hipocampales en un modelo de epilepsia de lóbulo temporal en rata adulta?

Hipótesis

La hiperexcitabilidad astrogliar en el hipocampo epiléptico de ratas adultas afecta la inducción de LTP en neuronas piramidales de CA1.

Objetivo general

Determinar la participación de la actividad astrogliar en la inducción de LTP en el hipocampo epiléptico de ratas adultas.

Objetivos específicos

- Evaluar la inducción de la LTP en neuronas glutamatérgicas del hipocampo epiléptico
- Evaluar la actividad astrogliar en las neuronas glutamatérgicas del hipocampo epiléptico durante la inducción de LTP
- Evaluar la participación de la señalización astrogliar Ca^{2+} dependiente durante la inducción de LTP en el hipocampo epiléptico

METODOLOGÍA

Todos los procedimientos y el cuidado de los animales fueron realizados de acuerdo a las normas del Comité de Ética y Cuidado Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso y el NIH (EE.UU.).

Cirugía estereotáxica

Ratas macho Spague-Dawley (p35) fueron anestesiadas y sometidas a cirugía estereotáxica para la implantación de electrodos (Greenwood et al., 1991; Corcoran et al., 2011). Se implantó un electrodo de estimulación/registro en el complejo amigdalino basolateral derecho y dos pares de electrodos de registro bilaterales en la corteza motora primaria (Br. -2.12 mm, ML. \pm 2.0 mm, DV. 1.5 mm) y en la corteza visual (Br. -6.12 mm, ML. \pm 2.5 mm, DV. 1.5), ello de acuerdo a lo indicado en el atlas de cirugía estereotáxica de Paxinos y Watson (1998). Luego de la cirugía los animales tuvieron a lo menos una semana de recuperación, para posteriormente ser sometidos al protocolo de kindling. Se les proporcionó a las ratas acceso a alimento y agua ad-libitum antes, durante y luego de todo procedimiento experimental.

Protocolo de kindling

Para la inducción de epileptogénesis se utilizó un protocolo de kindling rápido (RK) desarrollado en nuestro laboratorio. Por tres días se aplicaron 10 trenes diarios de pulsos de corriente cuadrados bifásicos a intensidad debajo del umbral de postdescarga (AD) (Morales et al., 2014). Las ratas sometidas al protocolo RK exhiben actividad epileptiforme progresiva, la cual se propaga por el cerebro y se acompaña de convulsiones que evolucionan en severidad en paralelo a la actividad epiléptica. Las AD fueron monitoreadas utilizando electrocorticografía (ECG), mientras que las convulsiones fueron evaluadas utilizando la

escala conductual de Racine (Racine, 1972). Las ratas fueron consideradas como epilépticas (i.e.: fully kindled o kindleadas) luego de haber sufrido al menos cinco crisis epilépticas generalizadas consecutivas (i.e.: estados de Racine 4 y 5) acompañadas de AD de larga duración (Morales et al., 2014). Bajo estas condiciones, tanto estructuras mesolímbicas como corticales son consideradas tejido epiléptico, incluida la formación hipocampal (Morales et al., 2014). El grupo control (CT) consideró ratas sham, sometidas a cirugía estereotáxica para la implantación de electrodos sin haber sido estimuladas posteriormente, y ratas control. Importante es mencionar que no se observaron crisis ictales o interictales espontaneas en rebanadas de hipocampo de ratas kindleadas, a pesar de exhibir las neuronas piramidales una mayor excitabilidad en comparación con ratas sham y controles. Debido a que no se observó diferencia entre los grupos sham y control en ninguno de los procedimientos realizados, los datos de ambas poblaciones fueron agrupados y considerados como un solo grupo control.

Obtención de rebanadas de hipocampo

Los registros in situ se llevaron a cabo utilizando rebanas coronales de hipocampo obtenidas según se especifica en Bonansco et al., (2002) y Fuenzalida et al., (2009). El cerebro fue rápidamente removido por craneotomía y sumergido en liquido cerebroespinal artificial (LCA) frío (<4°C) a pH 7.4 estabilizado mediante burbujeo de gas carbógeno (95% O₂ – 5% CO₂). La composición del LCA (mM): 124.0 NaCl, 2.7 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2.0 Mg₂SO₄, 26.0 NaHCO₃, 2.5 CaCl y 10.0 glucosa. Utilizando un vibrátomo (Pelco 3000, St. Louis, MO.) se obtuvieron rebanadas transversales de hipocampo (300 – 400 µm), las cuales fueron incubadas en LCA (>1h) a temperatura ambiente. En algunos casos las rebanadas fueron obtenidas utilizando una solución de corte a base de sucrosa (en mM): 215.0 sucrosa, 2.5 KCl, 20.0 glucosa, 26.0 NaHCO₃, 1.6 NaH₂PO₄, 1 CaCl₂, 4 MgCl and 4 MgSO₄ saturada

con 95% O₂/5% CO₂. Posteriormente las rebanadas fueron transferidas y fijadas a una cámara de registro (2 ml) fijada bajo un microscopio (FN100 IR; Nikon Inc.; Japan) equipado con un objetivo 40X de inmersión en agua y dispositivos para la captura de imágenes en infrarrojo y de contraste por interferencia diferencial. Las rebanadas fueron perfundidas con LCA (2ml/min) burbujeadado con gas carbógeno y mantenidas a temperatura ambiente (21-24°C).

Registros electrofisiológicos

Utilizando la técnica de registro de campo se realizarán registros electrofisiológicos extracelulares en el stratum radiatum de CA1. Para medir potenciales post-sinápticos excitatorios de campo (fEPSP) se emplearon pipetas de 3-5 MΩ rellenas con solución ACSF del medio y amplificadas. La estimulación fue realizada con electrodos concéntricos (platino /iridio, 125 μm OD diámetro; FHC Inc.). Para monitorear los cambios de la amplitud de los fEPSP se aplicaron pulsos simples aplicados cada XX s. Para evaluar posibles cambios presinápticos se utilizo un protocolo de pulsos pareados convencional (tiempo inter-estímulo de 80 ms, duración 100 μs, aplicado cada XXs), midiendo el índice de pulsos pareados (PPR), como la razón entre la amplitud del fEPSP al primer estímulo dividido por amplitud al segundo estímulo (i.e.: R2/R1). Además se obtuvo el porcentaje de cambio, siendo el registro basal el 100% comaparado.

Para la inducción de LTP se usaron dos tipos de protocolo de estimulación; TBS y HFS. en campo fue a través de 5 trenes de 100 Hz, 500 ms de duración, separados entre 200 ms – 500 ms y un ancho de cada pulso de 100 μs (Christie BR ey al., 1994). . Además, se realizaron registros electrofisiológicos intracelulares (EPSC) utilizando la técnica de patch clamp en configuración whole cell de neuronas piramidales CA1 del hipocampo, en configuración de voltage clamp. Se emplearon pipetas de 3-5 MΩ rellenas con solución

intracelular ajustada a pH 7.2 y conectadas a un amplificador EPC-7 (Heka instruments). La composición de la solución intracelular fue gluconato de potasio: 32.5 KCl, 10.0 HEPES, 1.0 MgCl₂ 6H₂O, 5.0 EGTA, y 4.0 Na₂-ATP. En esta configuración el protocolo de inducción de la LTP, tanto en los experimentos de inducción simple como en los de saturación de la LTP, consistió en una estimulación a ritmos theta (theta burst stimulation o TBS) de 10 ráfagas de 5 pulsos cada una, cada 200 ms. Esto fue realizado en 10-12 ocasiones cada 30 segundos (Abraham et al., 1997). La medición de los EPSP fue través de pulsos simples de similares características para evitar la aparición de corrientes de acción. Todos los protocolos experimentales fueron llevados a cabo luego de un periodo de 5 a 10 minutos de estabilización después de haber alcanzada la configuración whole-cell. En esta configuración además se realizaron test de saturación que consistió en la aplicación de un segundo protocolo de TBS (TBS2) 30 minutos después del TBS1. Todas las células en donde se observó un cambio superior al 20% en la resistencia de acceso (Ri) fueron descartadas del análisis.

Registro de las oscilaciones de Ca²⁺ astroglial

Las oscilaciones espontaneas de Ca²⁺ astroglial fueron monitoreadas mediante microscopia de fluorescencia utilizando una cámara de registro CCD Andor DR-328G. Fluo-4 AM fue empleado como indicador de calcio, aplicado por bulk-loading. El control de la adquisición de las imágenes se llevó a cabo utilizando el software Nis-Elements AR 3.1 (Nikon). En breve, para identificar los astrocitos en el hipocampo se incubó con el marcador morfológico sulforrodamina 101 (SR101; 0.5-1 μM) (Kafitz et al., 2008) durante 20 – 30 minutos en LCA bajo en Ca²⁺ (alto en Mg²⁺) a 32-34°C. Luego las rebanadas fueron transferidas a una cámara de mantención con LCA regular durante 30 min. Posteriormente se les transfirió a una cámara de incubación con Fluo-4 AM (5 - 10 μM) disuelto en LCA

regular durante 75 minutos a temperatura ambiente. Para preparar el Fluo-4 AM se utilizaron 4 μ l de DMSO y 3 μ l de ácido plurónico (20% en DMSO), añadidos directamente a un vial de FLOU4-AM; 1-2 μ l de la solución fueron aplicados directamente al hipocampo. Bajo estas condiciones la gran mayoría de las células cargadas con Fluo-4 AM son astrocitos (Aguado et al., 2002; Navarrete and Araque, 2008).

Las células fueron iluminadas (área de 36700 μ m²) con una lámpara de xenón a 490 nm a una frecuencia de 1 Hz durante 5 minutos y el tiempo de exposición, regulado por un obturador (Lambda SC Smart shutter, Sutter Instrument Company). Se utilizaron los software Niss-Elements AR 3.2 (Nikon, Japan) para el control de la adquisición de imágenes y el análisis off-line, y pClamp de Molecular Devices (USA) para la cuantificación de las oscilaciones de Ca²⁺. Las elevaciones de Ca²⁺ fueron cuantificadas a través de la definición de regiones de interés (ROIs) elípticas, manualmente ajustadas a la forma y el tamaño del área que exhibía variaciones en su intensidad de fluorescencia. Además se utilizó la colocalización con SR101 y el reconocimiento morfológico a través de microscopía infrarroja. Las variaciones de Ca²⁺ fueron estimadas como cambios en la señal de fluorescencia por sobre la fluorescencia basal ($\Delta F/F_0$), luego de haber extraído el ruido de fondo. Fueron consideradas como oscilaciones de Ca²⁺ aquellos eventos en donde $\Delta F/F_0$ excedió por encima de dos desviaciones estándar la fluorescencia basal por al menos dos cuadros consecutivos. Las variables utilizadas para caracterizar las oscilaciones espontáneas de Ca²⁺ astrogial fueron la duración (en segundos), expresada como la duración total de la oscilación; y el número de oscilaciones de Ca²⁺ por área. Fueron considerados como eventos independientes aquellos en donde la $\Delta F/F_0$ disminuyó por debajo del 50% en relación a F₀. La duración de las oscilaciones de Ca²⁺ se distribuyó entre dos poblaciones según el percentil 75th de distribución acumulativa, correspondiente a 13 segundos, utilizado como criterio de

corte y a partir de la cual los eventos aleatorios en un mismo astrocito se clasificaron en lentos (STs > 12 seg) o transitorios rápidos (FT < 13 seg). Utilizamos además la relación de frecuencia FT/ST como un índice de hiperexcitabilidad astrocítica, donde un índice más bajo estaría asociado a una mayor excitabilidad dependiente de Ca^{2+} (Wellmann et al., 2018).

Para los registros bajo estimulación con TBS se observó la actividad espontánea durante los primeros 120 segundos (pre-TBS) para luego aplicar según el protocolo la estimulación en los próximos 120 segundos (estim-TBS), finalmente se dejaron 60 segundos de registro por video para visualizar la actividad posterior (post-TBS).

Farmacología

Todos los registros fueron realizados bajo el efecto de Picrotoxina $10\mu M$ en el sistema de perfusión (Bonansco C et al, 2011). Para el bloqueo de los receptores P2Y1 se utilizó MRS2179 ($10\mu M$) perfundidos directamente al baño (Alvarez-Ferradas et al., 2014).

Análisis estadístico

En todos los casos se determinó en primer lugar la distribución de cada población (Shapiro-Wilk test, Kolmogorov-Smirnov test). Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar (SEM). En caso de que la distribución sea no-paramétrica se acompañó el promedio de su mediana. De acuerdo a lo obtenido, se utilizaron test paramétricos (Student's test de dos colas) o no paramétricos (Mann-Whitney test), según se indica. Para comparaciones múltiples se utilizó ANOVA o Kruskal-Wallis test según corresponda, ambos con corrección de Bonferroni post-hoc. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando se obtuvo un $p < 0.05$; $p < 0.01$ o $p < 0.001$, según se indique.

RESULTADOS

Hiperexcitabilidad en sinápsis glutamatérgicas en el hipocampo epiléptico y disminución de la LTP en registros de campo

Para evaluar la transmisión y excitabilidad en las sinapsis CA3-CA1 comparamos en registros de fEPSP estimulando las fibras colaterales de Schaffer y registrando en el stratum radiatum de rebanadas de hipocampo de ratas control y kindling (Andersen et al., 1991). En la Fig.1A, se muestran registros representativos superpuestos de control y kindling, en respuesta a la estimulación sináptica, observándose que a valores similares de amplitud de la fV, la amplitud de las fEPSP fueron mayores en hipocampo epiléptico versus controles. La relación entre los valores individuales de amplitud del fEPSP en función de la amplitud de la fV (i.e.: curva de entrada/ salida) muestra que la excitabilidad en el hipocampo de ratas epilépticas presenta mayores valores de fEPSP para cada valor de fV (control fV $16.15 \pm 1.91 \mu\text{V}$; fEPSP $48.24 \pm 5.17 \mu\text{V}$, $n=33$, versus kindling fV $15.11 \pm 1.75 \mu\text{V}$; fEPSP $81.17 \pm 6.75 \mu\text{V}$, $n=43$; $p=0.0005$). Posteriormente evaluamos el valor de intensidad al cual empieza a aparecer la espiga poblacional (pS del inglés population spike) en la respuesta de campo, el cual ha sido ampliamente utilizado como indicador de excitabilidad postsináptica (Andersen et al., 1991; Marion-Poll and Tobin, 1991; Hedwig y Knepper, 1992; Gholmieh et al., 2004). En rebanadas del grupo kindling los valores umbral de la pS fueron menores que los del grupo control, (Fig.1B; control $49.4 \pm 1.49 \mu\text{V}$, $n=10$, versus kindling $30.6 \pm 1.55 \mu\text{V}$, $n=10$; $p=0.00000007$). En conocimiento que diversos mecanismos relacionados con la memoria y el almacenamiento de la información están alterados en modelos epilépticos (Morimoto et al., 2004; Comper et al., 2017), para determinar la expresión de LTP en registros de campo en el hipocampo control y kindling utilizamos un protocolo de inducción de HFS (Habib y Dringenberg., 2010) midiendo las variaciones de amplitud de la fEPSP, a

través de un protocolo de pulsos pareados. Registros representativos grabados antes (1) y 40 min después (2) de la estimulación a alta frecuencia muestran un aumento de la amplitud del fEPSP, la cual fue mayor en el grupo control que en kindling (Fig.1CyD). La amplitud relativa de los fEPSP mostrados en la Figura 1E, es mayor en el grupo control que en kindling, expresando en ambos grupos una potenciación post-tetánica similar. Si bien tanto el grupo control como kindling expresan LTP, kindling expresa solo un tercio de la LTP alcanzada por el grupo control (Fig. 1F) (control $169.60 \pm 1.41\%$, $n=6$, versus kindling $125.36 \pm 0.79\%$, $n=6$; $p=0.00000001$). Tanto en control como en kindling, las diferencias de PPR basal (control 1.24 ± 0.03 , $n=7$, versus kindling 1.13 ± 0.07 , $n=7$; $p=0.97$) es mantenida sin presentar cambios antes y después la aplicación del protocolo de inducción (Fig.1D; control 1.21 ± 0.07 , $n=7$, versus kindling 1.17 ± 0.06 , $n=7$; $p=0.85$). Los porcentajes de cambio en el ratio R2/R1 antes y 40 minutos después de la estimulación son presentados en la Fig.1F (control 102.48%, versus kindling 96.58% en relación al valor basal). Estos resultados indican que en rebanadas de hipocampo obtenidas de ratas kindleadas, tanto la excitabilidad postsináptica como la liberación de neurotransmisor se encuentra basalmente aumentada. En estas condiciones, la LTP inducida por HFS en rebanadas de ratas kindleadas alcanza menor tasa de potenciación respecto al control.

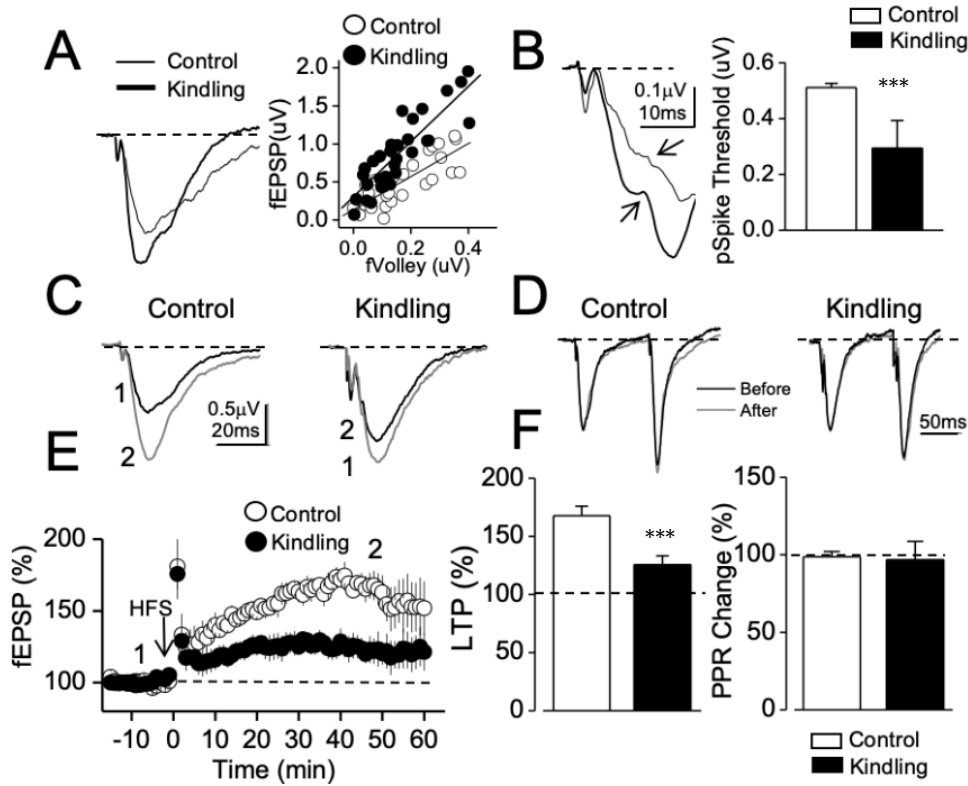


Figura 1. Hiperexcitabilidad en sinápsis glutamatérgicas y disminución de la LTP en registros de campo del hipocampo epiléptico. (A) izquierda, registros de una respuesta representativa fEPSP sobrepuesta de control y kindling, evocadas con pulso simple, en la cual se aprecia la volea presináptica (fV); derecha, curva de entrada vs salida para los valores de fEPSP en función de fV, registrados en ambos grupos. (B) A la izquierda, los trazos representativo de la diferencia de aparición de las espigas poblacionales (pS) entre ratas controles y kindling; a la derecha gráfico de los valores promedio de la amplitud de las fV necesaria para la aparición de population spikes. (C) Trazos representativos de pulsos simples antes (1) de la aplicación de un protocolo de HFS y después (2), a la izquierda grupo control y a la derecha grupo kindling. (D) Trazos representativos de pulsos pareados (tiempo inter-estímulo 80 ms) antes (gris oscuro) de la aplicación de un protocolo de HFS y después (gris claro), a la izquierda grupo control y a la derecha grupo kindling. (E) Curso temporal del porcentaje de cambio en la amplitud de los fEPSP en control (o) y kindling (●). ↓ indica la aplicación del protocolo de HFS. (F) A la izquierda resumen de los promedios de porcentaje de cambio de los fEPSP medido a los 45 minutos post-HFS; A la derecha, porcentaje de cambio expresado en el índice de los pulsos pareados comparándolos valores basales respecto a los 45 minutos post-HFS. T test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) según corresponda.

Disminución de la LTP en sinápsis glutamatérgicas en registros intracelulares del hipocampo epiléptico

Para evaluar las diferencias de expresión de la LTP a nivel celular en el grupo control versus kindling, realizamos registros intracelulares de las respuestas sinápticas evocadas utilizando la técnica de whole cell en patch clamp, en configuración de voltage clamp. Dado que la inducción de la plasticidad es fuertemente dependiente de la variación de los parámetros de estimulación (Abraham et al., 1997), evaluando otro protocolo de inducción alternativo se estimuló las colaterales de Schaffer con un protocolo de TBS y se registró en el stratum pyramidale de CA1. En la Fig. 2A se observan registros representativos superpuestos utilizando un pulso simple antes (1) de la aplicación de TBS y después (2). Se puede observar que existe un aumento en la amplitud del EPSC entre (1) y (2) en el grupo control, no así en el grupo kindling. En la Fig. 2B se observa el curso temporal de los EPSC registrados antes y después de la aplicación de TBS. El porcentaje de cambio de los EPSC medidos a los 40 minutos post TBS es mayor en el grupo control que en el kindling, logrando un peak de 250 % de cambio en comparación con su registro base (control $205.14 \pm 3.93\%$, $n=6$, versus kindling $119.55 \pm 4.85\%$, $n=5$; $p=0.00003$). Para medir la Pr en dicho registro, utilizamos el protocolo de pulsos pareados ya descrito. En este último se extrae un resultado muy similar al de los registros de campo, donde se observa en ambos casos, control y kindling, una facilitación por pulsos, sin cambios posterior a la aplicación de TBS. De esta manera, tanto en control como en kindling, las diferencias de PPR basal (control 1.34 ± 0.06 , $n=6$, versus kindling 1.38 ± 0.11 , $n=6$; $p=1.1$) es mantenida sin presentar cambios antes y después la aplicación del protocolo de inducción (Fig. 2C y D; control 1.29 ± 0.05 , $n=6$, versus kindling 1.4 ± 0.18 , $n=6$; $p=1.13$). Al ser expresado en porcentaje (Fig. 2D), se observa que no hubo cambios tanto en control como en kindling en el ratio R2/R1 (control 103.88% versus

kindling 98.58% en relación al valor basal). Estos resultados indican que en registros unicelulares la sinápsis glutamatergica del hipocampo epiléptico no es capaz de expresar LTP de manera robusta como en el caso control, incluso utilizando un protocolo de inducción más potente que la clásica estimulación a alta frecuencia, evidenciando un mecanismo fundamentalmente post-sináptico a la ausencia de cambios en la Pr antes y después del TBS.

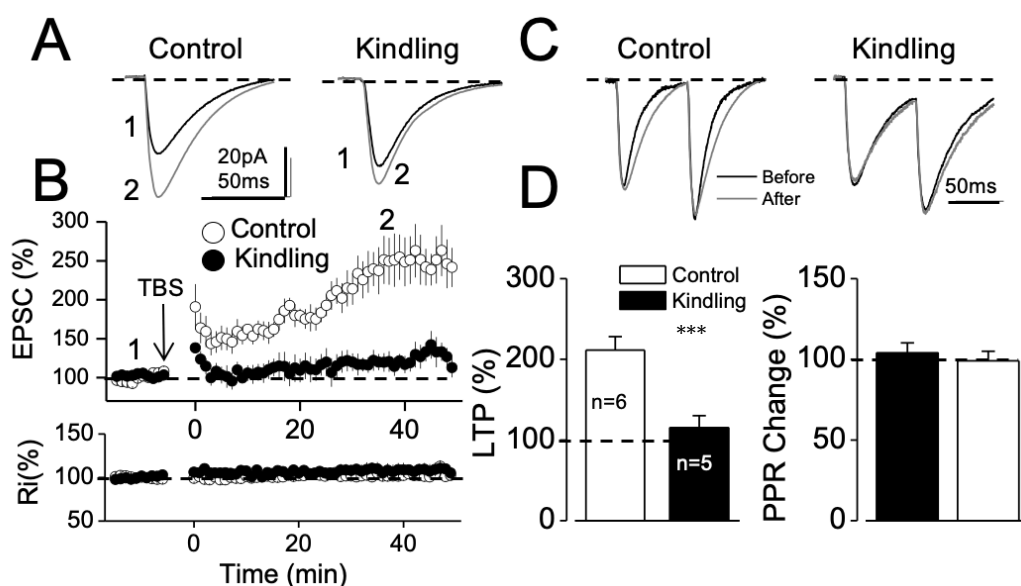


Figura 2. Disminución de la LTP en sinápsis glutamatergicas del hipocampo epiléptico en registros unicelulares. (A) A la izquierda (control) y a la derecha (kindling) trazos representativos sobrepuestos de antes (1) y después (2) de la estimulación con TBS evocados con pulso simple. (B) Arriba: Curso temporal del porcentaje de cambio de los EPSC en control (o) y kindling (●). ↓ indica TBS; Abajo: Curso temporal del porcentaje de cambio de la resistencia de acceso (Ri). (C) Trazos representativos de pulsos pareados (tiempo inter-estímulo 80 ms) antes (gris oscuro) de la aplicación de un protocolo de TBS y después (gris claro), a la izquierda grupo control y a la derecha grupo kindling. (D) A la izquierda resumen de los promedios de porcentaje de cambio de los EPSC medido a los 40 minutos post-TBS; A la derecha, porcentaje de cambio expresado en el radio de los pulsos pareados comparado a los 40 minutos post-TBS. T test (*p<0.05; **p <0.01; ***p <0.001) según corresponda.

La aplicación reiterada del protocolo de inducción de potenciación no induce LTP en sinápsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico

Para evaluar si la estimulación reiterada con un protocolo de TBS es capaz de expresar LTP se aplicó por segunda vez (TBS2) el protocolo de estimulación ya descrito en las colaterales de Schaffer, luego de 30 minutos aplicado el TBS1 en registro intracelular con configuración de voltage clamp. En la Fig.3A se pueden observar registros superpuestos de pulsos simples que dan cuenta de las diferencias de amplitud comparadas pre-TBS (1), post-TBS1 (2), promediando las amplitudes de los EPSC a los 20 minutos luego de la primera estimulación y post-TBS2 (3), promediando las amplitudes de los EPSC luego de 20 minutos aplicada la segunda estimulación. Acá podemos visualizar cómo en el caso del grupo control (izquierda) las amplitudes promedios, a través de un pulso simple, de los EPSC fue incrementando en la medida que se repitió la estimulación eléctrica, mientras que en el grupo kindling las amplitudes promedios no aumentaron. En la Fig.3B se puede observar el registro temporal del porcentaje de cambio de los promedios de EPSC medidos antes de la estimulación, post-TBS1 y post TBS2, donde es posible evidenciar la saturación en el aumento de la eficacia sináptica, es decir de la LTP en el grupo de hipocampo epiléptico (control $203.68 \pm 2.83\%$, $n=5$, versus kindling $121.57 \pm 2.43\%$, $n=6$; $p=0.00001$). Para determinar el mecanismo del fenómeno observado se aplicó un test por pulsos pareados antes de la estimulación y post TBS 2 (a los 60 minutos de registro), logrando observar que la diferencia de PPR basal (control 1.38 ± 0.15 , $n=6$, versus kindling 1.39 ± 0.08 , $n=6$; $p=0.96$) es mantenida sin presentar cambios antes y después de la aplicación del protocolo de induccion (Fig.3CyD; control 1.46 ± 0.12 , $n=6$, versus kindling 1.44 ± 0.14 , $n=6$; $p=0.91$ / Porcentaje de cambio control 105.33% versus kindling 96.53%). De esta manera, nuestros resultados indican que en el caso de la sinápsis glutamatérgica del hipocampo epiléptico la expresión

de LTP no se logra al estimular de manera repetida las colaterales de Schaffer, encontrándose saturadas desde la primera estimulación y sin cambios en la probabilidad de liberación.

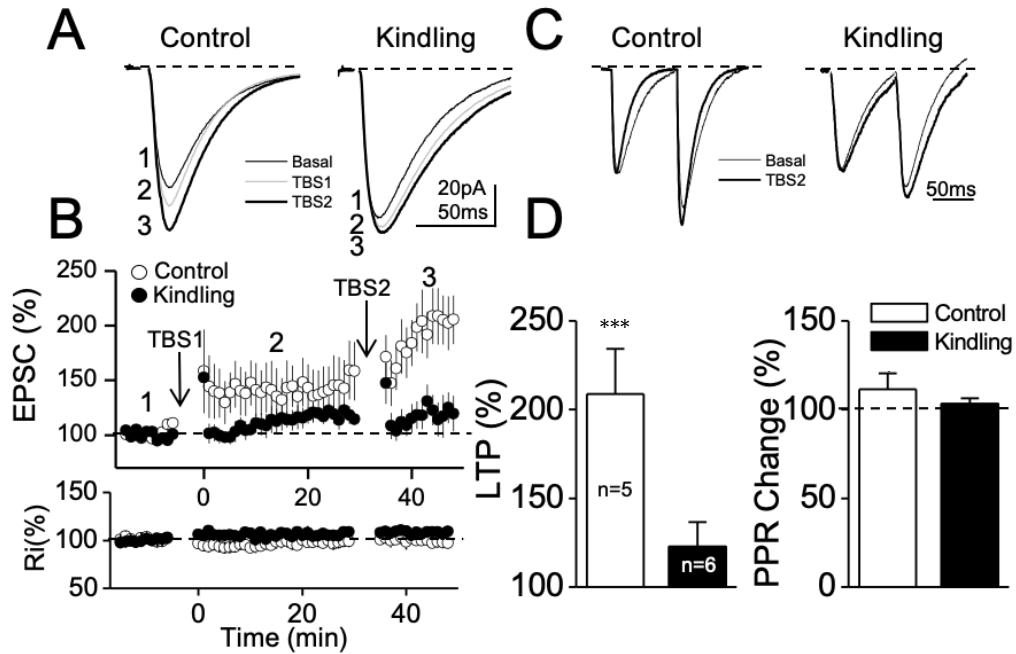


Figura 3. Inducción reiterada de la LTP en sinápsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico. (A) A la izquierda (control) y a la derecha (kindling) trazos representativos de antes (1) y post-TBS1 (2) y post-TBS2. (B) Arriba: Curso temporal del porcentaje de cambio de los EPSC en control (o) y kindling (●). ↓ indica TBS; Abajo: Curso temporal del porcentaje de cambio de la resistencia de acceso (Ri). (C) Trazos representativos de pulsos pareados (tiempo inter-estímulo 80 ms) antes y post-TBS2, a la izquierda grupo control y a la derecha grupo kindling. (D) A la izquierda resumen de los promedios de porcentaje de cambio de los EPSC medido a los 20 minutos post-TBS2; A la derecha, porcentaje de cambio expresado en el radio de los pulsos pareados comparado antes y a los 20 minutos post-TBS2. T test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) según corresponda.

Recuperación de la LTP en sinápsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico a través del bloqueo de la comunicación astroglial a través de receptores P2Y₁

Dado el papel que tienen los astrocitos sobre el establecimiento de un umbral para la expresión de la plasticidad sináptica (Bonansco et al., 2011; Perea et al., 2014), y considerando que a través de la activación de receptores PDY₁ por ondas de Ca²⁺ astrogliales es posible modular la Pr (Álvarez-Ferradas et al., 2015), se utilizó un antagonista específico de los receptores PDY₁: mrs2179, para evaluar si la expresión de la LTP se recuperaba

disminuyendo la comunicación astrocito-astrocito en el hipocampo epiléptico. En la Fig.4A se observan registros representativos a través de pulsos simples, donde se observa un aumento en la amplitud de los EPSC post TBS tanto en control como en kindling en presencia de MRS2179. Junto con ello, al observar el curso temporal del porcentaje de cambio de los EPSC (Fig.4B) es posible observar niveles similares de potenciación post-TBS (2) en comparación a su línea de base (1) (control $165.40 \pm 1.93\%$, $n=5$, versus kindling $162.99 \pm 4.06\%$, $n=6$; $p=0.39$). Para determinar el mecanismo del fenómeno observado se aplicó un test por pulsos pareados antes de la estimulación y post TBS único (Fig.4C), mostrando una facilitación en el segundo pulso tanto en el grupo control (izquierda) como en kindling (derecha). Sin embargo, y tal cuál se observa en situaciones fisiológicas, tanto en control como en kindling en presencia de MRS2179, la diferencia de PPR basal (control 1.49 ± 0.11 , $n=6$, versus kindling 1.29 ± 0.10 , $n=6$; $p=0.78$) es mantenida sin presentar cambios antes ni después de la aplicación del TBS (Fig.4D; control 1.44 ± 0.03 , $n=6$, versus kindling 1.29 ± 0.13 , $n=6$; $p=0.85$). A modo de resumen, en la Fig.4D contemplamos gráficos de los promedios de porcentaje de cambio de los EPSC, sugeridos como el nivel de LTP (izquierda), notando que en ambos grupos experimentales hubo un aumento de la eficacia sináptica, sin diferencia inter-grupo. Además, los porcentaje de cambio del índice de pulsos pareados antes y después del protocolo, no detectaron diferencias inter-grupo (control 103% versus kindling 100%). Así, nuestros resultados sugieren que al bloqueo de los receptores PDY₁ y la consecuente disminución de la actividad astrogial, la capacidad de expresión de LTP es recuperada en sinápsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico, sin afectar la Pr antes o después de la estimulación con TBS.

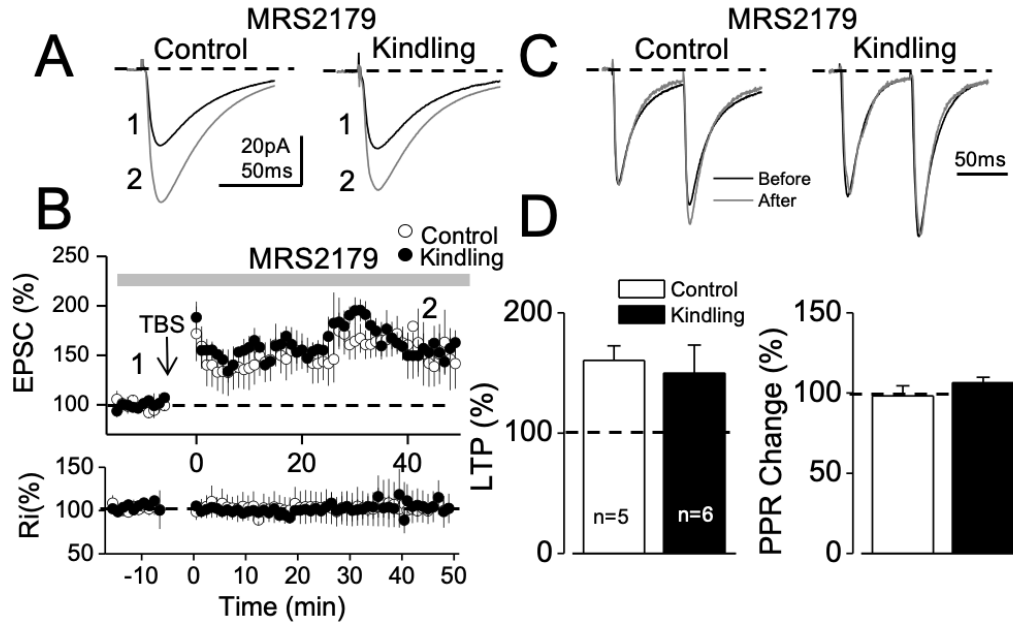


Figura 4. Recuperación de la LTP en sinápsis del hipocampo epiléptico. (A) A la izquierda (control) y a la derecha (kindling) trazos representativos de antes (1) y después (2) de la estimulación con TBS en presencia de MRS2179. (B) Arriba: Curso temporal del porcentaje de cambio de los EPSC en control (o) y kindling (●). ↓ indica TBS; Abajo: Curso temporal del porcentaje de cambio de la resistencia de acceso (Ri). (C) Trazos representativos de pulsos pareados (tiempo inter-estímulo 80 ms) antes (gris oscuro) de la aplicación de un protocolo de TBS y después (gris claro), a la izquierda grupo control y a la derecha grupo kindling. (D) A la izquierda resumen de los promedios de porcentaje de cambio de los EPSC medido a los 40 minutos post-TBS; A la derecha, porcentaje de cambio expresado en el radio de los pulsos pareados comparado a los 40 minutos post-TBS. Todos los experimentos fueron realizados bajo el efecto de MRS2179 (10 μ M).

Modificación del patrón de ondas de Ca^{2+} astroglial gatillada por la estimulación eléctrica

Con el objetivo de evaluar la participación de las señales de Ca^{2+} mediadas por ATP astroglial en la LTP en el hipocampo epiléptico se realizaron registros de imágenes de Ca^{2+} en rebanadas de hipocampo, específicamente en stratum radiatum antes, durante y después de la estimulación con TBS. Incubamos las rebanadas con SR101, marcador morfológico astroglial, y utilizamos Fluo-4 AM como indicador intracelular de Ca^{2+} . Registros representativos se pueden observar en Fig.5A (control: Izquierda; kindling: Centro; kindling+MRS2179: Derecha). Se observa un aumento de la actividad astroglial,

representada en ondas de calcio, antes de la estimulación con TBS en el grupo kindling, a diferencia del grupo control y kindling+MRS2179. Durante la estimulación con TBS se observa un aumento de la excitabilidad astrogial sólo en los grupos control y kindling+MRS2179. En relación a la distribución de las oscilaciones, estas fueron agrupadas en oscilaciones rápidas (FT) y lentas (ST), utilizando como criterio de corte el valor correspondiente al percentil 75 en la condición control, extraído del análisis de distribución poblacional de las oscilaciones en este modelo (Wellmann et al., 2018), correspondiente a 12 segundos para nuestros registros. La relación entre el número de oscilaciones rápidas y lentas fue expresado a través del FT/ST ratio. En la Fig.5B se puede observar un mayor valor del FT/ST ratio en los grupos control y kindling+MRS2179 (izquierda y derecha respectivamente) en comparación al grupo kindling (centro), previo a la estimulación con TBS y utilizado como referencia basal de las oscilaciones de Ca^{2+} . Además, al analizar el FT/ST ratio de cada situación experimental por separado, dividido en dos momentos: pre-TBS y post-TBS, el valor fue mayor antes de la estimulación eléctrica sólo en los grupos control y kindling+MRS2179, versus el grupo kindling, donde no se observaron diferencias (FT/ST control: pre TBS= 4.5 ± 0.58 ; post TBS= 2.3 ± 0.38 ; $p=0.007$ / kindling: pre TBS= 1.7 ± 0.42 ; post TBS= 1.7 ± 0.60 ; $p=0.98$ / kindling+mrs2179: pre TBS= 4.0 ± 0.47 ; post-TBS= 1.5 ± 0.26 ; $p=0.0004$). De esta manera, se puede determinar que el protocolo de TBS utilizado evoca oscilaciones lentas en las tres condiciones, pero con diferencias en el hipocampo sin epilepsia y con epilepsia bloqueando los receptores PDY_1 (Fig. 5B). Finalmente, se puede observar un aumento en el número de oscilaciones lentas durante la estimulación en los tres grupos experimentales (Fig.5C) (ST control: pre TBS= 1.4 ± 0.32 ; post TBS= 3.1 ± 0.24 ; $p=0.0001$ / kindling: pre TBS= 4.1 ± 1.3 ; post TBS= 6.3 ± 2.5 ; $p=0.09$ / kindling+mrs2179: pre TBS= 2.1 ± 0.49 ; post-TBS= 6.7 ± 2.55 ; $p=0.0001$). Finalmente, estos resultados indican que

la estimulación con un protocolo de TBS aumenta las oscilaciones lentas en la situación control y kindling en presencia de MRS2179, lo cual no es distinguible en el hipocampo epiléptico por el aumento basal en el número de oscilaciones lentas y su respectiva alteración de la relación FT/ST.

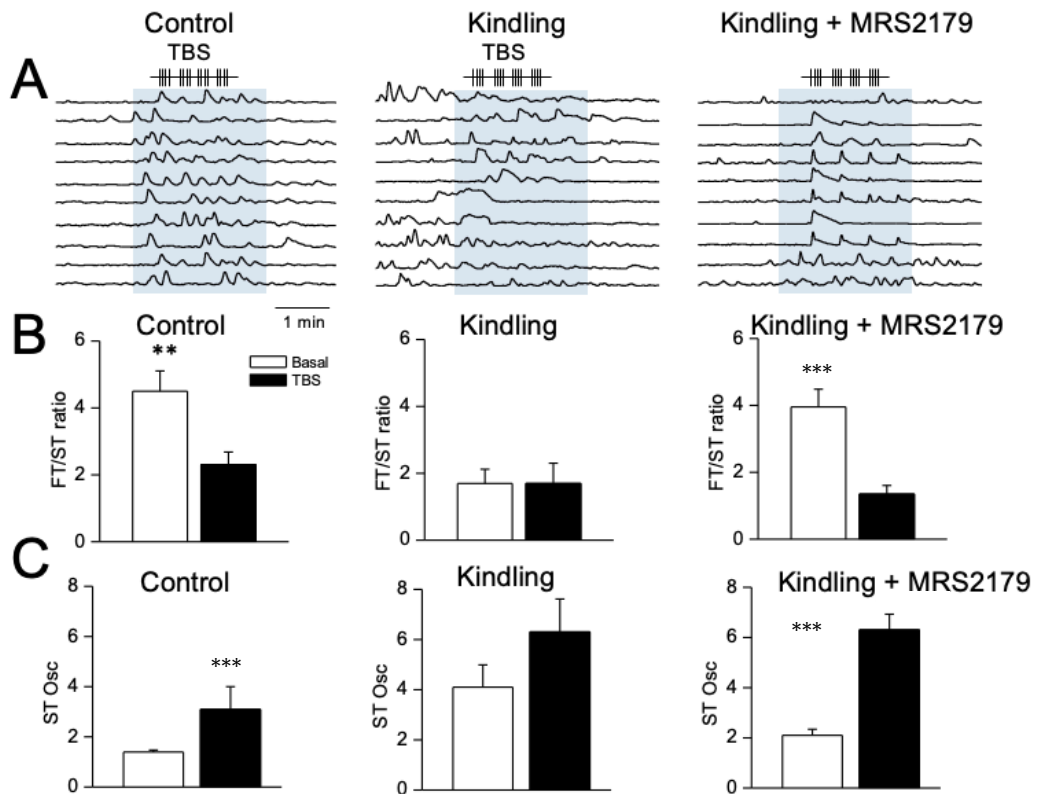


Figura 5. Modificación en los patrones de ondas de Ca²⁺ gatillada por la estimulación eléctrica. (A) Trazos representativos de oscilaciones de Ca²⁺ en el stratum radiatum de hipocampo, antes, durante y después de la estimulación con TBS, cada registro tiene una duración total de 5 minutos. A la izquierda (control), al centro (kindling) y a la derecha (kindling+MRS2179). (B) Gráficos de los valores del ratio FT/ST antes (basal) y durante/posterior a la estimulación con TBS, A la izquierda (control), al centro (kindling) y a la derecha (kindling+MRS2179). (C) Número de oscilaciones lentas (ST Osc) antes (basal) y durante/posterior la estimulación con TBS. A la izquierda (control), al centro (kindling) y a la derecha (kindling+MRS2179). Los registros con MRS2179 fueron realizados a concentración 10 μ M. T test (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001) según corresponda.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue determinar la participación de la actividad astrogial Ca^{2+} dependiente en la inducción de LTP en el hipocampo epiléptico de ratas adultas. Los resultados obtenidos señalan que, en el hipocampo de ratas kindleadas, la capacidad de inducción y expresión de la LTP está alterada en sus neuronas glutamatérgicas de CA1 y que la disminución de la actividad astrogial a través de antagonistas de los receptores P2Y_1 podría ser suficiente para recuperar la capacidad de plasticidad sináptica en sinapsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico.

Hiperexcitabilidad en sinápsis glutamatérgicas en el hipocampo epiléptico

Los resultados obtenidos indican que existe un aumento en la liberación de neurotransmisor en las neuronas glutamatérgicas de ratas adultas kindleadas. Esto confirma resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Álvarez-Ferradas et al., 2015). En este mismo sentido, a similares valores de fibber volley, un indicador de la activación presináptica, los fEPSP en ratas kindling son mayores que en el grupo control. En este mismo experimento y de manera relacionada, el umbral o más bien, el valor promedio en amplitud de la fibber volley necesario para la aparición de estas espigas poblacionales, es menor en el hipocampo epiléptico. Esto hecho ha sido reportado previamente en la literatura (King et al., 1985; Wu y Leung., 2003; Schubert et al., 2005) pero en otros modelos de epilepsia o bien, utilizando ratas jóvenes. Cabe destacar que en nuestro modelo (Morales et al., 2014) la estimulación de inducción del kindling es en el núcleo basolateral de la amígdala, por lo que el hipocampo está estructuralmente intacto en relación a la cirugía.

Sumado a lo anterior, el índice de pulsos pareados es cercano a 1 (Figura 1,2 y 3), lo cual sugiere fuertemente que la probabilidad de liberación se encuentra aumentada en ratas

kindleadas. Además, junto con este aumento de la eficacia sináptica (i.e.; aumento de la probabilidad de liberación) el umbral de activación de la espiga poblacional es menor en ratas kindleadas, sugiriendo que la excitabilidad postsináptica (Fig.1B). Interesantemente, si bien la hiperexcitabilidad es una de las características principales en la epilepsia y específicamente en la ELT, la hiperexcitabilidad en CA1 del hipocampo de humanos con ELT posee escasos reportes (Cohen et al., 2002), no así el aumento de la excitabilidad en el subiculum del hipocampo humano. Esto da cuenta que los mecanismos que median la hiperexcitabilidad no necesariamente son interpretables para modelos clínicos. Por otra parte, desde que la hiperexcitabilidad fue descrito como un fenómeno fundamental de la epilepsia (Racine et al., 1972; Morimoto et al., 2004), diversas metodologías terapéuticas basadas en modelos animales (Fleischmann et al., 1999; Rotenberg et al., 2008) y aplicadas en humanos (Santiago-Rodriguez et al., 2008; Sun et al., 2012) , han intentado disminuir la hiperexcitabilidad, por ejemplo a través de estimulación transcraneal magnética, induciendo depresión a largo plazo (LTD) en las estructuras dadas (Muller et al., 2014).

Recapitulando, nuestros datos sugieren un aumento de la excitabilidad glutamatérgica en el hipocampo epiléptico, siendo este un factor característico del modelo tipo de epilepsia crónica utilizado, lo cual podría contribuir al déficit cognitivo que experimentan los pacientes ELT (Reyes et al., 2019).

Expresión de la LTP en el hipocampo epiléptico en registros poblacionales

La expresión de la LTP es un fenómeno que requiere tanto de fenómenos pre-sinápticos, post-sinápticos y extra-sinápticos (Kandel et al., 2014). En diversos modelos similares al nuestro se ha observado una alteración de la LTP en CA1 de neuronas glutamatérgicas de hipocampo (Shchubert et al., 2005; Esmailpour K et al., 2017). Sin

embargo difieren en los protocolos utilizados o en la preservación intacta de la estructura registrada (hipocampo). En el presente estudio, se muestra que el aumento de la eficacia sináptica inducida por uno de los protocolos más potentes de activación sináptica – la estimulación a alta frecuencia produce un tercio de la tasa de potenciación alcanzada en hipocampos normales (Fig.1C). En estas condiciones la estimulación con pulsos pareados, en ambos grupos experimentales no mostraron cambios 40 min después de la inducción, revelando que en ambos grupos esta forma de plasticidad es expresada a nivel postsináptico (Fig.1D y F). Esto está de acuerdo con lo publicado en otros estudios realizados en modelos animales de ELT (Kanter et al., 2007), los cuales sugieren que ni la hiperexcitabilidad inducida por el kindling ni la estimulación con HFS son suficientes para inducir perseveración, lo cual también se observa en la potenciación post-tetánica inducida en ambos grupos experimentales (Fig.1E). Por otro lado, se han reportado cambios en la potenciación a corto plazo (Kokaia et al., 2001) pero utilizando modelos genéticos en ratones (con subexpresión de galanina).

Al observar el curso temporal del porcentaje de cambio de los fEPSC, es posible determinar un aumento en la eficacia sináptica durante los 60 minutos de registro, con un peak promedio entre los 40-50 minutos post-HFS en el grupo control. Este evento plástico es expresado de manera deficiente por las neuronas glutamatérgicas del hipocampo epiléptico, al igual como se ha observado en otros modelos de ELT (Morimoto et al., 2004; Nicoll y Schmitz., 2005). En la Fig.1F, podemos observar los promedios de LTP, expresados en el porcentaje de cambio máximo mantenido en el tiempo, entregando datos compilatorios sobre la alteración de la capacidad de expresar LTP en el hipocampo kindling. Vale considerar que acá se utiliza un registro de campo del funcionamiento sináptico, lo que implica una respuesta mucho más representativa de lo que sucede poblacionalmente versus registros unicelulares.

Disminución de la LTP en sinápsis glutamatérgicas del hipocampo epiléptico

Nuestros datos en registros unicelulares en el stratum pyramidale en CA1, , muestran que la utilización del protocolo TBS es insuficiente para inducir LTP en el grupo control, mientras que en el grupo kindling (Fig.2A-2B). Este protocolo ha sido ampliamente como uno de los tipos de estimulación óptimo para la inducción de LTP hipocampal (Larson et al., 1986; Abraham et al., 1997), el que además posee la cualidad de ser semejante a eventos fisiológicos de inducción de plasticidad sináptica relacionados con la conducta (Larson y Munkácsy., 2015). Nuestros resultados indican que existe una menor capacidad de plasticidad bajo esta configuración en “sinápsis epilépticas” en comparación a los registros de campo (110% promedio versus 135% promedio medido a los 40 min post estim). Una posibilidad en esta diferencia es el protocolo de estimulación utilizado (HFS versus TBS). Sin embargo, se ha reportado que no existen diferencias entre ambos protocolos (Hernandez et al., 2005). De manera complementaria, se ha reportado que si bien la estimulación con TBS era más “económica” (i.e.: requiera de menor estimulación para lograr fenómenos similares) no necesariamente es más efectiva (Larson y Munkácsy., 2015). Otra posibilidad es que el registro de campo involucra la respuesta de múltiples células, las cuales pueden tener distintos grados de alteración a consecuencia de la inducción de un modelo epiléptico.

En suma, nuestros datos sugieren que la capacidad de expresar LTP en células glutamatérgicas del hipocampo epiléptico está limitada, siendo un fenómeno tanto poblacional como unicelular e independiente del protocolo de inducción de la LTP acá utilizado. De manera similar, no se observan cambios en la facilitación por pulsos pareados en ambas configuraciones de registro (i.e.; Campo y patch-clamp), lo cual sugiere que además

del componente neuronal, el componente astrogliar puede estar contribuyendo a generar las alteraciones en la potenciación sináptica.

Respuesta a inducción repetida de LTP en el hipocampo epiléptico

Los protocolos de inducción de la LTP pueden en ocasiones no ser suficientes para la inducción de LTP, especialmente en ratas adultas (Abraham et al., 1997). Considerando algunos antecedentes (Christie et al., 1994; Cao y Harris., 2014) quisimos observar si a través de una repetición en la estimulación con TBS era posible expresar LTP en CA1 del hipocampo epiléptico bajo configuración patch clamp. En la Fig.3A se observa que kindling exhibe una reducida capacidad de expresar LTP respecto del grupo control. Este resultado es comparable con registros de campo obtenidos en un modelo similar al nuestro (Schubert., 2005), en cual se reportan alteraciones de la magnitud, saturación y polaridad de la LTP en ratas kindleadas. Ambos grupos experimentales se observa potenciación post-tetánica inmediatamente después de cada TBS, lo que asociado al monitoreo de los registros de pulsos pareados (Figura 3C) dan cuenta de la ausencia de cambios en la expresión de potenciación a corto plazo. Interesantemente, al evaluar el porcentaje de cambio de la facilitación por pulsos pareados en el hipocampo epiléptico (Fig.3D), este fue menor post TBS2 que previo a la estimulación. Esto último sugiere que si bien, como se observa en los registros de campo y en la inducción de LTP en sinápsis glutamatérgicas únicas, un protocolo de LTP clásico a través de TBS no fue capaz de expresar un aumento en la Pr, si lo fue la repetición de la estimulación medida posterior al protocolo de saturación. En este contexto es posible preguntarse qué mecanismos están bloqueando la capacidad de hacer más eficiente la respuesta post-sináptica en las neuronas glutamatérgicas del hipocampo epiléptico. Considerando que usamos estimulación con TBS de alta intensidad (Abraham et al., 1997; Larson y Munkácsy., 2015) por su efecto económico y similar a las ondas que median el

aprendizaje en el hipocampo (Buzsáki., 2002), y diversas características que favorecen la inducción de plasticidad (Cao y Harris., 2014), la ausencia en su expresión en sinápsis epilépticas sugiere que no estamos frente a un fenómeno puramente disináptico. Como se publicó en nuestro laboratorio, un mecanismo sustancial que puede modificar el umbral de inducción de la plasticidad sináptica es el Ca^{2+} astroglial (Bonansco et al., 2011). Sumado a esto y considerando el aumento de la excitabilidad astroglial en el hipocampo epiléptico bajo este modelo de kindling (Alvarez-Ferradas et al., 2015; Wellmann et al., 2018), es posible considerar el rol que tienen las señales astrogliales en posibilitar la expresión de LTP, considerando la señalización como un elemento trisináptico (Araque et al., 1999). El trabajo desarrollado por Henneberger y su grupo (2010), dan pie a la inclusión de la actividad astroglial entre los mecanismos que permiten la expresión de la LTP, específicamente asociados a la liberación de D-serina. Considerando que dentro de los mecanismos morfológicos que median las alteraciones en el hipocampo epiléptico está el tamaño de las espinas dendríticas y la densidad de ellas, reflejando cambios en la fuerza de la transmisión sináptica (Wilbrecht et al., 2010) y la íntima asociación entre los astrocitos y las espinas dendríticas, es tentador pensar en el rol que tienen los astrocitos en la inducción de la LTP. El trabajo de Perez-Alvarez (2014) muestra evidencias de que las sinápsis asociadas a procesos astrocíticos mostraban un aumento en la motilidad de sus respectivas espinas dendríticas a la inducción de la LTP, la cuál era mGluR dependiente de ondas de astrogliales de Ca^{2+} . Desde la perspectiva de cómo la diferencia de tiempo inter TBS en un protocolo de saturación de la LTP, puede incidir en la inducción de la plasticidad, y de manera complementaria, entendiendo a la LTP como uno de los principales mecanismos biológicos que subyacen al aprendizaje (Kandel et al., 2014), es interesante comparar este fenómeno con lo observado conductualmente en las teorías de entrenamiento espaciado visto en

roedores (Anderson et al., 2008; Bello-Medina et al., 2013) y en humanos (Vlach., 2014), entre otras especies. Esta descripción que es totalmente conductual, tiene una enorme similitud y coherencia con sus bases biológicas (Smolec et al., 2016). La importancia biológica de contar con ventanas de tiempo que permitan la expresión de la LTP fueron sumareados por Kukushkin y Carew., 2017, donde destacaron la necesidad del tiempo posterior a una estimulación externa, para la disponibilidad de primeros y segundos mensajeros, el estado de apertura de algunos receptores (ej. Receptores NMDA), la disponibilidad de algunos objetivos moleculares (ej. Translocación de kinasas unida a GluR2 a las dendritas y la señal de CamKII), entre otros factores.

En conjunto estos antecedentes dan cuenta del grado de alteración de la capacidad de expresar LTP en neuronas glutamatérgicas de hipocampo epiléptico, posiblemente por un colapso del sistema mecanístico necesario para su expresión. Es necesario considerar si es que los astrocitos tienen un rol activo en este colapso y si eventualmente la disminución de la hiperexcitabilidad astrogliar es suficiente para recuperar la LTP en el modelo de kindling.

Recuperación de la LTP en sinápsis del hipocampo epiléptico disminuyendo la hiperactividad astrogliar

La actividad astrogliar está mediada principalmente por ATP astrocítico activando receptores P2Y₁ en diversas estructuras cerebrales, tales como la corteza y tanto el hipocampo normal como el epiléptico (Sun et al., 2018; Wellmann et al., 2018). Además, en el hipocampo epiléptico hemos observado un aumento de la fuerza sináptica excitatoria mediada por astrocitos reactivos, y su disminución al bloqueo de receptores P2Y₁ (Álvarez-Ferradas et al., 2015) a través de un antagonista competitivo de estos receptores (Moro et al., 1998; Kawamura et al., 2016). En la Fig.4A se observan trazos representativos de EPSC antes

y 40 minutos post-TBS, evidenciando una diferencia en la amplitud en ambos grupos experimentales. En la Fig.4B se observa el mismo fenómeno al trazar el curso temporal del porcentaje de cambio de los EPSC en presencia de MRS2179. Acá podemos observar la sistemática potenciación a corto plazo post-tetánica vista en ausencia del bloqueo farmacológico de la actividad astrogial mediada por receptores P2Y₁, pero notoriamente un aumento en ambos grupos, control y kindling, de la eficiencia post-sináptica luego de la estimulación con TBS. En la aplicación de protocolos de pulsos pareados (Fig.4C) no hubo diferencias, presentando ambos facilitación en el segundo pulso. El resumen de los datos se graficó en la Fig.4D. Durante los últimos años se ha documentado el rol de los astrocitos en la inducción de la plasticidad sináptica y la LTP (Panatier et al., 2006; Henneberger et al., 2010), especialmente a través de la liberación de D-serina. Este aminoácido que funciona como co-agonista de los receptores NMDA, claves en la inducción de LTP (Panatier et al., 2006), en la unión de la glicina, es liberado principalmente por los astrocitos. Si bien puede ser liberada por neuronas, los astrocitos parecen ser su fuente primaria (Papouin et al., 2017). Llamativamente, los niveles de D-serina estarían a la baja en un modelo de kindling con pilocarpina (Klatte et al., 2013), alterando la capacidad de expresar LTP y recuperándola con aplicación externa de D-serina. Incluso, la aplicación de D-serina exógeno mejora el rendimiento en tareas de aprendizaje espacial. Considerando que en la ELT existe una hiperactividad astrocítica ampliamente descrita, y que son justamente los astrocitos la fuente primaria de la D-serina, parece oponerse a lo esperado y desafía a la descripción de los mecanismos asociados a esta aparente discordancia. Para esclarecer este fenómeno, Sherwood et al., (2017) observaron que la influencia de las ondas de Ca²⁺ astroglaiales en la inducción de la LTP en el hipocampo de rata, dependía de receptores IP₃Rs.

En conjunto, nuestros resultados muestran que la disminución de la señalización astrogliar, aumentada en el hipocampo epiléptico, recupera las condiciones para la inducción de un protocolo de LTP. En suma, a diversos antecedentes expuestos, nuestros resultados fortalecen la potencialidad de convertir a, la señalización astrogliar, en un objetivo farmacológico para el tratamiento médico de la ELT (Burnstock., 2017).

Modificación en los patrones de ondas de Ca^{2+} gatillada por la estimulación eléctrica

Nuestros resultados muestran que la estimulación eléctrica de las colaterales de Schaffer en CA1, a través de TBS, es capaz de evocar señales de Ca^{2+} en los astrocitos de stratum radiatum, especialmente en grupo control y en el grupo kindling. Así, el bloqueo de la actividad astrogliar es capaz de imitar patrones de oscilación vistos en el hipocampo sin epilepsia (Fig.5A). Si bien en los registros aquí indicados del grupo kindling se observan oscilaciones de Ca^{2+} durante la estimulación eléctrica, no es posible asociarla a un fenómeno evocado producto de la alta hiperexcitabilidad pre-TBS. Esto es concordante con lo observado previamente en otros trabajos publicado por este laboratorio (Wellmann et al., 2018). En cuanto a la distribución de las ondas en función de su duración (ondas rápidas y lentas), pre-TBS hubo un aumento de las oscilaciones rápidas (FT Osc) respecto de oscilaciones lentas (ST Osc) en el grupo control y kindling en presencia de MRS2179. A su vez, en el caso del grupo kindling, la cantidad de ST Osc fue mayor pre-TBS (Fig.5B y C). Durante la estimulación y posterior a ella, hubo un aumento en la cantidad de ST Osc en todos los grupos experimentales. De esta manera podemos interpretar que más allá de la cantidad de ST Osc que presenta el hipocampo epiléptico tanto, antes, durante y después de la estimulación, es el desbalance entre las FT/ST Osc el que podría alterar el funcionamiento trisináptico y la generación de las condiciones que promueven la inducción de LTP en

sinápsis glutamatérgicas. En otros experimentos y de manera concordante con lo observado aquí, el bloqueo de los IP₃Rs, relacionado con la activación de las ondas de Ca²⁺ y D-serina, es capaz por si sola de disminuir la LTP del hipocampo en presencia de heparina y a su vez, recuperarse a la aplicación de D-serina exógena. De manera complementaria, es interesante considerar teorías que apuntan a los astrocitos como un regulador del metabolismo y la energía celular. Podrían los astrocitos a través de, por ejemplo, el incremento en el metabolismo de la adenosina, un producto metabólico de la degradación de ATP, inhibir los procesos que consumen energía como una adaptación evolutiva para conservar energía (Boison y Steinhäuser., 2017). En nuestro trabajo desconocemos el mecanismo celular específico involucrado en la alteración de la LTP en el hipocampo epiléptico, sin embargo la recuperación de su expresión en presencia de antagonistas de los receptores PDY₁ y la subsecuente disminución en el número de las ST sugieren que la alteración de la plasticidad no es exclusivamente neuronal si no astrogial a través de un mecanismo Ca²⁺ dependiente cómo en la gliatransmisión. Faltan estudios que determinen en detalle los mecanismos involucrados, entre ellos el rol del glutamato o sus agonistas.

En resumen, nuestros resultados indican que el aumento de la reactividad astrogial altera la inducción de LTP en el hipocampo epiléptico en ratas adultas, a través de la señalización Ca²⁺-dependiente, mediada por activación de receptores P2Y₁. En estas condiciones, la recuperación del patrón de ondas de Ca²⁺ astrogial por medio de antagonistas de los receptores purinérgicos P2Y₁ recupera la capacidad de expresar LTP en el hipocampo.

CONCLUSIONES

Los resultados conseguidos en este trabajo indican que:

1. El aumento de la comunicación astrogliar en el hipocampo epiléptico altera la capacidad de expresar LTP y contribuye a un estado de hiperexcitabilidad y saturación de los mecanismos necesarios para la expresión de la plasticidad sináptica a través del desbalance en las oscilaciones FT/ST de Ca^{2+} astrocitario. Esto se expresa en la incapacidad de expresar LTP de manera normal en las neuronas piramidales del hipocampo kindleado, estando además saturada al aumento en el número de estimulaciones, pudiendo “recuperarse” al bloqueo de P2Y₁R y su consecuente disminución de la señalización astrogliar.
2. En síntesis, los resultados obtenidos sugieren que la hiperexcitabilidad astrogliar en el hipocampo epiléptico, altera la señalización astrocito-astrocito, posiblemente a través de ATP, lo que conlleva una capacidad limitada para expresar plasticidad a largo plazo. Dado esto y en concordancia con trabajos previamente publicados en este laboratorio, el aumento en la señalización astrocítica a través de oscilaciones de Ca^{2+} es capaz de mantener un tono glutamatérgico aumentado, afectando en parte, su capacidad plástica en un modelo de ELT crónico. De esta manera la plasticidad no es un fenómeno exclusivamente neuronal si no también astrogliar.
3. Estos resultados junto a numeros antecedentes relacionados con la alteración en el desarrollo de engramas cognitivos, muestran que la señalización astrogliar es un factor de gran relevancia al momento de considerar futuros objetivos farmacológicos para el tratamiento de la epilepsia de lóbulo temporal, desde su desarrollo hasta las secuelas cognitivas que se producen en pacientes epilepticos.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, W.C. and Huggett. Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices (1997). *Hippocampus* 7: 137–145.

Aguado, F., Espinosa-Parrilla, J.F., Carmona, M.A., and Soriano, E. (2002). Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 9430–9444.

Andersen, P. Foreword: LTP-an exciting and continuing saga. In: Baudry, M.; Davis, J.L., editors. *Long-Term Potentiation: A Debate of Current Issues*. Cambridge, MA: MIT Press; 1991. p. xiii- xvii. Vol

Álvarez-Ferradas, C., Morales, J.C., Wellmann, M., Nualart, F., Roncagliolo, M., Fuenzalida, M., and Bonansco, C. (2015). Enhanced astroglial Ca^{2+} signaling increases excitatory synaptic strength in the epileptic brain. *Glia* 63, 1507–1521.

Alvestad, S., Hammer, J., Hoddevik, E. H., Skare, O., Sonnewald, U., Amiry-Moghaddam, M., & Ottersen, O. P. (2013). Mislocalization of AQP4 precedes chronic seizures in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 105(1–2), 3041.

Angulo, M.C., Kozlov, A.S., Charpak, S., and Audinat, E. (2004). Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 6920–6927.

Aranda, L. C. and J. V. Luco. (1964) Características de la sinapsis motora de *Blatta orientalis*. *Proc. I/1 Congr. Asoc. Lat. Amer., Ciencias Fisiológicas (A.L.A.C.F.) Vía del Mar (Chile)*, p. 99.

Araque, A., Sanzgiri, R.P., Parpura, V., and Haydon, P.G. (1998). Calcium Elevation in Astrocytes Causes an NMDA Receptor-Dependent Increase in the Frequency of Miniature Synaptic Currents in Cultured Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 18, 6822–6829.

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.

Araque, A., Li, N., Doyle, R.T., and Haydon, P.G. (2000). SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 666–673.

Araque, A., Carmignoto, G., and Haydon, P.G. (2001). Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 795–813.

Araque, A., Martín, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., and Buño, W. (2002). Synaptically Released Acetylcholine Evokes Ca^{2+} Elevations in Astrocytes in Hippocampal Slices. *J. Neurosci.* 22, 2443–2450.

Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728–739.

Bedner, P., Dupper, A., Hüttmann, K., Müller, J., Herde, M.K., Dublin, P., Deshpande, T., Schramm, J., Häussler, U., Haas, C.A., et al. (2015). Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain J. Neurol.* 138, 1208–1222.

Bezzi, P., and Volterra, A. (2001). A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 387–394.

Boison D, Steinhäuser C. Epilepsy and astrocyte energy metabolism. (2017); *Glia.* 00:000–000. [https:// doi.org/10.1002/glia.23247](https://doi.org/10.1002/glia.23247)

Bonansco, C., González de la Vega, A., González Alegre, P., Borde, M., Garcá-Segura, L.M., and Buño, W. (2002). Tetanic stimulation of schaffer collaterals induces rhythmic bursts via NMDA receptor activation in rat CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 12, 434–446.

Bonansco, C., Couve, A., Perea, G., Ferradas, C.Á., Roncagliolo, M., and Fuenzalida, M. (2011). Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1483–1492.

Bowser, D.N., and Khakh, B.S. (2004). ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 8606–8620.

Bowser, D.N., and Khakh, B.S. (2007). Vesicular ATP Is the Predominant Cause of Intercellular Calcium Waves in Astrocytes. *J. Gen. Physiol.* 129, 485–491.

Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments (2017). *Front. Pharmacol.* 8:661. doi: 10.3389/fphar.2017.00661

Cali, C., Lopatar, J., Petrelli, F., Pucci, L., Bezzi, P., Cali, C., Lopatar, J., Petrelli, F., Pucci, L., and Bezzi, P. (2014). G-Protein Coupled Receptor-Evoked Glutamate Exocytosis from Astrocytes: Role of Prostaglandins, G-Protein Coupled Receptor-Evoked Glutamate Exocytosis from Astrocytes: Role of Prostaglandins. *Neural Plast. Neural Plast.* 2014, 2014, e254574.

Carmignoto, G., and Haydon, P.G. (2012). Astrocyte calcium signaling and epilepsy. *Glia* 60, 1227–1233.

Corcoran, M.E., Kroes, R.A., Burgdorf, J.S., and Moskal, J.R. (2011). Regional changes in gene expression after limbic kindling. *Cell. Mol. Neurobiol.* 31, 819–834.

Cotrina, M.L., Lin, J.H., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C.C., and Nedergaard, M. (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15735–15740.

Cotrina, M.L., Lin, J.H.-C., López-García, J.C., Naus, C.C.G., and Nedergaard, M. (2000). ATP-Mediated Glia Signaling. *J. Neurosci.* 20, 2835–2844.

Dale, N., and Frenguelli, B.G. (2009). Release of Adenosine and ATP During Ischemia and Epilepsy. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 160–179.

- D'Ascenzo, M., Fellin, T., Terunuma, M., Revilla-Sanchez, R., Meaney, D.F., Auberson, Y.P., Moss, S.J., and Haydon, P.G. (2007). mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 1995–2000.
- Delekate, A., Füchtmeier, M., Schumacher, T., Ulbrich, C., Foddis, M., and Petzold, G.C. (2014). Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat. Commun.* 5, 5422.
- Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. (2013). Glia and epilepsy: Excitability and inflammation. *Trends Neurosci* 36:174–184.
- Di Castro, M.A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., Tiret, P., and Volterra, A. (2011). Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat. Neurosci.* 14, 1276–1284.
- Domercq, M., Brambilla, L., Pilati, E., Marchaland, J., Volterra, A., and Bezzi, P. (2006). P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor- α and prostaglandins. *J. Biol. Chem.* 281, 30684–30696.
- Duan, S., Anderson, C.M., Keung, E.C., Chen, Y., Chen, Y., and Swanson, R.A. (2003). P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 1320–1328.
- Eid, T., Ghosh, A., Wang, Y., Beckstrom, H., Zaveri, H. P., Lee, T. S., ... De Lanerolle, N. C. (2008). Recurrent seizures and brain pathology after inhibition of glutamine synthetase in the hippocampus in rats. *Brain*, 131, 2061–2070.
- Enkvist, M.O., and McCarthy, K.D. (1992). Activation of protein kinase C blocks astroglial gap junction communication and inhibits the spread of calcium waves. *J. Neurochem.* 59, 519–526.
- Enkvist, M.O., and McCarthy, K.D. (1994). Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K⁺ concentration. *J. Neurochem.* 62, 489–495.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., and Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729–743.
- Fellin, T., Gomez-Gonzalo, M., Gobbo, S., Carmignoto, G., and Haydon, P.G. (2006). Astrocytic glutamate is not necessary for the generation of epileptiform neuronal activity in hippocampal slices. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 9312–9322.
- Fuenzalida, M., Aliaga, E., Olivares, V., Roncagliolo, M., and Bonansco, C. (2009). Developmental increase of asynchronous glutamate release from hippocampal synapses in mutant taiep rat. *Synap. N. Y. N* 63, 502–509.

- Gallagher, C.J., and Salter, M.W. (2003). Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 6728–6739.
- Goldberg, E.M., and Coulter, D.A. (2013). Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 337–349.
- Greenwood, R.S., Meeker, R.B., and Hayward, J.N. (1991). Amygdala kindling elevates plasma vasopressin. *Brain Res.* 538, 9–14.
- Guček, A., Vardjan, N., and Zorec, R. (2012). Exocytosis in astrocytes: transmitter release and membrane signal regulation. *Neurochem. Res.* 37, 2351–2363.
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C., and Kater, S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci.* 19, 520–528.
- Habib D, Dringenberg HC. Surprising similarity between mechanisms mediating low (1 Hz)- and high (100 Hz)-induced long-lasting synaptic potentiation in CA1 of the intact hippocampus. *Neuroscience* 170: 489–496, 2010a
- Hassinger, T.D., Guthrie, P.B., Atkinson, P.B., Bennett, M.V.L., and Kater, S.B. (1996). An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13268–13273.
- Haustein, M.D., Kracun, S., Lu, X.-H., Shih, T., Jackson-Weaver, O., Tong, X., Xu, J., Yang, X.W., O'Dell, T.J., Marvin, J.S., et al. (2014). Conditions and constraints for astrocyte calcium signaling in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 82, 413–429.
- Haydon, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185–193.
- Hebb, D.O. (1949). *The organization of behavior: a neuropsychological theory* (NY: Wiley).
- Heinemann, U., Gabriel, S., Schuchmann, S., and Eder, C. (1999). Contribution of astrocytes to seizure activity. *Adv. Neurol.* 79, 583–590.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., and Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes. *Nature* 463, 232–236.
- Henneberger, C., Bard, L., and Rusakov, D.A. (2012). D-Serine: a key to synaptic plasticity? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 587–590.
- Jabs, R., Pivneva, T., Hüttmann, K., Wyczynski, A., Nolte, C., Kettenmann, H., and Steinhäuser, C. (2005). Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity. *J. Cell Sci.* 118, 3791–3803.
- Jabs, R., Seifert, G., and Steinhäuser, C. (2008). Astrocytic function and its alteration in the epileptic brain. *Epilepsia* 49 Suppl 2, 3–12.

James, G., and Butt, A.M. (2002). P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca^{2+} signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 447, 247–260.

Jefferys, J.G.R., Jiruska, P., de Curtis, M., and Avoli, M. (2012). Limbic Network Synchronization and Temporal Lobe Epilepsy. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, J.L. Noebels, M. Avoli, M.A. Rogawski, R.W. Olsen, and A.V. Delgado-Escueta, eds. (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US),

Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., and Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* 10, 331–339.

Kafitz, K.W., Meier, S.D., Stephan, J., and Rose, C.R. (2008). Developmental profile and properties of sulforhodamine 101--Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *J. Neurosci. Methods* 169, 84–92.

Kandel, E.R., and Spencer, W.A. (1968). Cellular neurophysiological approaches in the study of learning. *Physiol. Rev.* 48, 65–134.

Kandel, E.R., Dudai, Y., and Mayford, M.R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell* 157, 163–186.

Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* 1, 683–692.

Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., and Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 Hemichannels Are Permeable to ATP. *J. Neurosci.* 28, 4702–4711.

Kawamura, M. J., Ruskin, D. N., & Masino, S. A. (2016). Metabolic Therapy for Temporal Lobe Epilepsy in a Dish: Investigating Mechanisms of Ketogenic Diet using Electrophysiological Recordings in Hippocampal Slices. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9, 112.

Kawamura, M. J., Ruskin, D. N., & Masino, S. A. (2016). Metabolic Therapy for Temporal Lobe Epilepsy in a Dish: Investigating Mechanisms of Ketogenic Diet using Electrophysiological Recordings in Hippocampal Slices. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9, 112.

Klatte K., Kirschstein T., Otte D., Pothmann L., Muller L., Tokay T., et al. (2013). Impaired D-serine-mediated cotransmission mediates cognitive dysfunction in epilepsy. *J. Neurosci.* 33 13066–13080. 10.1523/JNEUROSCI.5423-12.2013

Kuchibhotla, K.V., Lattarulo, C.R., Hyman, B.T., and Bacskai, B.J. (2009). Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science* 323, 1211–1215.

- Lee, H.S., Ghetti, A., Pinto-Duarte, A., Wang, X., Dziewczapolski, G., Galimi, F., Huitron-Resendiz, S., Piña-Crespo, J.C., Roberts, A.J., Verma, I.M., et al. (2014). Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E3343–E3352.
- Leybaert, L., and Sanderson, M.J. (2012). Intercellular Ca(2+) waves: mechanisms and function. *Physiol. Rev.* 92, 1359–1392.
- Liu, Q., Xu, Q., Arcuino, G., Kang, J., and Nedergaard, M. (2004a). Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3172–3177.
- Liu, Q.-S., Xu, Q., Kang, J., and Nedergaard, M. (2004b). Astrocyte activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors modulates hippocampal inhibitory synaptic transmission. *Neuron Glia Biol.* 1, 307–316.
- Maragakis, N.J., and Rothstein, J.D. (2006). Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 679–689.
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Kornblum, H.I., Mendoza, D., Lozada, A., Leite, J.P., Chimelli, L.M., Fried, I., Sakamoto, A.C., Assirati, J.A., et al. (1997). Human hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Brain J. Neurol.* 120 (Pt 11), 1937–1959.
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Leite, J.P., Kornblum, H.I., Mendoza, D., Lozada, A., and Bertram, E.H. (1998). Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res.* 32, 154–171.
- McCormick, D.A., and Contreras, D. (2001). On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 815–846.
- Milner, B. Les troubles de la memoire accompagnant des lesions hippocampiques bilaterales. In *Physiologie de l'Hippocampe* (1962) P. Passouant, ed. (Paris: Centre National de la Recherche Scientifique), pp. 257–272.
- Milner, B., Corkin, S., and Teuber, H.-L. (1968). Further Analysis of the Hippocampal Amnesic Syndrome: 14-Year Follow-Up Study of H.M. *Neuropsychologia* 6, 215–234.
- Min, R., and Nevian, T. (2012). Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nat. Neurosci.* 15, 746–753.
- Morales, J.C., Alvarez-Ferradas, C., Roncagliolo, M., Fuenzalida, M., Wellmann, M., Nualart, F.J., and Bonansco, C. (2014). A new rapid kindling variant for induction of cortical epileptogenesis in freely moving rats. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 200.
- Navarrete, M., and Araque, A. (2008). Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication. *Neuron* 57, 883–893.

Navarrete, M., and Araque, A. (2010). Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68, 113–126.

Navarrete, M., Perea, G., de Sevilla, D.F., Gómez-Gonzalo, M., Núñez, A., Martín, E.D., and Araque, A. (2012). Astrocytes Mediate In Vivo Cholinergic-Induced Synaptic Plasticity. *PLoS Biol* 10, e1001259.

Nedergaard, M., Rodríguez, J.J., and Verkhratsky, A. (2010). Glial calcium and diseases of the nervous system. *Cell Calcium* 47, 140–149.

Orellana, J.A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J.X., Bennett, M.V.L., Naus, C.C., Giaume, C., and Sáez, J.C. (2011). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J. Neurochem.* 118, 826–840.

Orellana, J.A., Montero, T.D., and von Bernhardi, R. (2013). Astrocytes inhibit nitric oxide-dependent Ca(2+) dynamics in activated microglia: involvement of ATP released via pannexin 1 channels. *Glia* 61, 2023–2037.

Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaillle, J.-C., and Robitaille, R. (2011). Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses. *Cell* 146, 785–798.

Papouin T, Henneberger C, Rusakov DA, Oliet SHR. Astroglial versus neuronal D-serine: fact checking. *Trends Neurosci.* (2017) 40:517–20. 10.1016/j.tins.2017.05.007

Parpura, V., and Haydon, P.G. (2000). Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8629–8634.

Parpura, V., and Haydon, P.G. (2009). *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System* (Boston, MA: Springer US).

Parpura, V., and Verkhratsky, A. (2012). The astrocyte excitability brief: from receptors to gliotransmission. *Neurochem. Int.* 61, 610–621.

Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S., and Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744–747.

Parpura, V., Scemes, E., and Spray, D.C. (2004). Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction “hemichannels”, purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochem. Int.* 45, 259–264.

Parpura, V., Heneka, M.T., Montana, V., Oliet, S.H.R., Schousboe, A., Haydon, P.G., Stout, R.F., Spray, D.C., Reichenbach, A., Pannicke, T., et al. (2012). Glial cells in (patho)physiology. *J. Neurochem.* 121, 4–27.

Parri, H.R., and Crunelli, V. (2003). The role of Ca²⁺ in the generation of spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations. *Neuroscience* 120, 979–992.

- Parri, H.R., Gould, T.M., and Crunelli, V. (2001). Spontaneous astrocytic Ca^{2+} oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat. Neurosci.* 4, 803–812.
- Pascual, O., Achour, S.B., Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E197–E205.
- Paxinos, G., and Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press).
- Penfield, W., and Milner, B. (1958). Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *AMA Arch. Neurol. Psychiatry* 79, 475–497.
- Perea, G., and Araque, A. (2005). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 2192–2203.
- Perea, G., and Araque, A. (2007). Astrocytes Potentiate Transmitter Release at Single Hippocampal Synapses. *Science* 317, 1083–1086.
- Perea, G., Navarrete, M., and Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421–431.
- Perea, G., Yang, A., Boyden, E.S., and Sur, M. (2014). Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nat. Commun.* 5, 3262.
- Peters, A., Palay, Sanford, and Webster, Henry (1991). *The fine structure of the nervous system* (Oxford University Press).
- Petzold, G.C., Albeanu, D.F., Sato, T.F., and Murthy, V.N. (2008). Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron* 58, 897–910.
- Racine, R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 281–294.
- Ramón y Cajal (1909). *Histologie du système nerveux de l’homme & des vertébrés* (Paris: Maloine).
- Reyes A, Kaestner E, Bahrami N, Balachandra A, Hegde M, Paul B, Hermann B, McDonald C (2019). Cognitive phenotypes in temporal lobe epilepsy are associated with distinct patterns of white matter network abnormalities. *Neurology* Apr 2019, 92 (17) e1957-e1968;
- Salter, M.W., and Hicks, J.L. (1995). ATP causes release of intracellular Ca^{2+} via the phospholipase C beta/IP3 pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord. *J. Neurosci.* 15, 2961–2971.

- Santiago, M.F., Veliskova, J., Patel, N.K., Lutz, S.E., Caille, D., Charollais, A., Meda, P., and Scemes, E. (2011). Targeting Pannexin1 Improves Seizure Outcome. *PLoS ONE* 6, e25178.
- Schacter, D.L., and Tulving, E. (1994). What are the memory systems of 1994? In *Memory Systems*, D.L. Schacter and E. Tulving, eds. (Cambridge, MA: MIT Press), pp. 39–63.
- Scemes, E., Dermietzel, R., and Spray, D.C. (1998). Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. *Glia* 24, 65–73.
- Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hip- pocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21.
- Sherwood M. W., Arizono M., Hisatsune C., Bannai H., Ebisui E., Sherwood J. L., et al. . (2017). Astrocytic IP3 Rs: contribution to Ca²⁺ signalling and hippocampal LTP. *Glia* 65, 502–513. 10.1002/glia.23107
- Shigetomi, E., Bowser, D.N., Sofroniew, M.V., and Khakh, B.S. (2008). Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 6659–6663.
- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 7–35.
- Squire, L.R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* 99, 195–231.
- Stout, C.E., Costantin, J.L., Naus, C.C.G., and Charles, A.C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J. Biol. Chem.* 277, 10482–10488.
- Suadicani, S.O., Flores, C.E., Urban-Maldonado, M., Beelitz, M., and Scemes, E. (2004). Gap junction channels coordinate the propagation of intercellular Ca²⁺ signals generated by P2Y receptor activation. *Glia* 48, 217–229.
- Suadicani, S.O., Brosnan, C.F., and Scemes, E. (2006). P2X7 Receptors Mediate ATP Release and Amplification of Astrocytic Intercellular Ca²⁺ Signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1378–1385.
- Suadicani, S.O., Iglesias, R., Wang, J., Dahl, G., Spray, D.C., and Scemes, E. (2012). ATP signaling is deficient in cultured Pannexin1-null mouse astrocytes. *Glia* 60, 1106–1116.
- Sul, J.-Y., Orosz, G., Givens, R.S., and Haydon, P.G. (2004). Astrocytic Connectivity in the Hippocampus. *Neuron Glia Biol.* 1, 3–11.
- Sun, W., McConnell, E., Pare, J.-F., Xu, Q., Chen, M., Peng, W., Lovatt, D., Han, X., Smith, Y., and Nedergaard, M. (2013). Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science* 339, 197–200.

Szente, M., Gajda, Z., Said Ali, K., and Hermes, E. (2002). Involvement of electrical coupling in the in vivo ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. *Neuroscience* 115, 1067–1078.

Theis, M., and Giaume, C. (2012). Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res.* 1487, 88–98.

Thompson, R.J., Jackson, M.F., Olah, M.E., Rungta, R.L., Hines, D.J., Beazely, M.A., MacDonald, J.F., and MacVicar, B.A. (2008). Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. *Science* 322, 1555–1559.

Tian, G.-F., Azmi, H., Takano, T., Xu, Q., Peng, W., Lin, J., Oberheim, N., Lou, N., Wang, X., Zielke, H.R., et al. (2005). An astrocytic basis of epilepsy. *Nat. Med.* 11, 973–981.

Torres, A., Wang, F., Xu, Q., Fujita, T., Dobrowolski, R., Willecke, K., Takano, T., and Nedergaard, M. (2012). Extracellular Ca^{2+} Acts as a Mediator of Communication from Neurons to Glia. *Sci. Signal.* 5, ra8.

Vargas, M.R., and Johnson, J.A. (2010). Astroglialosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 7, 471–481.

Venance, L., Stella, N., Glowinski, J., and Giaume, C. (1997). Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 1981–1992.

Verderio, C., and Matteoli, M. (2001). ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 166, 6383–6391.

Vincent, A.J., Gasperini, R., Foa, L., and Small, D.H. (2010). Astrocytes in Alzheimer's disease: emerging roles in calcium dysregulation and synaptic plasticity. *J. Alzheimers Dis. JAD* 22, 699–714.

Volterra, A., Liaudet, N., and Savtchouk, I. (2014). Astrocyte Ca^{2+} signalling: an unexpected complexity. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 327–335.

Warrington, E.K., and Weiskrantz, L. (1968). New method of testing long-term retention with special reference to amnesic patients. *Nature* 217, 972–974.

Weissman, T.A., Riquelme, P.A., Ivic, L., Flint, A.C., and Kriegstein, A.R. (2004). Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex. *Neuron* 43, 647–661.

Wellmann M, Álvarez-Ferradas C, Maturana CJ, Sáez JC and Bonansco C (2018) Astroglial Ca^{2+} -Dependent Hyperexcitability Requires P2Y1 Purinergic Receptors and Pannexin-1 Channel Activation in a Chronic Model of Epilepsy. *Front. Cell. Neurosci.* 12:446. doi: 10.3389/fncel.2018.00446

Zhang, J., Wang, H., Ye, C., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z., Wu, C., Poo, M., and Duan, S. (2003). ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40, 971–982.

Zhang, Q., Fukuda, M., Van Bockstaele, E., Pascual, O., and Haydon, P.G. (2004a). Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9441–9446.

Zhang, Q., Pangrsic, T., Kreft, M., Krzan, M., Li, N., Sul, J.-Y., Halassa, M., Van Bockstaele, E., Zorec, R., and Haydon, P.G. (2004b). Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 12724–12733.

Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X., and Duan, S. (2007). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 9, 945–953.

Zhu, Y., and Kimelberg, H.K. (2001). Developmental expression of metabotropic P2Y1 and P2Y2 receptors in freshly isolated astrocytes from rat hippocampus. *J. Neurochem.* 77, 530–541.

Zorec, R., Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Verkhratsky, A., and Parpura, V. (2012). Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca^{2+} as a signalling route. *ASN Neuro* 4.