

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

**ALTERACIÓN ASTROGLIAL EN EPILEPTOGÉNESIS
INDUCIDA POR PENTILENTETRAZOL EN
HIPOCAMPO DE RATON**

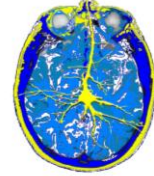
FRANCO FERNANDO DIAZ GARCIA

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

Director de Tesis:

Prof. Dr. Christian Bonansco Herrera

2019



INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER

**Se informa a la Coordinación de Post-Grado de la Facultad de Ciencias que la
Tesis de Magister presentada por el candidato**

FRANCO FERNANDO DIAZ GARCIA

**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

Evaluadores:

Prof. Dr. Pablo Moya

Prof. Dr. Marco Fuenzalida

Prof. Dr. Francisco Nualart

*Para Sofia y mi familia,
los motores de todos mis logros.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el resultado de un círculo virtuoso lleno de grandes personas que han contribuido en mayor o menor medida, pero con vital importancia. En primer lugar agradezco a mi familia, en especial a mis padres y abuela quienes han luchado incansablemente por enseñarme los valores que hoy llevo orgulloso en el día a día, y a mis hermanos por su apoyo incondicional.

A mis amigos, por ser mi segunda familia y un gran apoyo por tantos años: Alejandro, Hernán, Luciano, Cristian, Constanza y Francisco. A Francisco Vergara, que desde el primer momento no dudó en apoyarme para desarrollar este magister. A Cristian Cuadra, quien desde el pregrado me enseñó el valor del conocimiento. A mi profesor tutor, Christian Bonansco, que desde la experiencia y los buenos consejos me fue guiando en este proceso, a ratos complejo, pero gratificante. A Mario y Juan, por la constante ayuda desinteresada, sin duda me hicieron entender lo que era incomprendible. A Andrés, por la amistad en este proceso y por ayudarme a desarrollar la tan anhelada docencia universitaria.

Y finalmente al motor de mis días, Sofia. Sin duda estos 8 años siendo tu padre han estado llenos de aprendizaje, trabajo, dedicación y por sobre todo amor. Cada día me motivas a ser mejor persona.

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.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	15
Epilepsia.....	16
Fisiología de los astrocitos.....	19
Señalización astrogliar en procesos patológicos.....	20
El concepto de Epileptogénesis.....	21
Kindling inducido por pentilentetrazol (PTZ).....	23
Modelos de epileptogénesis en roedores: Cambios morfológicos y sinápticos.....	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
Hipótesis.....	32
Objetivos generales.....	32
Objetivos específicos.....	32
Objetivos procedimentales.....	33
METODOLOGÍA.....	34
Animales.....	34
Grupos experimentales y protocolo de administración de PTZ.....	34
Obtención de rebanadas de hipocampo.....	35
Registro extracelular de campo.....	36
Registro de ondas de Ca ²⁺	37
Inmunotinción y adquisición de imágenes.....	39

Análisis estadístico.....	40
RESULTADOS.....	41
Fenotipo de comportamiento epileptogénico en PTZ-kindling.....	41
Efecto del PTZ-kindling en la transmisión excitatoria en sinapsis CA3-CA1.....	42
Efecto del PTZ-kindling sobre las ondas de Ca ²⁺ astrogliales.....	44
Cambios de expresión asociados al PTZ-kindling.....	47
DISCUSIÓN.....	49
Aumento de la eficacia sináptica en transmisión glutamatérgica CA3-CA1 en el hipocampo epiléptico.....	49
Hiperexcitabilidad astroglial Ca ²⁺ -dependiente en el hipocampo epiléptico.....	52
Aumento de GFAP y sobre expresión de mGluR5 y P2Y1.....	54
CONCLUSIONES.....	56
REFERENCIAS.....	57

ABREVIATURAS

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

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATP: Trifosfato de adenosín.

BDZ: Benzodiazepina.

Ca²⁺: Ión calcio.

Cl⁻: Ión cloro.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EEG: Electroencefalograma.

ELT: Epilepsia del lóbulo temporal.

ELTM: Esclerosis temporal mesial.

fEPSP: Potencial postsináptico excitatorio de campo.

FLUO4-AM: Indicador fluorescente de Ca²⁺ en forma de éster.

FT: Oscilación rápida.

fV: Volea sináptica.

GABA: Ácido γ -aminobutírico.

GABA_A: Receptor de GABA tipo A.

GABA_B: Receptor de GABA tipo B.

GFAP: Proteína acídica fibrilar glial.

GLAST: Transportador glutamato-aspartato.

Hz: Hercio.

HS: Esclerosis hipocampal.

ILAE: Liga internacional contra la epilepsia.

i.p: Intraperitoneal.

IP3: inositol 1, 4, 5-trifosfato.

LCA: Líquido cerebroespinal artificial.

mAChR: Receptor metabotrópico de acetilcolina.

mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato.

mGluR1: Receptor metabotrópico de glutamato tipo 1.

mGluR5: Receptor metabotrópico de glutamato tipo 5.

mM: Milimolar.

ms: Milisegundos.

Na⁺: Ión sodio.

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

pA: Picoamperio.

PBS: Buffer fosfato salino.

PD: Post descarga.

PPR index: Índice de facilitación por pulsos pareados.

PTX: Picrotoxina.

PTZ: Pentilentetrazol.

PTZ-kindling: Kindling inducido por PTZ.

P2X: Receptor purinérgico ionotrópico de ATP.

P2Y: Receptor metabotrópico purinérgico de ATP.

P2Y1: Receptor metabotrópico purinérgico de ATP tipo 1.

ROI: Región de interés.

SE: Status epiléptico.

SO: Stratum oriens.

SR: Stratum radiatum.

SR101: Sulforrodamina 101.

ST: Oscilación lenta.

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

μL : Microlitros.

μM : Micromolar.

μm : Micras.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de Epileptogénesis inducida por PTZ.....	34
Figura 2. Fenotipo de comportamiento epileptogénico inducido por PTZ.....	41
Figura 3. Efecto del PTZ-kindling en la transmisión excitatoria en sinapsis CA3-CA1.....	43
Figura 4. Efecto del PTZ-kindling sobre las ondas de Ca^{2+} astrogliales.....	46
Figura 5. Cambios morfológicos inducidos por el PTZ-kindling.....	48

RESUMEN.

La epilepsia se caracteriza por la aparición recurrente de crisis espontáneas que se relacionan con hiperactividad cerebral y alteración en el balance excitación-inhibición. En modelos de epileptogénesis en ratas, como el kindling eléctrico, se han observado cambios en la transmisión sináptica glutamatérgica en hipocampo, puntualmente un aumento en la eficacia sináptica debido a la hiperexcitabilidad astrogial mediada por Ca^{2+} y astrogliosis. Sin embargo, hasta ahora se desconocen los cambios en la excitabilidad astrogial y cómo esta repercutiría en la transmisión sináptica glutamatérgica en el modelo de epilepsia inducida por pentilentetrazol (PTZ) aplicado en ratón.

Para esto aplicamos un modelo de epileptogénesis inducida por PTZ en ratón. El protocolo consta en 7 dosis de 35 mg/kg i.p de PTZ administradas día por medio y posteriormente se procedió a realizar rebanadas de hipocampo. Evaluamos la transmisión sináptica excitatoria en el circuito CA3-CA1 mediante la técnica de registro extracelular de campo en rebanadas de hipocampo y la excitabilidad astrogial mediada por Ca^{2+} a través del registro de las ondas de Ca^{2+} en hipocampo. Paralelamente, se analizaron los cambios morfológicos, específicamente cambios de expresión de proteína acídica fibrilar glial (GFAP) y de expresión de receptores P2Y1 y mGluR5. Nuestros resultados indican que en el hipocampo de ratones kindleados con PTZ se produce: 1) aumento en la probabilidad de liberación en sinapsis de CA3-CA1, 2) aumento en la duración promedio de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} astrogial, como consecuencia del aumento en la frecuencia y porcentaje de oscilaciones lentas (ST) y 3) aumento en los valores de área relativa a la tinción con GFAP junto a una sobre expresión de receptores P2Y1 y mGluR5. Estos resultados sugieren que, al igual que en otros modelo de kindling, cómo el eléctrico, la hiperexcitabilidad astrogial

representa el mecanismo que produce el aumento en la gliotransmisión mediada por glutamato, provocando un alza en la probabilidad de liberación en terminales glutamatérgicos en el hipocampo epiléptico, aumentando la progresión de la epilepsia.

ABSTRACT

Epilepsy is characterized by the recurrent onset of spontaneous seizures that are associated with cerebral hyperactivity and alteration in the excitation-inhibition balance. Models of epileptogenesis in rats, such as electric kindling, changes have been observed in glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus, occasionally an increase in synaptic efficacy due to astroglial hyper-excitability mediated by Ca^{2+} and astrogliosis. However, until now changes in astroglial excitability are unknown and how this would have an impact on glutamatergic synaptic transmission in the model of epilepsy induced by pentylenetetrazole (PTZ) applied in mice.

For this, we apply a model of epileptogenesis induced by PTZ in mice. The protocol consists of 7 doses of 35 mg / kg i.p of PTZ administered every other day and then proceeded to perform hippocampal slices. We evaluated the excitatory synaptic transmission in the CA3-CA1 circuit using the extracellular field registration technique in hippocampal slices and the astroglial excitability mediated by Ca^{2+} through the recording of Ca^{2+} waves in the hippocampus. In parallel, the morphological changes were analyzed, specifically changes of expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and expression of P2Y1 and mGluR5 receptors.

Our results indicate that in the hippocampus of mice kindled with PTZ occurs: 1) increase in the probability of release at CA3-CA1 synapses, 2) increase in the average

duration of spontaneous oscillations of Ca^{2+} astroglial, as a consequence of the increase in frequency and percentage of slow transients (ST) and 3) increase in the values of area relative to GFAP staining with an over-expression of P2Y1 and mGluR5 receptors. These results suggest that, as in other kindling models, like electrical, astroglial hyperexcitability represents the mechanism that produces the increase in glutamate-mediated gliotransmission, causing an increase in the probability of release in glutamatergic terminals in the epileptic hippocampus, increasing the progression of epilepsy.

INTRODUCCIÓN.

La epilepsia es un desorden neurológico crónico, con una prevalencia de alrededor del 1% a nivel mundial (Morimoto K. et al, 2004; Carmody S. & Brennan L., 2010). A nivel nacional, los datos de prevalencia son de 10.8 a 17 por mil habitantes y la incidencia de 114 por 100.000 habitantes por año (Minsal, 2014). La epilepsia se caracteriza por la aparición recurrente de crisis espontáneas debido a una hiperactividad neuronal en el cerebro (Morimoto K. et al, 2004; Löscher W. & Brandt, C. 2010). Una crisis epiléptica es la manifestación clínica de una descarga eléctrica anormal y excesiva de un conjunto de neuronas en el cerebro (Rehni AK. Et al, 2009) y durante estas crisis las descargas son altamente sincrónicas, las cuales emergen en primer lugar en el foco epileptogénico, y luego la actividad se propaga a otras zonas del cerebro (Jefferys et al., 2012; Timofeev et al., 2012; Goldberg and Coulter, 2013; Falco-Walter et al., 2018). Por tanto, puede ser considerada un desorden en donde ocurren excesivas descargas neuronales ligadas a un desbalance entre la actividad excitatoria y la inhibitoria. (McCormick and Contreras, 2001; Carmignoto G. & Haydon P., 2012; Staley, 2015).

El concepto de epilepsia ha cambiado con los años, pero la definición más actualizada indica que la epilepsia existe cuando una persona tiene una crisis epiléptica y su cerebro “demuestra una tendencia duradera y patológica a tener crisis recurrentes” (Fisher et al., 2014).

Dentro de las distintas manifestaciones de la epilepsia se encuentra la epilepsia del lóbulo temporal (ELT). Una proporción significativa de quienes la padecen son resistentes a los fármacos antiepilépticos, lo cual es contrastado con la alta eficacia de estos fármacos demostrada en modelos preclínicos de crisis agudas (Mazzuferi M. et al, 2012). Esta se

caracteriza por la localización del foco de crisis a menudo en estructuras temporales mesiales, tales como el hipocampo, amígdala o ambas (Morimoto K. et al, 2004); el hallazgo frecuente de una “lesión inicial precipitante” que precede a la aparición de la ELT, una alta incidencia de esclerosis del cuerno de Ammon (Curia G. et al, 2008), se asocian frecuentemente con la pérdida neuronal hipocampal y gliosis, particularmente en el subcampo de CA1 y en el hilus del giro dentado. (Bartolomei F. et al, 2005).

La mayoría de estas características pueden ser reproducidas con modelos animales crónicos de ELT en roedores, particularmente los modelos de **kindling o de status epiléptico (SE)**, los cuales son más cercanos e ideales para homologar las características morfológicas en estructuras mesiales y las crisis espontáneas recurrentes, observadas en la ELT (Curia G. et al, 2008), y que buscan reproducir experimentalmente el fenómeno de “epileptogénesis”, **sin embargo, algunas las alteraciones funcionales que pueden estar ocurriendo en la mayoría de los modelos de epileptogénesis permanecen inciertas.**

Epilepsia

En el año 2005, la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) formuló las definiciones conceptuales de “crisis” y de “epilepsia”. Una crisis epiléptica es una ocurrencia transitoria de signos y/o síntomas debido actividad excesiva o hipersincronía neuronal en el cerebro. La epilepsia por otra parte, es un desorden del cerebro, caracterizado por una fuerte predisposición a generar crisis epilépticas debido a las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición (Fisher R. et al, 2005).

Más específicamente la epilepsia es diagnosticada cuando una persona presenta: 1) al menos 2 crisis no provocadas o reflejas con más de 24 hrs de diferencia, 2) una crisis no

provocada o refleja y la probabilidad de crisis adicionales similares al riesgo general de recurrencia después de dos crisis no provocadas (de al menos un 60% de probabilidad de recurrencia en los próximos 10 años), o 3) un síndrome de Epilepsia (Fisher R. et al., 2014; Falco-Walter et al., 2018).

El año 2017, la ILAE actualiza la clasificación de la epilepsia (Scheffer I. et al, 2017), donde integra 4 niveles.

- El primer nivel se relaciona con el tipo de crisis que presenta el paciente. Las crisis pueden ser de inicio focal, de inicio generalizado o de inicio desconocido (Fisher R. et al, 2017)
- El segundo se relaciona con el diagnóstico del tipo de epilepsia, incluyendo la epilepsia focal, epilepsia generalizada, epilepsia combinada generalizada, epilepsia focal y también el grupo de epilepsias de causa desconocida. (Fisher R. et al, 2014)
- El tercer nivel se relaciona con el diagnóstico de síndrome epiléptico. Este se refiere al conjunto de características incorporando tipo de crisis, electroencefalograma (EEG) y características imagenológicas que tienden a ocurrir en juntas (Scheffer I. et al, 2017)
- Y el cuarto nivel integra la necesidad de considerar la etiología, lo cual permite ampliar las posibles causas que pueden preceder a una epilepsia. Se divide en 6 grupos, los cuales son de etiología estructural, genética, infecciosa, metabólica, inmune y de causa desconocida (Scheffer I. et al, 2017).

Dentro de los distintos tipos de epilepsia tenemos la ELT, la cual ha sido ampliamente estudiada. La esclerosis hipocampal (HS) es la marca histopatológica más frecuente encontrada en pacientes fármaco-resistentes que padecen de este tipo de epilepsia. El año

2013, la ILAE (Blümcke I. et al, 2013) generó un consenso y clasificó la ELT en relación a estos cambios morfológicos de HS, definiendo 3 tipos:

- HS ILAE tipo 1: el tipo más común de HS, reportado en el 60 al 80% de los casos. El segmento CA1 es el más afectado, con pérdida del 80% de las células. Hay pérdida celular en otros segmentos, como pérdida de neuronas piramidales en CA2, neuronas en CA3 y CA4 y de células granulares en el giro dentado. Estos cambios se ven acompañados de gliosis.
- HS ILAE tipo 2: este tipo presenta una pérdida predominante en las neuronas de CA1, afectado a casi el 80% de las neuronas piramidales. Otras zonas se afectan, pero con menos porcentaje. Estos cambios se ven acompañados de gliosis.
- HS ILAE tipo 3: Además de presentar gliosis, hay una pérdida predominante en las células de CA4 (alrededor del 50%) y en las células del giro dentado. CA3 y CA2 se afectan moderadamente.

Una de las características de la epilepsia es el ya conocido desbalance entre la transmisión excitatoria e inhibitoria. En condiciones normales, hay distintas estructuras que permiten la mantención de la homeostasis en el sistema nervioso central. Una de ellas es el astrocito y como consecuencia a finales de los 90' se acuñó el concepto sinapsis tripartita (Araque A. et al., 1999). Existe una amplia evidencia que permite indicar que los astrocitos podrían influir en la patogénesis y fisiopatología de la epilepsia, por medio de la liberación de gliotransmisores tales como glutamato, ATP y D-Serina (Clasadonte J. & Haydon P., 2012; Clasadonte J. et al, 2013; Haydon P. & Carmignoto G., 2006). La disrupción del componente glial de la barrera hemato encefálica, así como la inflamación inducida por la glia, podrían estar implicados no sólo en la generación de crisis epilépticas si no que también en procesos

fisiopatológicos que conllevan al desarrollo de epileptogénesis (Boison D. & Steinhäuser C., 2018)

Fisiología de los Astrocitos

Los astrocitos constituyen aproximadamente el 30% de las células cerebrales y ocupan dominios espaciales no superpuestos con las neuronas en el sistema nervioso. Los astrocitos no solo proveen de soporte estructural, metabólico y homeostático, si que no que también participan en diversas funciones cerebrales (Khakh B. & Sofroniew M., 2015; Verkhratsky A. & Nedergaard M., 2018). Los astrocitos no disparan potenciales de acción, pero son excitables por medio de señales intracelulares. Iones intracelulares como Ca^{2+} y Na^+ así como segundos mensajeros como AMPc de los astrocitos permiten cambiar dinámicamente en espacio y tiempo la respuesta a un estímulo. Las señales de Ca^{2+} han sido ampliamente estudiadas y bien caracterizadas desde que se descubrió que son fundamentales en la señalización intracelular y la comunicación intercelular (Dallerac G. et al, 2018; Ben Haim L. & Rowitch D., 2017).

Como los astrocitos no son células eléctricamente excitables, utilizan variaciones de las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} para enviar señales a otras células (Zorec R. et al., 2012; Parpura V. & Verkhratsky A., 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 (tales como mGluRs, GABA_B , P2Y, mAChRs) e ionotrópicos (tales como NMDA, AMPA, P2X, GABA_A) en la astroglia (Parpura V. & Haydon P., 2009). Esto permite generar comunicación con neuronas vecinas o entre astrocitos (Volterra A. et al., 2014). En el caso de los receptores metabotrópicos acoplados a proteína G su activación provoca la síntesis de fosfolipasa C, generando 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 (Shigetomi E. et al, 2018). Así, el aumento de Ca^{2+} intracelular genera la liberación de gliotransmisores (Araque A. et al., 2000; Zhang Z. et al., 2007).

Señalización astrogial en procesos patológicos

Los astrocitos reactivos demuestran señales Ca^{2+} dinámicas y aberrantes. En la mayoría de los casos, las señales de Ca^{2+} aumentan en términos de amplitud, duración y frecuencias (Shigetomi E. et al, 2018). Hay grandes variaciones en la dinámica del Ca^{2+} en los astrocitos reactivos de distintos modelos patológicos, lo cual indica diversos mecanismos dependientes de las condiciones de estudio. Los astrocitos y microglia son las primeras células en responder ante alguna injuria generando señales de reactividad, dentro las cuales han sido incluidas la señalización dependiente de Ca^{2+} astrogial (Rossi D. & Volterra A., 2009; Choo A. et al, 2013; Heuser K. et al, 2018; Álvarez-Ferradas C. et al, 2015). Por ejemplo, en modelos de SE con kainato y pilocarpina, los astrocitos aumentan rápidamente las onda de Ca^{2+} en respuesta a una hiperexcitabilidad mediada por la droga. (Shigetomi E. et al, 2018). Evidencias de la supresión de las respuestas de Ca^{2+} mediante la delección del receptor IP3, en donde los astrocitos carecen de una vía principal de liberación de Ca^{2+} intracelular, resulta en una reducción en la actividad epiléptica registrada con electroencefalografía (Heuser K. et al, 2018). Esto indicaría que las señales de Ca^{2+} astrocíticas son proconvulsivas. En modelos de kindling eléctrico en ratas, se ha observado alteración en las señales de Ca^{2+} astrogial, evidenciado en aumento en la duración de las señales de Ca^{2+} en el hipocampo epiléptico, lo cual podría regular la susceptibilidad de las crisis epilépticas (Álvarez-Ferradas C. et al, 2015; Wellmann M. et al, 2018; Shigetomi E. et al, 2018).

El concepto de Epileptogénesis

La epileptogénesis es el proceso por el cual el tejido cerebral normal se transforma en un tejido que genera crisis espontáneas recurrentes, debido a mecanismos genéticos o adquiridos que gatillan cambios en cascadas moleculares y celulares que eventualmente generarán estas crisis espontáneas (Pitkänen A. & Lukasiuk K. 2009; Rattka M. et al, 2012), las que van aumentando de manera progresiva.

Gowers W. (1881) fue quien reconoció por primera vez que a menudo hay un intervalo libre de convulsiones que dura meses o años entre la lesión cerebral y el inicio de la epilepsia sintomática, al que se conoce como período de latencia. El intervalo entre la lesión y la aparición de convulsiones clínicamente evidentes sugiere un proceso activo, que durante un período de tiempo conduce a cambios que eventualmente causan epilepsia (Löscher W. & Brandt, C., 2010). Diversos autores indican que durante el período de latencia en este proceso de epileptogénesis, hay una cascada de cambios poco conocidos que transforman el cerebro no epiléptico en uno que genera crisis espontáneas recurrentes (Herman ST., 2002; Pitkänen A., 2002; Walker MC. et al, 2002; Pitkänen A. et al, 2007; Jacobs M. et al, 2009). Numerosos posibles mecanismos subyacen este proceso de epileptogénesis, pero no existe un consenso de qué cambios observados son causas o consecuencias y cómo interactúan (Löscher W. & Brandt, C., 2010). Para poder determinar los posibles cambios morfológicos y sinápticos ocurridos debido a un evento que gatillará un cuadro epiléptico y sus consecuentes crisis espontáneas, se han caracterizados modelos en roedores como el de **kindling y el de SE**.

El término kindling se refiere al fenómeno por el cual la aplicación inicial de un estímulo eléctrico subconvulsivante resulta en una intensificación progresiva de la actividad convulsiva, culminando en crisis generalizadas (McNamara J. et al, 1980). El kindling,

además de ser inducido por una estimulación eléctrica de diferentes regiones cerebrales puede ser desarrollado utilizando distintos agentes químicos (ej: pentilentetrazol) (Dhir A. 2012). Las crisis provocadas inicialmente ocurren luego de estímulos repetitivos con aumento de la intensidad, y eventualmente, luego de alcanzar el estado de “kindleado”, ocurren las crisis espontáneas (Coppola A. & Moshé S., 2012). Hay varios reportes que indican que el kindling permite el desarrollo de crisis espontáneas después de suficientes estímulos, pero estos hallazgos no son universales en todos los laboratorios o especies (Bertram E. 2007). De hecho, en el protocolo clásico de kindling las crisis espontáneas usualmente no ocurren, por lo que se aplican protocolos prolongados llamados “overkindling”, los cuales pueden llevar a la aparición de estas crisis espontáneas (Gorter J. et al, 2015). El protocolo de kindling permite el aumento gradual y progresivo de la actividad electroencefalográfica (EEG) y conductual después del estímulo. La actividad EEG corresponde al disparo tónico-clónico de espigas poblacionales, llamadas post descargas (PD), las cuales pueden detectarse en la estructura estimulada o en las áreas de proyección. Estas PD son atribuidas a descargas ictales como producto del aumento de la actividad sincrónica e hiperexcitabilidad de un gran número de grupo neuronales (Bonansco C. & Fuenzalida M., 2016).

Por otra parte, el modelo de SE en roedores se caracteriza por la inducción del status epiléptico generalmente con dosis agudas de un agente farmacológico (ej: kainato, pilocarpina). Le sigue un período de latencia y posteriormente ocurren las crisis espontáneas. La extensión del daño está relacionado con la duración, la severidad del SE y del tipo de modelo utilizado (Gorter J. et al, 2015). Típicamente se utilizan altas dosis de un agente convulsivante, el cual es inyectado sistémicamente, provocando crisis continuas y recurrentes las cuales caracterizan al SE (Morimoto K. 2004).

Kindling inducido por pentilentetrazol (PTZ)

El PTZ se sintetizó en 1924 por Hildebrant F. y se utilizó en varios laboratorios para probar la actividad anticonvulsiva de diversos fármacos poco después del primer informe de su acción convulsiva. (Löscher W., 2017). El PTZ es un antagonista no competitivo de los receptores GABA_A (Hansen SL, 2004), que suprime la función de las sinapsis inhibitorias, aumentando de la actividad neuronal, lo que conllevaría a generar crisis generalizadas en modelos animales (Shimada T & Yamagata K, 2018). Es sabido que los receptores de GABA_A, Benzodiazepina (BDZ), Picrotoxina (PTX) y los canales de Cl⁻ se ensamblan en un solo complejo supramolecular. Los receptores de BDZ y de PTX actúan como un sitio alostérico para el receptor GABA_A y viceversa (Bazyan A. et al, 2001). La mayoría de las evidencias indican que el PTZ interacciona con el sitio de unión a PTX en el receptor GABA_A, bloqueando el canal de Cl⁻ (Eloqayli H. et al, 2004; Löscher W. 2009; Carmody S. & Brennan L., 2010; Bazyan A. et al, 2001). Esto provocaría una hiperexcitabilidad la que se reflejaría, tal como en la estimulación eléctrica repetitiva, en burst de espigas poblacionales, cuyo número y duración progresa con la presentación repetitiva del estímulo (Bonansco C. & Fuenzalida M. 2016). El PTZ, como otras drogas relacionadas con GABA (ej: bicuculina, picrotoxina), presentan 4 patrones EEG (Velisek L, 2006):

1. Espigas aisladas, usualmente asociadas con sacudidas mioclónicas. En animales en desarrollo, ondas lentas y agudas aparecen en lugar de espigas.
2. “Spindles” o “huso” de actividad de ondas y espigas asociadas a comportamiento de freezing.
3. Actividad decreciente de ondas y espigas asociada a crisis clónicas. Este patrón también depende de la droga.

4. Una o varias poliespigas y ondas lentas asociadas con el inicio de las crisis tónico-clónicas.

El modelo de kindling inducido por PTZ (PTZ-kindling) es utilizado para reproducir crisis generalizadas, característica observada en la ELT (Goudarzi E. et al, 2015; Liu X. et al, 2015; Bascuñana P. et al, 2016; Rattka M. et al, 2012). El PTZ-kindling se considera un modelo de epilepsia de ausencia humana y mioclónica, con crisis tónico-clónicas generalizadas (Ma X. et al, 2007). PTZ induce 4 fenómenos conductuales: comportamiento de freezing, espasmos mioclónicos, crisis clónicas y crisis tónico-clónicas (Velisek L. 2006). En modelos aplicados en roedores, a dosis bajas de PTZ se genera crisis de ausencia, dosis moderadas produce crisis clónicas, mientras que a dosis altas induce crisis tónico-clónicas, *SE* generalizado y la muerte de los animales (André V. et al, 1998).

El grupo de Huang L. (2002), desarrolló un modelo de PTZ logrando evidenciar comportamiento epiléptico progresivo en conjunto con alteraciones en la realización de tareas cognitivas como de memoria espacial, sin observar crisis espontáneas recurrentes. Por lo tanto hay que considerar la cantidad de estímulos o dosis y la variabilidad de tiempo en la aparición de las crisis espontáneas, ya que luego de instaurarse el foco epiléptico, se da paso al período de latencia, que puede variar entre 24- 48 hrs, semanas e incluso meses (Morimoto K. et al 2004; Gröticke I. et al, 2007; Curia G et al, 2008; Chen LL. et al 2013), hasta finalmente la aparición de dichas crisis espontáneas. Por lo tanto, en modelos de kindling como el de PTZ, donde se limita a protocolos de días o un par de semanas, es relevante observar una progresión en la respuesta epiléptica más que la aparición de crisis espontáneas.

Existen diversos protocolos de PTZ-kindling. La mayoría de los autores utilizan dosis de 20 – 40 mg/kg por períodos que varían de las 2 a las 8 semanas (Bascuñana P. et al, 2016;

Dhir A. 2012; Ekonomou A. et al, 2001; Grecksch G. et al, 1997; Koshal P & Kumar P. 2016; Vasil'ev D. et al, 2013; Lüttjohann A. et al, 2009). Las crisis son comúnmente inducidas por una sola administración sistémica de PTZ, y la recuperación es muy rápida, dentro de los 30 minutos (Pitkänen A. et al, 2006; Kandravicius L. et al, 2014). Esto hace que el número de crisis sea más controlable en este modelo de kindling. (Shimada T & Yamagata K, 2018).

Modelos de epileptogénesis en roedores: Cambios morfológicos y sinápticos

Los distintos modelos de epileptogénesis generan cambios morfológicos y de transmisión sináptica, los cuáles podrían ser los mecanismos que regulan las manifestaciones clínicas de la epilepsia.

El tratamiento crónico con PTZ desarrolla crisis tónico-clónica generalizadas, reduce las habilidades cognitivas, aumenta el stress oxidativo y altera los niveles de neurotransmisor (Koshal P & Kumar P. 2016). El PTZ-kindling aumenta la amplitud de las espigas poblacionales en la capa granular del giro dentado (Davoudi M. et al, 2013). Sumado a esto, Wei D. et al (2015), demostraron que el modelo de *SE* inducido por Pilocarpina en ratón genera una pérdida progresiva de interneuronas GABAérgicas en el giro dentado.

Por otra parte, la epileptogénesis estaría asociada a cambios en la expresión de varias subunidades del receptor GABA_A en modelos animales y en humanos (Pavlov I. & Walker M., 2013). Los hallazgos del grupo de Corda M. (1990) indican una reducción marcada en la captación de Cl⁻ dependiente de receptores GABA_A en la corteza cerebral de ratas kindleadas con PTZ. Esto indicaría que la sensibilidad a las crisis inducidas por PTZ aumenta después de la administración repetida de este agente. También se ha demostrado cambios en los niveles de ARNm del receptor GABA_A ya sea con una dosis o dosis repetitivas de PTZ (Hansen S. et

al, 2004), en conjunto de cambios en el sitio de unión y niveles de ARNm de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato (Ekonomou A. et al, 2001).

Un factor importante es el intervalo entre las distintas dosis. Esto permite que los efectos del kindling eléctrico y el inducido por PTZ sean duraderos. El grupo de Corda M. (1991) ratificó que hay una mayor sensibilidad a las crisis epilépticas en ratas kindleadas con PTZ hasta un año después de la interrupción del fármaco, lo que sugiere que este protocolo produce un cambio permanente en la susceptibilidad a las crisis. Esto se relaciona con los resultados del grupo de Bazyan A. (2001), quienes aplicaron PTZ-kindling en ratas y observaron susceptibilidad a generar crisis 6 meses después de la aplicación de dicho protocolo, junto a un aumento en la actividad del complejo formado por los receptores GABA_A, BDZ y PTX.

Lo anterior, podría relacionarse con cambios en la eficacia sináptica en distintas estructuras cerebrales, como el hipocampo. La inducción de SE por medio de kainato reduce la facilitación, probablemente por el aumento basal de la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Zucker R., Wade R., 2002). De hecho en ratas tratadas con esta droga, se encontró un aumento del tamaño del pool de glutamato a ser liberado, indicando un aumento en la probabilidad de liberación en las fibras musgosas de la sinapsis de CA3 (Goussakov I. et al, 2000). El grupo de Doi T. (2011) evidenció que el ARNm del transportador glutamato-aspartato (GLAST) en hipocampo de ratas había disminuido en comparación al grupo control luego de 30 días de la aplicación de un protocolo de PTZ-kindling. Es sabido que gran parte de la captación de glutamato depende de transportadores gliales (Rothstein J. et al., 1996). Debido a la presencia de concentraciones extracelulares elevadas de glutamato, podría resultar en alteraciones en el potencial de membrana y despolarización sináptica (Doi T. et al,

2011). Conjunto a eso, el grupo de Watanabe T. (1999) encontró que ratones con deficiencia de GLAST tenían una latencia más corta en iniciar crisis aún más severas en respuesta a PTZ, lo que sugiere que el GLAST es un factor determinante para la susceptibilidad de las crisis epilépticas.

Por otra parte, evidencias en kindling eléctrico en rata indican que existe una hiperexcitabilidad astrogial, la cual conduce a un aumento en la gliotransmisión mediada por glutamato, regulando al alza la eficacia sináptica a través de una mejora en la probabilidad basal en las terminales glutamatérgicas. (Álvarez-Ferradas C. et al, 2015).

Otro fenómeno relevante es el aumento de la excitabilidad mediada por Ca^{2+} en astrocitos. Numerosos estudios han reportado que las ondas de Ca^{2+} inducen una liberación local de glutamato que actúa en las neuronas vecinas y producen despolarización o gradientes de Ca^{2+} neuronal (Wetherington J. et al, 2008). La gliotransmisión dependiente de Ca^{2+} directamente contribuye con la excesiva sincronización que predispone a las conexiones cerebrales a las crisis epilépticas. Fundamentos significativos para esta visión vienen de la evidencia que indica que los astrocitos de conexiones hiperexcitables responden a señales neuronales con un aumento masivo del Ca^{2+} y generan un loop excitatorio recurrente con las neuronas que poseen el potencial para promover una crisis focal (Carmignoto G. & Haydon P., 2012). Esto fue observado por los grupos de Álvarez-Ferradas C. (2015) y de Wellmann M. (2018) quienes evaluaron la excitabilidad del Ca^{2+} astrogial comparando las elevaciones espontáneas de Ca^{2+} en rebanadas (preincubadas con SR101 y FLUO4-AM) de ratas control y kindleadas eléctricamente. Las rebanadas de hipocampo en ratas kindleadas exhibieron eventos de Ca^{2+} espontáneo de mayor duración respecto al grupo control, mientras que el número y la frecuencia de eventos por los astrocitos fue similar en ambos grupos. **Hasta**

ahora no hay evidencia del comportamiento de la excitabilidad astrogial en el PTZ-kindling, por lo que este es un antecedente de cómo podrían comportarse los astrocitos en dicho modelo.

Los modelos de epileptogénesis además generan cambios en la expresión de ciertos receptores a nivel cerebral. Las uniones de glutamato en el hipocampo de rata kindleada tienden a aumentar alrededor de un 50% comparados con el grupo control 9 semanas después de terminar el protocolo (Schroeder H. et al. 1998b). Este aumento en la unión de glutamato está asociada a un aumento de la unión a los receptores metabotrópicos de glutamato, especialmente los del grupo I (mGluI: mGluR1 y mGluR5) (Schroeder H. et al. 1999).

En ratas kindleadas eléctricamente se ha reportado un aumento en la expresión de receptores mGluR1 y mGluR5 (Akbar M et al., 1996; Al Ghou W. et al., 1998; Nagaraja R. et al., 2004) así como también en humanos con ELT (Blümcke I. et al., 2000), lo cual indicaría que los receptores mGlu del grupo I podrían contribuir a la susceptibilidad a generar crisis epilépticas (Löscher W. et al, 2006). La sobre regulación del ARNm de mGluR1 y la inmunoreactividad en el giro dentado encontrada por el grupo de Blümcke I. (2000) demuestran el aumento de la expresión del ARNm de mGluR1 en el hipocampo de ratas kindleadas eléctrica y químicamente, resultado reportado en otros experimentos (Akbar M. et al, 1996).

Por otra parte, hay diversos reportes que indican que el receptor metabotrópico purinérgico de ATP tipo 1 (P2Y1), también expresado en los astrocitos, está regulado al alza en la fisiopatología de diversas patologías como epilepsia, enfermedad de Alzheimer y accidente cerebro vascular (Kuboyama K. et al, 2011; Delekate A. et al, 2014; Álvarez-Ferradas C. et al, 2015).

Las señales de Ca^{2+} mediadas por el receptor P2Y1 ocurren en respuesta a un aumento en la excitabilidad neuronal o incluso espontáneamente. La sobreexpresión de receptores P2Y1, específicamente en astrocitos, preferentemente aumenta las señales de onda de Ca^{2+} en lugar de las señales de microdominio Ca^{2+} (Shigetomi E. et al, 2018). Esto es consistente con los informes que muestran que los receptores P2Y1 median las ondas de Ca^{2+} (Choo A. et al, 2013; Koizumi S., 2010)

Según varios antecedentes, el proceso neuropatológico más común encontrado en pacientes con ELT fármaco-resistente es la esclerosis hipocampal (Thom M., 2004; Wieser H. & ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy, 2004; Blumcke I. & Spreafico R., 2012). En 1964, Falconer y su grupo introdujeron el término de esclerosis temporal mesial (ELTM), indicando que el daño no se limita sólo al hipocampo sino que también a estructuras tales como amígdala y giro parahipocampal (Thom M. et al., 2009). Asociado a la esclerosis hipocampal, la astrogliosis es una de las mayores características (Wieser H. & ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy, 2004; Aronica E. & Mühlebner A., 2017). La gliosis también es una marca patológica post traumática observada en diversos cuadros neurológicos, especialmente en un foco epiléptico, evidenciándose a través de un aumento en la expresión de un marcador que es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), lo cual ha sido ampliamente reportado como un indicador de astrogliosis (Pekny M. & Nilsson M. 2005; Oberheim NA et al, 2008; Morales J. et al, 2014; Wilcox K. et al, 2015; Álvarez-Ferradas C. et al, 2015; Wellmann M. et al, 2018). La gliosis reactiva, es un componente de neuroinflamación que involucra cambios estructurales y metabólicos en astrocitos y microglia, y a menudo es una característica prominente en la ELT en humanos y en la mayoría de los modelos animales de crisis recurrentes (Wetherington J. et al, 2008). El grupo de Morales J.

(2014) demostró que en la región CA1 del hipocampo de ratas kindleadas, astrocitos hipertróficos situados en stratum oriens (SO) y stratum radiatum (SR) mostraron valores medios de GFAP más altos que las ratas control (relacionado con el área relativa y la intensidad de la tinción). El grupo de Álvarez-Ferradas C. (2015) obtuvo resultados similares, en donde astrocitos a nivel hipocampal de rebanadas de ratas kindleadas muestran hipertrofia con procesos más gruesos y sinuosos comparados con los del grupo control. Específicamente, los astrocitos ubicados en SO y SR de la región de CA1 de las rebanadas de kindling exhibieron valores elevados del área relativa e intensidad de tinción con GFAP respecto a las del grupo control. Otra evidencia reportada por Franke H. & Kittner H. (2001) indica que hay un incremento de la inmunoreactividad con GFAP en ratas parcialmente kindleadas 24 hrs después de la sexta dosis de PTZ. Las diferencias fueron ligeramente más grandes en el hilio de la fascia dentada y en el stratum lacunosum-molecular de la región de CA1, comparadas a los animales controles. Estos astrocitos se caracterizaron por una mejora en la inmunotinción del cuerpo celular y de los procesos fibrosos. El número de procesos de estos astrocitos aumentaban aparentemente. La hipertrofia astrogliosa fue encontrada en algunos animales, especialmente en la región de CA3 y en la amígdala basolateral.

Estos antecedentes permitirían sugerir que la astrogliosis reactiva puede asociarse con la hiperexcitabilidad astrogliosa mediada por Ca^{2+} en el hipocampo epiléptico (Álvarez-Ferradas C. et al, 2015)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según los antecedentes anteriores, los modelos de epileptogénesis dentro de las distintas modificaciones morfológicas y de conectividad sináptica que generan, se relacionan con 4 características esenciales:

- Cambios en la eficacia de la transmisión glutamatérgica en sinapsis CA3-CA1 del hipocampo.
- Aumento en la excitación astrogliar mediada por Ca^{2+} .
- Astrogliosis, observada por un aumento de GFAP.
- Sobre expresión de receptores mGluR I y P2Y1.

Muchos estudios al respecto han utilizado los distintos modelos de kindling o el de *SE* para homologar la ELT en ratas, mientras que los modelos de ELT en ratón han recibido menos atención. La gran característica que poseen los ratones es que ofrecen tecnología genética que puede ser muy valiosa para desentrañar la compleja relación entre epileptogénesis, neurodegeneración y alteraciones conductuales y cognitivos (Gröticke I. et al, 2007).

Por lo tanto, la factibilidad de un modelo farmacológico en ratón se posiciona con mayor viabilidad, debido a que se requiere la inyección de un agente convulsivante que genere un foco epiléptico, además de las ventajas que posee el ratón por sobre la rata (manipulación genética, viabilidad de las rebanadas).

Frente a esto, resulta interesante preguntarse si *¿el kindling farmacológico inducido por PTZ en ratón reproduce las características observadas en otros modelos de kindling en ratas?*

Hipótesis.

La epileptogénesis inducida por PTZ en ratón provoca el aumento en la eficacia sináptica glutamatérgica e hiperexcitabilidad astrogliar mediada por Ca^{2+} , reproduciendo los mecanismos observados en el kindling eléctrico de rata.

Objetivos generales.

- Evaluar los cambios en la probabilidad de liberación en sinapsis glutamatérgicas de CA3-CA1 en el modelo de epileptogénesis inducida por PTZ.
- Evaluar los cambios en la excitabilidad astrogliar mediada por Ca^{2+} en el modelo de epileptogénesis inducida por PTZ
- Evaluar astrogliosis y sobreexpresión de receptores mGluR5 y P2Y1 en el modelo de epileptogénesis mediada por PTZ.

Objetivos específicos.

- Implementar y evaluar el protocolo de epileptogénesis inducida por PTZ en ratón
- Evaluar el índice de facilitación en la transmisión sináptica en el modelo de epilepsia inducida por PTZ.
- Evaluar la duración y frecuencia de las elevaciones espontáneas de Ca^{2+} astrogliar en el modelo de epilepsia inducida por PTZ
- Evaluar área relativa de tinción para marcadores morfológicos y de expresión de receptores mGluR5 y P2Y1

Objetivos procedimentales

- Determinar la duración del protocolo de epileptogénesis inducida por PTZ en ratón.
- Establecer dosis de PTZ y grupos experimentales.
- Establecer criterios de observación y clasificación del comportamiento epiléptico.
- Obtener registros extracelulares reproducibles y estables del potencial postsináptico de campo (fEPSPs) y vola presináptica evocado por estimulación de las colaterales de Schaffer.
- Obtener registros reproducibles de las ondas de Ca^{2+} astrogliales.
- Obtener registros de marcadores morfológicos y de receptores en los astrocitos hipocampales

METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57 de 15 - 35 grs., entre 30 – 60 días. 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.). Los animales se alimentaron *ad libitum*, con un ciclo de 12:12 hrs. luz/oscuridad y permanecieron a $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con una humedad relativa de $55 \pm 5\%$.

Grupos experimentales y protocolo de administración de PTZ

Los ratones se dividieron en 3 grupos: control, control+vehículo (solución salina al 0.9%) y PTZ (inyectados con dosis subconvulsivantes de 35 mg/kg). El grupo control permaneció libre de administración de un agente externo. El grupo control+vehículo fue sometido al mismo proceso que el grupo PTZ, pero con la diferencia del agente inyectado. El protocolo para el grupo PTZ consta de 3 semanas (17 días de duración; fig 1).

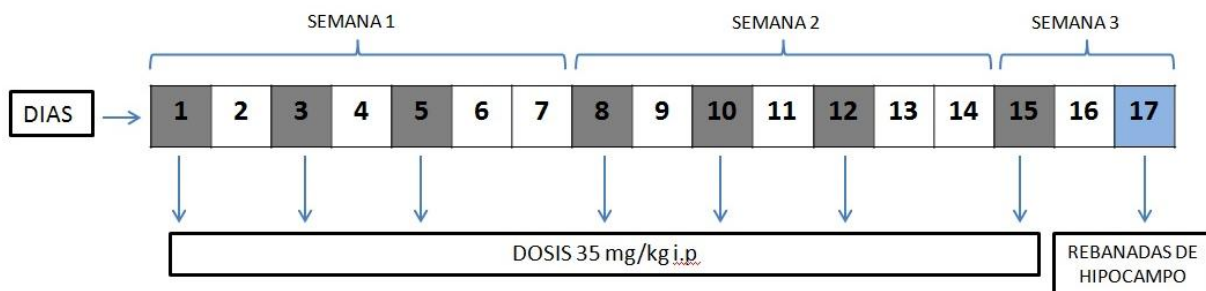


Figura 1. Modelo de Epileptogénesis inducido por PTZ. Esquema temporal del protocolo utilizado. El protocolo dura 3 semanas, contemplando 7 dosis de 35 mg/kg i.p. Las dosis fueron administradas en días intercalados (en gris y señalados con flecha).

Los ratones fueron ubicados en una sala especial para aplicar el protocolo y monitorizar el procedimiento donde también se registró su peso. La solución de PTZ (0.01 gr de PTZ en 1 ml de solución salina al 0.9%) se preparó cada día para mantener la estabilidad del fármaco e inyectar bajo las mismas condiciones a todos los ratones. Los ratones fueron inyectados de manera intraperitoneal (i.p), administrando 7 dosis en días intercalados: semana 1, días 1-3-5; semana 2, días 8-10-12; semana 3, día 15. Posterior a cada inyección, se observó el comportamiento de cada animal durante 1 hr para verificar los estadios de las crisis epilépticas de acuerdo a la siguiente escala conductual: estadio 0: no hay respuesta; estadio 1: inmóvil y/o espasmos faciales y en orejas; estadio 2: ondas convulsivas a través del cuerpo; estadio 3: sacudidas mioclónicas, cola levantada, rearing; estadio 4: crisis tónico-clónicas, se vuelca en posición lateral; estadio 5: crisis tónico-clónicas generalizadas, se vuelca hacia el lomo, pierde control postural, da saltos (Becker A. et al, 1992; Becker A. et al, 1997; Rüttrich H. et al, 2001; Bascuñana P. et al, 2016; Davoudi M. et al, 2013; Goudarzi E. et al, 2015; Shimada T & Yamagata K, 2018). El criterio para determinar que el animal fue “kindleado” es que haya presentado crisis entre los estadios 4-5 por un mínimo de 3 días. Finalmente los ratones fueron anestesiados y sacrificados al día 17 para obtener rebanadas de hipocampo.

Obtención de rebanadas de hipocampo

Se utilizaron rebanadas coronales de hipocampo, obtenidas según se especifica en Bonansco C. et al. (2011); Bonansco C. et al. (2007); Bonansco C. et al. (2002); Fuenzalida M. et al. (2009). Los ratones, luego de ser anestesiados, fueron sacrificados mediante decapitación. El cerebro fue removido por craneotomía y sumergido en líquido 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 – 350 µm), las cuales fueron incubadas en LCA (>1 hr) a temperatura ambiente. Posteriormente las rebanadas son transferidas y fijadas a una cámara de registro (2 ml) bajo un microscopio Olympus BW50WI, siendo perfundidas con LCA (2ml/min) burbujeado con gas carbógeno.

Registro extracelular de campo

El registro extracelular de potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) se llevó a cabo con un Amplificador Grass Inc., utilizando micropipetas extracelulares y estimulación bipolar convencional. La estimulación se realizó sobre las colaterales de Schaffer mientras se registraba la actividad de las neuronas en CA1 ubicando el electrodo de registro sobre el Stratum radiatum. Se aplicó un protocolo de pulsos pareados a una frecuencia de 0.3 Hz, siendo los pulsos presentados con un intervalo de 80 ms, ambos de igual intensidad. El primer fEPSP obtenido se catalogó como R1 y el segundo como R2. El índice de facilitación por pulsos pareados (PPR index) se calculó por medio de la razón entre R2/R1.

Además, se aplicó un protocolo de curva entrada y salida, aumentando cada 10 pA la intensidad de estimulación hasta alcanzar la primera respuesta de espiga poblacional. La espiga poblacional se determinó observando la deformación del fEPSP.

Los registros se llevaron a cabo en presencia de picrotoxina (PTX 10 µM) para registrar sólo la transmisión excitatoria.

Registro de ondas de Ca²⁺

Las ondas de Ca²⁺ astroglial fueron monitoreadas mediante microscopia de fluorescencia con 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 (0.5 – 1 seg, tiempo de exposición 100 – 150 ms), así como el análisis de las ondas de Ca²⁺, se realizó utilizando el software Nis-Elements AR 3.1 (Nikon). Para identificar los astrocitos en el hipocampo se utilizó el marcador morfológico Sulforodamina 101 (SR101; 0,5- 1 µM) utilizando la técnica descrita en Kafitz et al. (2008).

Protocolo de incubación con SR101: Se utilizó un LCA especial bajo en Ca²⁺ (en mM: 125 NaCl, 2,5 KCl, 0,5 CaCl₂, 6 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ y 20 glucosa, burbujeadado con 95% de O₂ y 5% CO₂; pH 7,4). La solución final en la que son incubadas las rebanadas de hipocampo contenía 5 ml del ringer especial antes mencionado y 5 µL de SR101. Las rebanadas, se incuban en un baño termoregulador a 32-34°C durante 30 min. Luego de esto, las rebanadas se traspan a una cámara con LCA normal y se mantienen por 30 min a temperatura ambiente.

Protocolo de incubación con Fluo-4 AM: La variación de Ca²⁺ en los astrocitos fue medida a través del monitoreo de los cambios en la intensidad de fluorescencias usando Fluo-4 AM, ya que bajo estas condiciones la mayoría de las células cargadas son astrocitos (Navarrete & Araque, 2008). Se utilizó la técnica usada por Ding S. (2012) y Álvarez-Ferradas C. et al. (2015). Las rebanadas previamente incubadas en SR101, son incubadas con Fluo-4 AM (5 - 10 µM) disuelto en LCA regular durante 60-75 minutos a temperatura ambiente. Para preparar el FLUO-4 AM se utilizaron 4µl de DMSO y 3µl de ácido plurónico (20% en DMSO),

añadidos directamente a un vial de Fluo-4 AM; 1,3 μl de la solución fueron aplicados directamente al hipocampo.

Las células fueron iluminadas (área de 36700 μm^2) 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 softwares 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 Ca^{2+} . Las elevaciones de Ca^{2+} 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 colocación con SR101 y el reconocimiento morfológico a través de microscopía infrarroja. Las variaciones de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} astrogial fueron la duración (en segundos), expresada como la duración total de la oscilación; la frecuencia (min-1 o Hz según se indique); y el número de astrocitos por área que exhiben oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas. Fueron considerados como eventos independientes aquellos en donde la $\Delta F/F_0$ disminuyó por debajo del 50% en relación a F_0 .

Inmunotinción y adquisición de imágenes

Las rebanadas de hipocampo obtenidas fueron fijadas con solución Bouin-Formaldehído durante 1 mes a 4°C. Las secciones se lavaron con 2 veces con PBS 0,05M (pH 7,4) seguido por lavado over night con la misma solución. Las rebanadas fueron lavadas (6x5 min) en PBS 0,05M + Triton X-100 0,5% (PBS-TX; pH 7,4), seguido de la incubación over night con anticuerpos primarios anti-GFAP (Merck (Chemicon); monoclonal ratón; 1/200); anti-mGluR5 (upstate Biotechnology, NY USA; policlonal rabbit; 1: 200) y anti-P2Y1R (Alomone Labs; Israel; conejo policlonal, 1:100) a temperatura ambiente (22-24°C). Las muestras se lavaron (6x5 min) con PBS 0,05M (pH 7,4) y luego se incubaron con anticuerpos secundarios (Jackson Immunoresearch Inc. Pennsylvania, US) CY2 anti-rabbit (1:200) y CY3 anti-mouse (1:200) por cinco horas. Las muestras se lavaron (6x5 min) con PBS 0,05M (pH 7,4) y se montaron mediante medio de montaje fluorescente DAKO (DAKO North America Inc.) y fueron observadas mediante un microscopio confocal Zeiss 780. La cuantificación de intensidad de fluorescencia (expresada en unidades arbitrarias, UA) y promedio de área de fluorescencia (% con respecto a área CA1) se realizó mediante software Image J (NIH, USA). Los resultados se expresan como el área relativa de inmunotinción (es decir, el área de unidades individuales de tinción).

Análisis estadístico

En todos los casos se determinó en primer lugar la distribución de cada población (Shapiro-Wilk test). Los datos se expresan como el promedio más el error estándar (SEM). Para el análisis de los distintos grupos se utilizó ANOVA de un factor o Kruskal-Wallis test según la distribución de los datos. En el caso de ANOVA de un factor, se acompaña con el Test de Tukey post-hoc para comparaciones múltiples; y en el caso de Kruskal-Wallis test se acompaña con el test de Dunn post-hoc para comparaciones múltiples. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando se obtuvo un $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**) o $p < 0.001$ (***), según se indique.

RESULTADOS

Fenotipo de comportamiento epileptogénico en PTZ-kindling

Luego de administrar las 7 dosis, los animales fueron observados y se analizó su comportamiento. 20 animales se utilizaron en el grupo PTZ. Un 85% sobrevivió al protocolo (n=17) y un 15% murió en uno de los días de inyección (n=3).

Se analizaron 3 componente fenotípicos: el promedio de los estadios alcanzados en cada día de inyección, la latencia (promedio de tiempo en alcanzar un estadio 5) y el promedio de la duración del estadio 5 (Fig. 2). A medida que el animal es inyectado, la severidad de los estadios aumenta en función de la progresión del protocolo (Fig 2A). Por otra parte, la latencia fue disminuyendo conforme se administran las distintas dosis. La figura 2B muestra este resultado, donde los valores medios de latencia tienden a disminuir a medida que avanza el protocolo (Fig 2B. Día 1: $4,21 \pm 1,47$ min. n=6 vs día 7: $2,96 \pm 0,51$ min. n=14). Finalmente, la duración de crisis de estadio 5 aumenta en función de la progresión del protocolo (Fig 2C. Día 1: $0,3 \pm 0,1$ min. n=6 vs día 7: $2,5 \pm 0,5$ min. n=14).

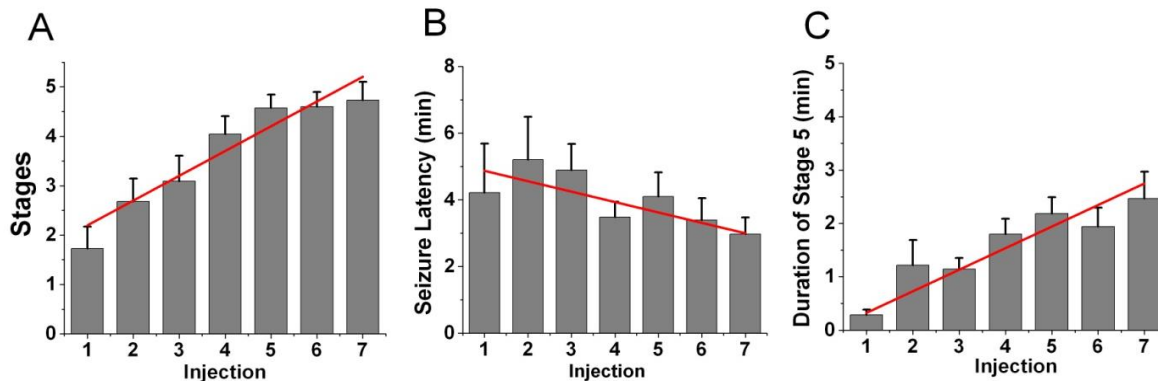


Figura 2. Fenotipo de comportamiento epileptogénico inducido por PTZ. (A) Promedio de los estadios alcanzados en cada dosis administrada. (B) Latencia media de las crisis estadio 5. (C) Duración media de las crisis estadio 5. En las tres figuras se muestra un ajuste de regresión lineal (línea roja) con un valor r de Pearson de 0,94 (fig A); -0,78 (fig B); y 0,97 (fig C).

Efecto del PTZ-kindling en la transmisión excitatoria en sinapsis CA3-CA1

Para evaluar los cambios en la transmisión sináptica, se registraron los fEPSP en stratum radiatum, estimulando las colaterales de Schaffer, utilizando protocolo de estimulación de intensidad variable para obtener la curva entrada/salida y protocolo de pulsos pareados para obtener el índice de facilitación (ambos protocolos descritos en materiales y métodos).

Mientras que la amplitud de los fEPSP fueron similares entre los grupos control y vehículo, las respuestas del grupo PTZ fueron mayores respecto a la intensidad de estimulación dada (Fig 3A y 3B). La curva entrada/salida mostró mayor excitabilidad en el grupo PTZ junto a un valor mayor de pendiente, respecto al control y vehículo (Fig 3B. Control: $1,54 \pm 0,06$ n=9 vs PTZ: $3,91 \pm 0,40$ n=4 vs Vehículo: $1,38 \pm 0,08$ n=5).

Conjuntamente, la amplitud de la vola sináptica (fV) necesaria para generar una espiga poblacional fue menor en el grupo PTZ (Fig 3C. Control: $0,35 \pm 0,04$ mV. n=9 vs PTZ: $0,17 \pm 0,60$ mV. n=4 vs Vehículo: $0,27 \pm 0,02$ mV. n=6).

Finalmente, el índice de facilitación por pulsos pareados (PPR index) fue significativamente menor en el grupo PTZ respecto al grupo control (Fig 3D. Control: $1,37 \pm 0,04$. n=22 vs PTZ: $1,20 \pm 0,05$. n=9; p= 0,014), mientras que el grupo vehículo mostró valores similares al control (Vehículo: $1,26 \pm 0,02$. n=14; p= 0,576). Como los cambios en la facilitación por pulsos pareados se correlacionan inversamente con la probabilidad de liberación (Dobrunz L. & Stevens C., 1997), la disminución de la facilitación por pulsos pareados en los ratones PTZ reflejaría un aumento en la probabilidad de liberación del neurotransmisor. En conjunto, estos resultados sugieren que la transmisión sináptica glutamatergica y excitabilidad hipocampal se encuentra aumentada en ratones PTZ.

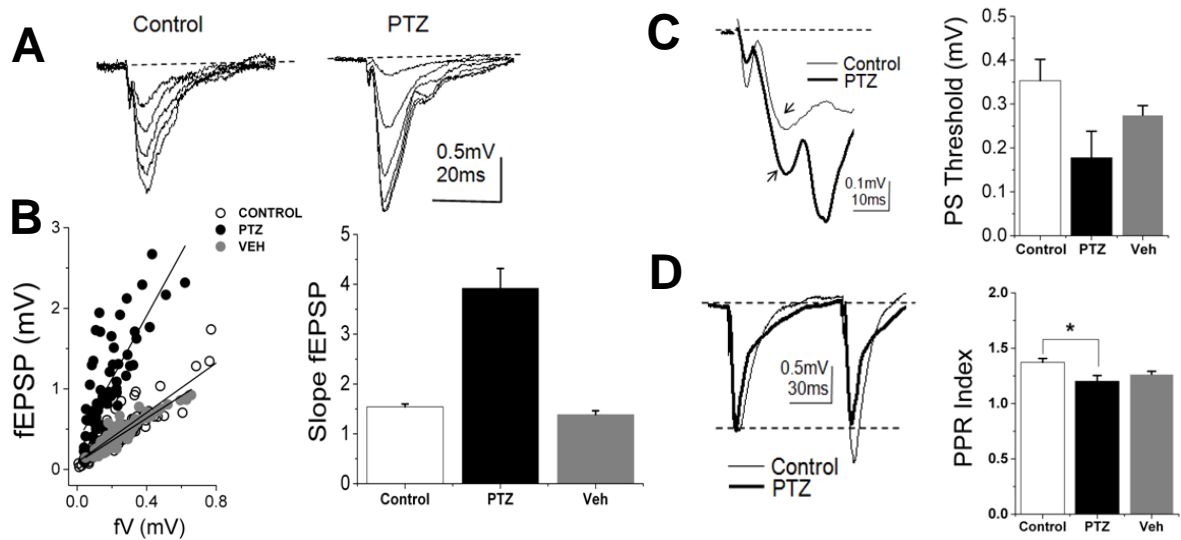


Figura 3. Efecto del PTZ-kindling en la transmisión excitatoria en sinapsis CA3-CA1. (A) Trazos representativos de fEPSP en los grupos Control y PTZ. (B) Curva entrada y salida (izquierda). Cada grupo presenta ajuste de regresión lineal de r de Pearson (línea negra. Control=0,94; PTZ=0,79; vehículo=0,91). Valores de la pendiente de los 3 grupos (derecha). (C) Trazo representativo de la relación de la fV con la aparición de espiga poblacional entre los grupos Control y PTZ, ambas señaladas con flecha (izquierda). Umbral de aparición de la espiga poblacional (derecha). (D) Trazos representativos de fEPSP con protocolo de facilitación por pulsos pareados en grupo control y PTZ (izquierda). PPR index en los 3 grupos (derecha). Estadística: Test de Shapiro Wilk para distribuciones, Anova de un factor con Test de Tukey post-hoc para comparaciones múltiples (* $p < 0,05$).

Efecto del PTZ-kindling sobre las ondas de Ca²⁺ astrogiales

Para evaluar si existen diferencias en la fisiología astrocítica entre los 3 grupos experimentales, se realizaron registros del patrón de ondas de Ca²⁺ astrogial en rebanadas de hipocampo previamente incubadas con SR101 (como marcador morfológico astrogial) y Fluo-4 AM (como indicador intracelular de Ca²⁺), según los protocolos indicados en materiales y métodos. En rebanadas obtenidas de ratones PTZ, los astrocitos exhibieron oscilaciones de Ca²⁺ de mayor duración en comparación a los controles y grupo vehículo (Fig 4A, B y C. Control: 20,1±0,49 seg, mediana 19 seg. n=179 vs PTZ: 23,9±0,60 seg, mediana 23 seg. n=155 vs Veh: 20,3±0,44 seg, mediana 19 seg. n=185; p=0,0001). La frecuencia media de las oscilaciones fue mayor en el grupo Vehículo. (Fig 4D. Control: 0,046 ±0,002 Hz, mediana 0,04 Hz. n=179 vs PTZ: 0,041 ±0,001 Hz, mediana 0,04 Hz. n=155 vs Veh: 0,049±0,001 Hz, mediana 0,047 Hz. n=185; p=0,0004).

La mayor diferencia de duración entre las poblaciones de oscilaciones espontáneas de Ca²⁺ astrogial se observó por sobre el percentil 75 de la distribución acumulada (Fig 4B Control: 23 seg. n=179 vs PTZ: 28 seg. n=155 vs Veh: 23 seg. n=185). Consecuentemente, los eventos aleatorios en un mismo astrocito fueron agrupados en oscilaciones rápidas (FT) y lentas (ST), utilizando como criterio de corte el valor correspondiente al percentil 75 en la condición control: 23 seg (Álvarez-Ferradas C. et al, 2015; Wellmann M. et al, 2018). El grupo PTZ mostró un mayor porcentaje de oscilaciones ST respecto a los otros 2 grupos. (Fig 4E. Control: 30,4±1,5%. n=163 vs PTZ: 37,2±1,7%. n=154 vs Veh: 30±1,3%. n=180; p= 0,0023). En conjunto, el porcentaje de oscilaciones FT fue menor en el grupo PTZ respecto a los otros 2 grupos. (Fig 4E. Control: 69,6±1,5%. n=163 vs PTZ: 62,8±1,7%. n=154 vs Veh: 70±1,3%. n=180; p= 0,0023).

En el mismo sentido, la frecuencia media de las ST en el grupo PTZ fue mayor respecto al grupo control (Fig 4F. Control: $0,011 \pm 0,0004$ Hz. $n=163$ vs PTZ: $0,013 \pm 0,0004$ Hz. $n=154$ vs Veh: $0,012 \pm 0,0004$ Hz. $n=180$; $p=0,006$), acompañada de una disminución en la frecuencia media de las FT del grupo PTZ respecto a los otros 2 grupos (Fig 4F. Control: $0,035 \pm 0,002$ Hz. $n=163$ vs PTZ: $0,028 \pm 0,001$ Hz. $n=154$ vs Veh: $0,036 \pm 0,002$ Hz. $n=180$; $p=0,001$). Estos resultados muestran que los astrocitos en el PTZ-kindling exhiben un aumento en la excitabilidad Ca^{2+} -dependiente, la cual se caracterizaría por una mayor incidencia de las ST.

Finalmente, dado que las diferencias en las frecuencias de FT y ST entre los 3 grupos podrían atribuirse a una interrupción de la excitabilidad astrogial, se evaluó la razón 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+} . En el grupo PTZ, el valor del índice FT / ST fue significativamente más bajo que en los otros 2 grupos (Fig 4G. Control: $4,81 \pm 0,47$. $n=163$ vs PTZ: $3,28 \pm 0,34$. $n=154$ vs Veh: $4,82 \pm 0,44$. $n=180$; $p= 0,0023$). Estos hallazgos sugieren que los astrocitos del hipocampo de ratones sometidos a PTZ-kindling exhiben un aumento de la excitabilidad dependiente de Ca^{2+} caracterizada por una mayor incidencia de eventos de larga duración.

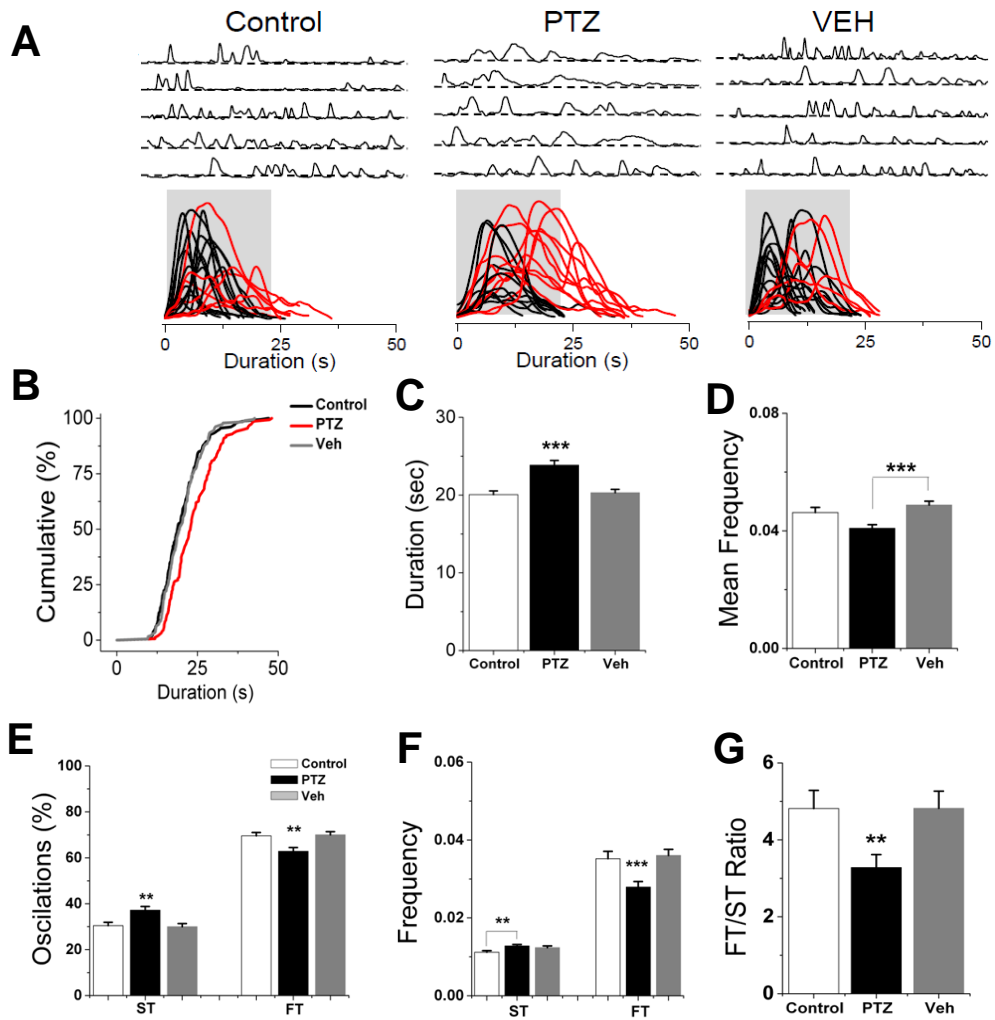


Figura 4. Efecto del PTZ-kindling sobre las ondas de Ca^{2+} astrogliales. (A) Trazos de representativos de la actividad espontánea Ca^{2+} -dependiente en cinco astrocitos en condiciones Control, PTZ y Veh (arriba). Superposición de oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} obtenidas de 20 células por condición, alineadas al comienzo de cada evento. Los cuadros grises muestran la ventana temporal dentro de los 23 sec, correspondiente al corte entre FT y ST. Las ST de Ca^{2+} (10 trazos) se resaltaron en rojo y las FT se resaltaron en negro (10 trazos) (abajo). (B) Porcentaje acumulado para la duración de las oscilaciones de Ca^{2+} astroglial en grupos Control (n=179); PTZ (n=155) y Vehículo (n=185). (C) Gráfico de la duración media en cada condición (D) Gráfico de la frecuencia media en cada condición. (E) Gráfico de porcentaje de oscilaciones lentas (ST) y rápidas (FT) por condición (F) Gráfico de frecuencia de oscilaciones lentas (ST) y rápidas (FT) por condición (G) Razón entre oscilaciones rápidas (FT) y lentas (ST) en cada condición. Estadística: Test Shapiro-Wilk para análisis de distribuciones, Kruskal Wallis test con Test de Dunn post-hoc para comparaciones múltiples (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Cambios de expresión asociados al PTZ-kindling

La astrogliosis reactiva está caracterizada por alteraciones morfológicas y de expresión de diferentes moléculas en los astrocitos durante diversos estados patológicos, incluida la epilepsia. Para confirmar este cambio morfológico en el hipocampo de ratones sometidos a PTZ-kindling, se evaluó la inmunorreactividad a GFAP, cuyo aumento de la expresión es un indicador de astrogliosis (Pekny M. & Nilsson M., 2005). Los astrocitos del grupo PTZ mostraron una morfología hipertrófica con procesos más gruesos e irregulares en comparación a los grupos control y vehículo (Fig. 5A). Específicamente, astrocitos ubicados en stratum radiatum de la región CA1 del grupo PTZ mostraron valores mayores de área a GFAP⁺ (Fig 5B. Control: $2,41 \pm 0,22\%$. n= 7 vs PTZ: $24,54 \pm 1,42\%$. n= 8 vs Veh: $2,85 \pm 0,40\%$. n= 8). Además se consideraron marcadores para receptores P2Y1 y mGluR5, los cuales se encuentran sobreexpresados en otros modelos de epilepsia crónica (Arónica E. et al, 2000; Cavarsan C. et al, 2012; Alves M. et al, 2017). El grupo PTZ presenta una sobreexpresión de ambos receptores (Fig 5A), con un aumento en los valores del área positiva para mGluR5 (Fig 5B. Control: $0,57 \pm 0,26\%$. n=4 vs PTZ: $7,91 \pm 4,27\%$. n=4 vs Veh: $0,87 \pm 0,40\%$. n=4) y receptor purinérgico P2Y1 (Fig 5B. Control: $0,11 \pm 0,08\%$. n=3 vs PTZ: $3,04 \pm 1,70\%$. n=4 vs Veh: $0,55 \pm 0,40\%$. n=4)

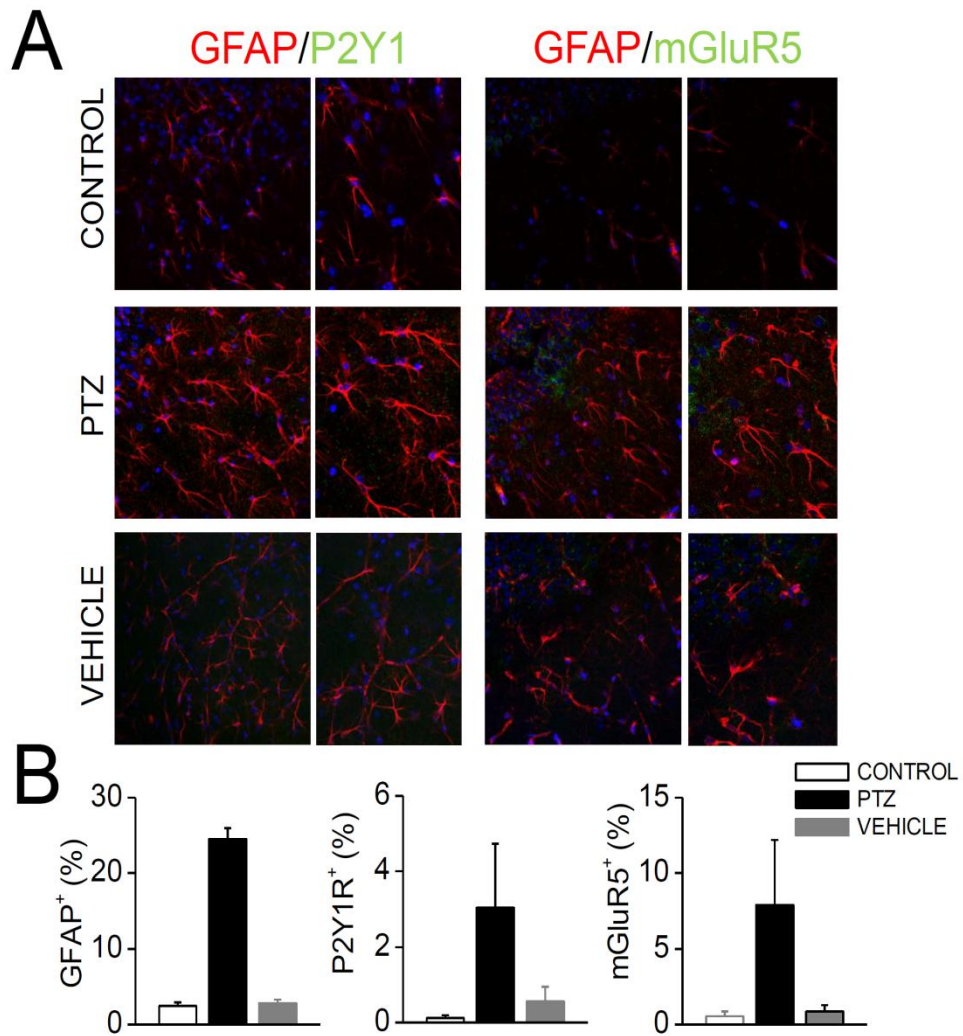


Figura 5. Cambios morfológicos inducidos por el PTZ-kindling. (A). Imágenes representativas de microscopía por fluorescencia de GFAP (en rojo), P2Y1 (en verde a la izquierda) y mGluR5 (en verde a la derecha). (B) Valores medios del % de área positiva a GFAP⁺ (izquierda), P2Y1⁺ (al centro) y mGluR5⁺ (derecha). El número de casos es insuficiente para realizar un análisis estadístico.

DISCUSIÓN

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar un modelo farmacológico de PTZ-kindling y determinar si reproduce los cambios de eficacia sináptica, cambios en la excitabilidad astrogial y cambios morfológicos evidenciados en otros tipos de modelos de epileptogénesis en roedores. Los resultados aquí presentados demuestran que, en el hipocampo de los ratones sometidos al PTZ-kindling, la actividad astrogial espontánea dependiente de Ca^{2+} se altera, principalmente en la frecuencia y porcentaje de las oscilaciones lentas (ST). Esto se acompaña de cambios en la eficacia sináptica, evidenciados en un aumento en la probabilidad de liberación en sinapsis glutamatergicas en circuito CA3-CA1 de hipocampo en conjunto a una disminución en el umbral de disparo de espiga poblacional y de los cambios morfológicos asociados a astrogliosis y sobreexpresión de receptores P2Y1 y mGluR5.

Aumento de la eficacia sináptica en transmisión glutamatergica CA3-CA1 en el hipocampo epiléptico

Los resultados obtenidos indican que los ratones kindleados presentan un aumento en la excitabilidad observada por una pendiente mayor en la curva entrada y salida asociada a un umbral menor de disparo de espigas poblacionales. Esto quiere decir, que a menor voléea sináptica se gatilla un fEPSP que generan espigas poblacionales de mayor amplitud (Fig 3A y 3B). Estos resultados se podrían relacionar con la susceptibilidad de un tejido nervioso a generar hiperactividad y desarrollar crisis convulsivas, reduciendo el umbral de convulsiones y una mayor sensibilidad al estímulo inductor, características de los kindling químicos (Gilbert M., Goodman J., 2006).

Los cambios de excitabilidad de la espiga poblacional evidenciados en este estudio, coinciden con otras investigaciones realizadas en ratas mediante kindling eléctrico (Morales J. et al, 2014)

El grupo de Postnikova T. (2019) desarrolló un estudio de SE inducido por una dosis única de PTZ (70 mg/kg i.p) e hicieron registros electrofisiológicos de fEPSP en CA1 de stratum radiatum y piramidal. En ratas que desarrollaron SE, las espigas poblacionales aparecieron en respuesta a una intensidad de corriente más baja que en los cortes de los animales de control, lo cual indica que la excitabilidad de las neuronas en CA1 aumentó después de las crisis.

Estos resultados se replican en el estudio del grupo de Palizvan M. (2001), quienes registraron potenciales de campo in vivo en la región CA1 del hipocampo de ratas previamente implantadas con electrodos de registro y de estimulación. Aplicaron un protocolo de administración de dosis de 45 mg/kg i.p. de PTZ cada 48 hrs por un período de una semana a un mes. Sus resultados electrofisiológicos indican que el kindling no tiene efecto en la pendiente de fEPSP o en la amplitud de la espiga poblacional en un periodo breve terminado el protocolo, pero 1 mes más tarde, la amplitud de la espiga poblacional aumenta. Dado que la amplitud de la espiga poblacional refleja el número y la sincronía de las descargas de las neuronas piramidales. Los cambios de umbral sugieren modificaciones presinápticas y / o postsinápticas a largo plazo.

Hay que recordar que los distintos modelos en epilepsia se acompañan de cambios electrofisiológicos y moleculares en diferentes áreas del cerebro, incluidos el hipocampo y el giro dentado. Junto con el cuerno de Amon, el giro dentado es una de las zonas más sensibles a los modelos de kindling (Morimoto K. et al., 2004; Ang C. et al., 2006). En el kindling por

PTZ aumenta la amplitud de las espigas poblacionales en las células granulares del giro dentado. (Robinson G. et al., 1991; Fathollahi Y. et al., 1997; Rütthrich H. et al., 2001). Estas características fueron observadas por el grupo de Davoudi M. (2013), quienes desarrollaron un protocolo de kindling inducido por PTZ, donde realizaron registros electrofisiológicos de campo en modalidad “freely moving” a ratas previamente implantadas con un electrodo monopolar en el giro dentado. Sus resultados evidencian una disminución en la facilitación por pulsos pareados, lo cual corrobora nuestros resultados sobre un aumento en la liberación de glutamato y un aumento en la actividad de sus receptores debido al aumento en la probabilidad de liberación de neurotransmisor (Fig 3D) (Leung L. & Au A., 1994; Kamphuis W. et al, 1994; Morrisett R. et al, 1989).

Los resultados del grupo de Álvarez-Ferradas C. (2015) mostrados en sinapsis glutamatérgicas de rebanadas de hipocampo en ratas kindleadas eléctricamente concuerdan con lo descrito en el presente modelo de kindling químico. En ambos modelos el aumento anormal de la eficacia sináptica es debido al aumento de la probabilidad de liberación basal en los terminales sinápticos. Sus hallazgos también muestran que la gliotransmisión mediada por glutamato está aumentada en el hipocampo de rata kindleada, presumiblemente como consecuencia de una hiperexcitabilidad astrogliar, mecanismo que también fue evidenciado en nuestro estudio, el cuál será desarrollado en el siguiente apartado.

Hiperexcitabilidad astrogial Ca^{2+} -dependiente en el hipocampo epiléptico

Los resultados obtenidos indican que los ratones kindleados con PTZ exhiben un aumento en la duración promedio de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} astrogial (Fig 4C), como consecuencia de un desbalance en la frecuencia y porcentaje total de FT y ST, traducido en un aumento en la frecuencia y porcentaje de ST con disminución de esos parámetros en las FT (Fig.4E y 4F). Este desbalance es mucho más evidente cuando se analiza la razón entre las FT y ST, donde un índice más bajo estaría asociado a una mayor excitabilidad dependiente de Ca^{2+} , siendo caracterizada por una mayor incidencia de eventos de larga duración, expresados como una relación de frecuencia FT / ST más baja (Fig 4G).

Estos cambios en las oscilaciones de Ca^{2+} ocurren de forma paralela a los cambios morfológicos. Los astrocitos reactivos muestran un patrón de señales de Ca^{2+} aberrantes, el cual se caracteriza por el aumento de la incidencia de oscilaciones lentas términos de duración y frecuencia. Este tipo de patrón aberrante ha sido descrito en astrocitos reactivos en distintos modelos patológicos (Wellmann M. et al, 2018; Heuser K. et al, 2018; Tian G. et al, 2005), indicando que los diversos mecanismos que subyacen las señales de Ca^{2+} son dependientes de las distintas condiciones experimentales (Shigetomi E. et al, 2019).

Así, el desbalance FT/ST podría ser el mecanismo que subyace al aumento en la gliotransmisión mediada por glutamato en el hipocampo epiléptico, provocando un alza en la probabilidad de liberación en terminales glutamatérgicos de las sinapsis de CA3-CA1, cómo se mencionó en el apartado anterior (Fig. 3C) y con ello un aumento en el tono glutamatérgico en el hipocampo (Cavus I. et al., 2005). Estos resultados se replican con los observados por Álvarez-Ferradas et al., (2015) y Wellmann M. et al (2018), quienes en el modelo de kindling eléctrico en ratas obtuvieron el mismo comportamiento de hiperexcitabilidad astrogial

evidenciado en este estudio. En modelos agudos de epilepsia, el aumento de las ondas de Ca^{2+} se relacionan con un aumento en la frecuencia de las despolarizaciones neuronales sincrónicas (Carmignoto G. & Fellin T. 2006). El aumento en la gliotransmisión mediada por glutamato, así como también el incremento en el tono glutamatérgico hipocampal, podrían explicar las altas concentraciones de glutamato observadas en el foco epiléptico en pacientes diagnosticados con ELT (Seifert G. et al., 2006). Existe un amplio conocimiento de que a través de la liberación de glutamato en astrocitos dependiente de Ca^{2+} se puede excitar directamente a neuronas vecinas y favorecer la actividad sincronizadas mediadas por la activación del receptor extrasináptico de NMDA. Esto indica un rol fundamental de la gliotransmisión dependiente de Ca^{2+} en la generación de actividades epileptiformes. El soporte indirecto para esta hipótesis fueron los resultados de estudios posteriores en rebanadas de cerebro y en preparaciones *in vivo* que describieron un aumento significativo en la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} en astrocitos durante la actividad epileptiforme (Carmignoto G. & Haydon P., 2012).

Aumento de GFAP y sobre expresión de mGluR5 y P2Y1

Los resultados obtenidos indican que los ratones kindleados con PTZ presentan aumento del área de inmunofluorescencia para GFAP, mGluR5 y P2Y1 respecto al grupo control y vehículo (Fig 5).

El proceso de astrogliosis ampliamente documentado en distintos modelos experimentales de epilepsia, muestras de tejido obtenidos de pacientes con TLE (Arónica E. et al, 2000; Pekny M. & Nilsson M. 2005; Oberheim NA et al, 2008; Wilcox K. et al, 2015) y en los estudios previos de nuestro grupo (Morales J. et al, 2014; Álvarez-Ferradas C. et al, 2015; Wellmann M. et al, 2018) corroboran los presentes resultados en el modelo PTZ-kindling aplicado en ratón.

Así mismo, la sobreexpresión de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (i.e.: mGluR5) que observamos en el hipocampo de ratones PTZ-kindling, se corrobora con resultados previos descritos en otros modelos de epilepsia (Akbar M et al., 1996) así como también en humanos con ELT (Blümcke I. et al., 2000; Notenboom R., 2006). En un modelo de SE inducido por pilocarpina en ratas se encontró una sobreexpresión de mGluR5 en stratum oriens de CA3 (Cavarsan C. et al, 2012). Así mismo, un modelo de kindling eléctrico en ratas generó una sobrerregulación de receptores mGlu I, especialmente mGluR5, los cuales se expresaron fuertemente una semana después al protocolo en astrocitos reactivos del hilus y región de CA3 (Arónica E. et al, 2000). En esta misma línea, el grupo de Löscher W. (2006) determinó que el uso de antagonistas para mGluR1 y mGluR5 en un modelo de kindling eléctrico no generan efectos anticonvulsivantes significativos para tratar crisis parciales, sugiriendo que la gliotransmisión contribuye en ciertos mecanismos río arriba a la generación de la actividad ictal, como por ejemplo la progresión y recurrencia de las crisis epilépticas.

Conjunto a lo anterior, el receptor P2Y1 también sufre cambios de expresión en astrocitos reactivos. A diferencia de los mGluR5, la sobreexpresión de receptores P2Y1 constituye una de las respuestas predominantes durante la epilepsia experimental y en pacientes con epilepsia (Alves et al., 2017), ratificando los hallazgos observados en el presente estudio (Fig 5).

Las señales de Ca^{2+} mediadas por el receptor P2Y1 ocurren en respuesta a un aumento de la excitabilidad neuronal (Shigetomi E. et al, 2019) o por activación de la microglia (Pascual O. et al, 2012). Estudios previos en nuestro laboratorio muestran que la sobreexpresión del receptor P2Y1 en los astrocitos aumentó preferentemente las señales de Ca^{2+} de larga duración (Wellmann M. et al, 2018). Hay que considerar que las crisis epilépticas traen consigo la liberación de agentes proinflamatorios, los cuales también se ha demostrado que regulan la actividad sináptica del hipocampo mediante el control de la liberación de glutamato de los astrocitos (Habbas S. et al., 2015; Santello M., Bezzi P., & Volterra A., 2011). El grupo de Nikolic L. (2018) comprobó que este mecanismo depende de la activación de los receptores P2Y1 en el hipocampo de ratón. Además, reportaron que las señales de Ca^{2+} de los astrocitos del giro dentado dependían de la activación del receptor P2Y1, sugiriendo así un loop clave dependiente de este receptor. Esto es consistente con reportes que muestran que los receptores P2Y1 median las ondas de Ca^{2+} (Koizumi S. et al, 2010; Choo A. et al, 2013).

En suma, todos nuestros resultados sugieren que en el modelo PTZ-Kindling en ratón el aumento de las ondas de Ca^{2+} astrogliar -via P2Y1R- producirían un aumento de la gliotransmisión mediada por glutamato, aumentando la eficacia sináptica y excitabilidad -via mGluR- en neuronas piramidales del hipocampo.

CONCLUSIONES

- 1.- El modelo PTZ-kindling genera una alteración en las señales de Ca^{2+} astrogial, evidenciado en el aumento de las oscilaciones lentas (FT/ST). Esto podría ser el mecanismo que subyace al aumento en la gliotransmisión mediada por glutamato en el hipocampo epiléptico.
- 2.- El modelo PTZ-kindling genera un aumento en la probabilidad de liberación en terminales glutamatérgicos de las sinapsis de CA3-CA1, y con ello eventualmente un aumento en el tono glutamatérgico en el hipocampo.
- 3.- El modelo PTZ-kindling genera astrogliosis en el hipocampo epiléptico, asociado a la sobreexpresión de receptores mGluR5 y P2Y1. Estos cambios morfológicos podrían contribuir al alza en la gliotransmisión, manteniendo un tono glutamatérgico elevado.
- 4.- Estos resultados sugieren que la alteración funcional de la señalización astrogial es un mecanismo común que subyace al proceso de epileptogénesis. Este estudio permite disponer del modelo de PTZ-kindling en ratón para estudiar la contribución de la gliotransmisión a través de herramientas de genética molecular en el cerebro epiléptico, permitiendo la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento de la epilepsia refractaria, apuntando a la gliotransmisión como eje central.

REFERENCIAS.

1. Akbar M., Rattray M., Powell J., Meldrum B. (1996). Altered expression of group I metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of amygdala-kindled rats. *Mol Brain Res* 43:105–16.
2. Al Ghoul W., Meeker R., Greenwood R. (1998). Kindled seizures increase metabotropic glutamate receptor expression and function in the rat supraoptic nucleus. *J. Neurosci. Res.* 54, 412e423.
3. Álvarez-Ferradas C, Morales JC, Wellmann M, Nualart F, Roncagliolo M, Fuenzalida M, Bonansco C. (2015). Enhanced astroglial Ca²⁺ signaling increases excitatory synaptic strength in the epileptic brain. *Glia. Sep;63(9):1507-21.*
4. Alves M., Gomez-Villafuertes R., Delanty N., Farrell M., O'Brien D., Miras-Portugal M., Hernandez M., Henshall D., Engel T. (2017). Expression and function of the metabotropic purinergic P2Y receptor family in experimental seizure models and patients with drug-refractory epilepsy. *Epilepsia. Sep;58(9):1603-1614.*
5. André V, Pineau N, Motte JE, Marescaux C, Nehlig A. (1998). Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur J Neurosci. Jun;10(6):2094-106.*
6. Ang C., Carlson G., Coulter D. (2006). Massive and specific dysregulation of direct cortical input to the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 26, 11850-11856.
7. Araque A., Parpura V., Sanzgiri R., Haydon P. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.

8. Araque A., Li N., Doyle R., Haydon P. (2000). SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 666–673.
9. Aronica E., van Vliet E., Mayboroda O., Troost D., da Silva F., Gorter J. (2000). Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci.* Jul;12(7):2333-44.
10. Aronica E., Mühlebner A. (2017). Neuropathology of epilepsy. *Handb Clin Neurol.* 145:193-216.
11. Bartolomei F., Khalil M., Wendling F., Sontheimer A., Régis J., Ranjeva JP., Guye M., Chauvel P. (2005). Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia.* May;46(5):677-87.
12. Bascuñana P, Javela J, Delgado M, Fernández de la Rosa R, Shiha AA, García-García L, Pozo MÁ. (2016). [¹⁸F]FDG PET Neuroimaging Predicts Pentylentetrazole (PTZ) Kindling Outcome in Rats. *Mol Imaging Biol.* Apr 4.
13. Bazyan A., Zhulin V., Karpova M., Klishina N., Glebov R. (2001). Long-term reduction of benzodiazepine receptor density in the rat cerebellum by acute seizures and kindling and its recovery 6 months later by a pentylentetrazole challenge. *Brain Research*, 888(2), 212–220
14. Becker A, Grecksch G, Rüthrich HL, Pohle W, Marx B, Matthies H. (1992). Kindling and its consequences on learning in rats. *Behav Neural Biol.* Jan;57(1):37-43.
15. Becker A, Krug M, Schröder H. (1997). Strain differences in pentylentetrazol-kindling development and subsequent potentiation effects. *Brain Res.* Jul 18;763(1):87-92.

16. Ben Haim L., Rowitch D. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 31–41.
17. Bertram E. (2007). The Relevance of Kindling for Human Epilepsy. *Epilepsia*, 48 (Suppl. 2):65–74.
18. Blümcke I., Becker A., Klein C., Scheiwe C., Lie A., Beck H., Waha A., Friedl M., Kuhn R., Emson P., Elger C., Wiestler O. (2000). Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol.* Jan;59(1):1-10.
19. Blumcke I., Spreafico R. (2012). Cause matters: a neuropathological challenge to human epilepsies. *Brain Pathol* 22: 347–349.
20. Blümcke I., Thom M., Aronica E., Armstrong D., Bartolomei F., Bernasconi A., Bernasconi N., Bien C., Cendes F., Coras R., Cross J., Jacques T., Kahane P., Mathern G., Miyata H., Moshé S., Oz B., Özkara Ç., Perucca E., Sisodiya S., Wiebe S., Spreafico R. (2017). International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia.* Jul;54(7):1315-29.
21. Boison D. & Steinhäuser C. (2018). Epilepsy and astrocyte energy metabolism. *Glia.* Jun;66(6):1235-1243.
22. Bonansco C. & Fuenzalida M. (2016). Plasticity of Hippocampal Excitatory-Inhibitory Balance: Missing the Synaptic Control in the Epileptic Brain. *Neural Plasticity.* Volume 2016, Article ID 8607038

23. Bonansco C, Couve A, Perea G, Álvarez-Ferradas C, Roncagliolo M, Fuenzalida M. (2011). Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *Eur J Neurosci.* Apr;33(8):1483-92
24. Bonansco C, Fuenzalida M, Olivares V, Molina C, Roncagliolo M. (2007). Asynchronous transmission in the CA3-CA1 hippocampal synapses in the neurological mutant taiep rat. *J Neurosci Res.* 85:223-229.
25. Bonansco C, Gonzalez de la Vega A, Gonzalez Alegre P, Borde M, Garca-Segura LM, Buno W. (2002). Tetanic stimulation of schaffer collaterals induces rhythmic bursts via NMDA receptor activation in rat CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus.* 12:434-446.
26. Carmignoto G. & Haydon P. (2012). Astrocyte Calcium Signalling and Epilepsy. *Glia,* August ; 60(8): 1227–1233
27. Carmignoto G. & Fellin T. (2006). Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanism for neuronal synchronization in the hippocampus. *J Physiol Paris.* Mar-May;99(2-3):98-102.
28. Carmody S. & Brennan L. (2010). Effects of pentylenetetrazole-induced seizures on metabolomic profiles of rat brain. *Neurochemistry International,* 56; 340–344
29. Cavarsan C., Tescarollo F., Tesone-Coelho C., Morais R., Motta F., Blanco M., Mello L. (2012). Pilocarpine-induced status epilepticus increases Homer1a and changes mGluR5 expression. *Epilepsy Res.* 2012 Sep;101(3):253-60.
30. Cavus I., Kasoff W., Cassaday M., Jacob R., Gueorguieva R., Sherwin R., Krystal J., Spencer D., Abi-Saab W. (2005). Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Ann Neurol* 57:226–235.

31. Chen L., Feng H., Mao X., Ye Q., Zeng L. (2013). One hour of pilocarpine-induced status epilepticus is sufficient to develop chronic epilepsy in mice, and is associated with mossy fiber sprouting but not neuronal death. *Neurosci Bull.* Jun;29(3):295-302
32. Choo A., Miller W., Chen Y., Nibley P., Patel T., Goletiani C., Morrison B., Kutzing M., Firestein B., Sul J., et al. (2013). Antagonism of purinergic signalling improves recovery from traumatic brain injury. *Brain*, 136, 65–80.
33. Clasadonte J, Haydon P. (2012). Astrocytes and epilepsy. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, eds Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV (Oxford Univ Press, New York), 4th Ed, pp 591–605.
34. Clasadonte J., Dong J., Hines, D., Haydon, P. (2013). Astrocyte control of synaptic NMDA receptors contributes to the progressive development of temporal lobe epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 110, 17540–17545.
35. Coppola A. & Moshé S. (2012). Animal models. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 107 (3rd series) Epilepsy, Part I
36. Corda M., Giorgi O., Longoni B., Orlandi M., Biggio G. (1990). Decrease in the Function of the γ -Aminobutyric Acid- Coupled Chloride Channel Produced by the Repeated Administration of Pentylentetrazol to Rats. *J Neurochem.* Oct;55(4):1216-21.
37. Corda M., Orlandi M., Lecca D., Carboni G., Frau V., Giorgi O. (1991). Pentylentetrazol-induced kindling in rats: effect of GABA function inhibitors. *Pharmacol Biochem Behav.* Oct;40(2):329-33.
38. Cortés-Campos C., Elizondo R., Llanos P., Uranga R., Nualart F., García M. (2011). MCT expression and lactate influx/efflux in tanyocytes involved in glia-neuron metabolic interaction. *PLoS One.* 2011 Jan 28; 6(1):e16411.

39. Curia G., Longo D., Biagini G., Jones R., Avoli M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods* 172 ; 143–157.
40. Dallerac G., Zapata J., Rouach N. (2018). Versatile control of synaptic circuits by astrocytes: Where, when and how? *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 729–743.
41. Davoudi M, Shojaei A, Palizvan MR, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J. (2013). Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylenetetrazol kindled seizures in the rat. *Epilepsy Res. Sep;106(1-2):54-63*
42. Delekate A., Fuchtemeier M., Schumacher T., Ulbrich C., Foddis M., Petzold G. (2014) Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat. Commun.* 5, 5422.
43. Dhir A. (2012). Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci;Chapter 9:Unit9.37*
44. Ding S. (2012). In vivo imaging of Ca²⁺ signaling in astrocytes using two-photon laser scanning fluorescent microscopy. *Methods Mol Biol.* 814:545-54.
45. Dobrunz L. & Stevens C. (1997). Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron.* Jun;18(6):995-1008.
46. Doi T., Ueda Y., Takaki M., Willmore L. (2011). Differential molecular regulation of glutamate in kindling resistant rats. *Brain Research*, 1375, 1–6.
47. Ekonomou A, Smith AL, Angelatou F. (2001). Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazole-induced 'kindling' model of epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res.* Nov 1;95(1-2):27-35.
48. Falco-Walter J.J., Scheffer I.E., Fisher R.S. (2018). The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* Jan; 139:73-79.

49. Falconer M., Serafetinides E., Corsellis J. (1964). Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 10: 233–248.
50. Fathollahi Y., Motamedi F., Semnani S., Zardoshti M. (1997). Examination of persistent effects of repeated administration of pentylenetetrazol on rat hippocampal CA1: evidence from in vitro study on hippocampal slices. *Brain Res.* 758, 92—98.
51. Fisher R., Van Emde Boas W., Blume W., et al. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46:470–472.
52. Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, J.H., Engel Jr., J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S., (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55 (4), 475–482.
53. Fisher R., Cross J., French J., Higurashi N., Hirsch E., Jansen F., Lagae L., Moshé S., Peltola J., Roulet Perez E., Scheffer I., Zuberi S. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. Apr;58(4):522-530.
54. Franke H. & Kittner H. (2001). Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats. *Pharmacol Biochem Behav.* Oct-Nov; 70(2-3):291-303.
55. Fuenzalida M, Aliaga E, Olivares V, Roncagliolo M, Bonansco C. (2009). Developmental increase of asynchronous glutamate release from hippocampal synapses in mutant taiep rat. *Synapse.* 63:502-509.

56. Giachello CN, Premoselli F, Montarolo PG, Ghirardi M. (2013). Pentylentetrazol-induced epileptiform activity affects basal synaptic transmission and short-term plasticity in monosynaptic connections. *PLoS One*. 8(2):e56968
57. Gilbert, M., Goodman, J., (2006). Chemical kindling. In: Pitkänen, A., Schwartzkroin, P.A., Moshé, S.L. (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 379—391.
58. Goldberg, E.M., and Coulter, D.A. (2013). Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 337–349.
59. Gorter J, van Vliet E. & Lopes da Silva F. (2015). Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models?. *J Neurosci Methods*. Feb 15;260:96-108.
60. Goudarzi E, Elahdadi Salmani M, Lashkarbolouki T, Goudarzi I. (2015). Hippocampal orexin receptors inactivation reduces PTZ induced seizures of male rats. *Pharmacol Biochem Behav*. Mar;130:77-83
61. Goussakov I., Fink K., Elger C., Beck H. (2000). Metaplasticity of Mossy Fiber Synaptic Transmission Involves Altered Release Probability. *Journal of Neuroscience*, May, 20(9): 3434-3441.
62. Gowers W. (1881) *Epilepsy and Other Chronic Convulsive Diseases*. Wood, London.
63. Grecksch G, Becker A, Rauca C. (1997). Effect of age on pentylentetrazol-kindling and kindling-induced impairments of learning performance. *Pharmacol Biochem Behav*. Apr;56(4):595-601.
64. Gröticke I., Hoffmann K., Löscher W. (2007). Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Experimental Neurology* 207 ; 329–349

65. Habbas S., Santello M., Becker D., Stubbe H., Zappia G., Liaudet N., Klaus F., Kollias G., Fontana A., Pryce C., Suter T., Volterra A. (2015). Neuroinflammatory TNF α Impairs Memory via Astrocyte Signaling. *Cell*. Dec 17;163(7):1730-41
66. Hansen SL., Sperling BB., Sánchez C. (2004). Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Jan;28(1):105-13.
67. Haydon, P., & Carmignoto G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiological Reviews*, 86, 1009–1031.
68. Herman ST. (2002). Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. *Neurology*. Nov 12;59(9 Suppl 5):S21-6.
69. Heuser K., Nome C., Pettersen K., Abjorsbraten K., Jensen V., Tang W., Sprengel R., Tauboll E., Nagelhus E., Enger R. (2018). Ca²⁺ signals in astrocytes facilitate spread of epileptiform activity. *Cereb. Cortex* 28, 4036–4048.
70. Hildebrandt F. (1926). Pentamethyltetrazol (Cardiazol). I. Mitteilung. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Exp Pathol Pharmacol* 116:100–109
71. Huang LT., Yang SN., Liou CW., Hung PL., Lai MC., Wang CL., Wang TJ. (2002). Pentylenetetrazol-induced recurrent seizures in rat pups: time course on spatial learning and long-term effects. *Epilepsia*. Jun,43(6):567-73.
72. Jacobs M, Leblanc G, Brooks-Kayal A, Jensen F, Lowenstein D, Noebels J, Spencer D, Swann J. (2009). Curing epilepsy: Progress and future directions. *Epilepsy Behav*. Mar; 14(3): 438.
73. 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).
74. Kafitz KW, Meier SD, Stephan J, Rose CR. (2008). Developmental profile and properties of sulforhodamine 101--Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *J Neurosci Methods*. Mar 30;169(1):84-92
 75. Khakh B. & Sofroniew M. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat. Neurosci*. 18, 942–952.
 76. Kamphuis W., De Rijk T., Talamini L., Lopes da Silva F. (1994). Rat hippocampal kindling induces changes in the glutamate receptor mRNA expression patterns in dentate granule neurons, *Eur. J. Neurosci*. 1119–1127.
 77. Kandratavicius L., Balista P., Lopes-Aguiar C., Ruggiero R., Umeoka E., Garcia-Cairasco N., Bueno-Junior L., Leite J. (2014). Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*. Sep 9;10:1693-705.
 78. Koizumi S. (2010). Synchronization of Ca²⁺ oscillations: Involvement of atp release in astrocytes. *FEBS J*. 277, 286–292.
 79. Koshal P, Kumar P. (2016). Neurochemical modulation involved in the beneficial effect of liraglutide, GLP-1 agonist on PTZ kindling epilepsy-induced comorbidities in mice. *Mol Cell Biochem*. Apr;415(1-2):77-87
 80. Kuboyama K., Harada H., Tozaki-Saitoh H., Tsuda M., Ushijima K., Inoue K. (2011). Astrocytic P2y(1) receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 31, 1930–1941.

81. Leung L. & Au A. (1994). Long-term potentiation as a function of test pulse intensity: a study using input/output profiles. *Brain Res. Bull.* 33 453–460
82. Liu X, Wu Y, Huang Q, Zou D, Qin W, Chen Z. (2015). Grouping Pentylenetetrazol-Induced Epileptic Rats According to Memory Impairment and MicroRNA Expression Profiles in the Hippocampus. *PLoS One.* 10(5): e0126123.
83. Löscher W., Dekundy A., Nagel J., Danysz W., Parsons C., Potschka H. (2006). mGlu1 and mGlu5 receptor antagonists lack anticonvulsant efficacy in rodent models of difficult-to-treat partial epilepsy. *Neuropharmacology.* Jun;50(8):1006-15. Epub 2006 Mar 24.
84. Löscher W. (2009). Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *European Journal of Pharmacology* 610 ; 1–11
85. Löscher W. & Brandt, C. (2010) Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol. Rev.*,62, 668–700.
86. Löscher W. (2017). Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res.* Jul;42(7):1873-1888
87. Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaaar G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav.* Dec 7;98(5):579-86
88. Ma X, Liu G, Wang S, Chen Z, Lai M, Liu Z, Yang J. (2007). Evaluation of sphingolipids changes in brain tissues of rats with pentylenetetrazol-induced kindled seizures using MALDI-TOF-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Nov15;859(2):170-7
89. Mazzuferi M., Kumar G., Rospo C., Kaminski R. (2012). Rapid epileptogenesis in the mouse pilocarpine model: Video-EEG, pharmacokinetic and histopathological characterization. *Experimental Neurology* 238 ; 156–167

90. McCormick, D.A., and Contreras, D. (2001). On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 815–846.
91. McNamara J, Byrne M, Dasheiff R, Fitz J. (1980). The kindling model of epilepsy: a review. *Prog Neurobiol.* 15(2):139-59.
92. Ministerio de salud. (2014). Guía clínica epilepsia en el adulto.
93. Morales J., Álvarez-Ferradas C., Roncagliolo M, Fuenzalida M., Wellmann M., Nualart F., Bonansco C. (2014). A new rapid kindling variant for induction of cortical epileptogenesis in freely moving rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, July. Volume 8; 200.
94. Morimoto K., Fahnestock M., Racine R. (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in Neurobiology* 73 ; 1–60.
95. Morrisett R., Chow C., Nadler J., McNamara J.(1989). Biochemical evidence for enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate in the hippocampal formation of kindled rats, *Brain Res.* 496. 25 – 28
96. Nagaraja R., Grecksch G., Reymann K., Schroeder H., Becker A. (2004) Group I metabotropic glutamate receptors interfere in different ways with pentylenetetrazole seizures, kindling, and kindling-related learning deficits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Jul;370(1):26-34. Epub 2004 Jul 6.
97. Navarrete M, Araque A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57:883-893.
98. Nikolic L., Shen W., Nobili P., Virenque A., Ulmann L., Audinat E. (2018). Blocking TNF α -driven astrocyte purinergic signaling restores normal synaptic activity during epileptogenesis. *Glia.* Dec;66(12):2673-2683

99. Notenboom R., Hampson D., Jansen G., van Rijen P., van Veelen C., van Nieuwenhuizen O., de Graan P. (2006). Up-regulation of hippocampal metabotropic glutamate receptor 5 in temporal lobe epilepsy patients. *Brain*. Jan;129(Pt 1):96-107
100. Oberheim N., Tian G., Han X., Peng W., Takano T., Ransom B., Nedergaard M. (2008). Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci*, Mar 26;28(13):3264-76.
101. Palizvan M., Fathollahi Y., Semnani S., Hajezadeh S., Mirnajafizadh J. (2001). Differential effects of pentylenetetrazol-kindling on long-term potentiation of population excitatory postsynaptic potentials and population spikes in the CA1 region of rat hippocampus. *Brain Res*. Apr 13;898(1):82-90.
102. Parpura, V., and Haydon, P.G. (2009). *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System* (Boston, MA: Springer US).
103. Pascual O., Ben Achour S., Rostaing P., Triller A., Bessis A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci USA*. Jan 24;109(4):E197-205
104. Parpura V. & Verkhratsky A. (2012). The astrocyte excitability brief: from receptors to gliotransmission. *Neurochem. Int.* 61, 610–621.
105. Pavlov I. & Walker M. (2013). Tonic GABA(A) receptor-mediated signalling in temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology*. Jun;69:55-61.
106. Pekny M. & Nilsson M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. Jun;50(4):427-34.
107. Pitkänen A. (2002). Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis: animal data. *Neurology*. Nov 12;59(9 Suppl 5):S27-33

108. Pitkänen A., Schwartzkroin P., & Moshé S. (2006) in *Models of Seizures and Epilepsy*. xvii Academic Press.
109. Pitkänen A, Kharatishvili I, Karhunen H, Lukasiuk K, Immonen R, Nairismägi J, Gröhn O, Nissinen J. (2007). Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia*. 48 Suppl 2:13-20.
110. Pitkänen A, Lukasiuk K. (2009). Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav*. Jan;14 Suppl 1:16-25
111. Postnikova T. et al. (2009). Changes in Functional Properties of Rat Hippocampal Neurons Following Pentylentetrazole-induced Status Epilepticus. *Neuroscience* <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.029>
112. Racine R. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II Motor seizure. *Electroenceph, clin. Neurophysiol*. 32:281-294
113. Rattka M, Brandt C, Löscher W. (2012). Do proconvulsants modify or halt epileptogenesis? Pentylentetrazole is ineffective in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci*. Aug;36(4):2505-20
114. Rehni AK, Singh TG, Kalra R, Singh N. (2009). Pharmacological inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates the development of seizures in mice. *Nitric Oxide*. Sep;21(2):120-5.
115. Robinson G., Scwabassi R., Berger T. (1991). Kindling-induced potentiation of excitatory and inhibitory inputs to hippocampal dentate granule cells. I. Effects on linear and non-linear response characteristics. *Brain Res*. 562, 17—25.
116. Rossi D. & Volterra A. (2009). Astrocytic dysfunction: Insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res. Bull*. 80, 224–232.

117. Rothstein J., Dykes-Hoberg M., Pardo C., Bristol L., Jin L., Kuncl R., Kanai Y., Hediger M., Wang Y., Schielke J., Welty D. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675–686.
118. Rüthrich H, Grecksch G, Krug M. (2001). Development of long-lasting potentiation effects in the dentate gyrus during pentylenetetrazol kindling. *Int J Dev Neurosci.* Jun;19(3):247-54.
119. Santello M., Bezzi P., Volterra A. (2011). TNF α controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron.* Mar 10;69(5):988-1001
120. Scheffer I., Berkovic S., Capovilla G., Connolly M., French J., Guilhoto L., Hirsch E., Jain S., Mathern G., Moshé S., Nordli D., Perucca E., Tomson T., Wiebe S., Zhang Y., Zuberi S. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* Apr;58(4):512-521.
121. Schroeder H., Becker A., Hoell V. (1998b). Sensitivity and density of glutamate receptor subtypes in the hippocampal formation are altered in pentylenetetrazole-kindled rats. *Exp Brain Res* 120:527–530
122. Schroeder H., Becker A., Schroeder U., Hoell V. (1999). 3H-Lglutamate binding and 3H-D-aspartate release from hippocampal tissue during the development of pentylenetetrazole kindling in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 62:349–352
123. Seifert G., Schilling K., Steinhäuser C. (2006). Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 194–206.
124. Shimada T. & Yamagata K. (2018). Pentylenetetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *J Vis Exp.* Jun 12;(136).

125. Shigetomi E., Hirayama Y., Ikenaka K., Tanaka K., Koizumi S. (2018) Role of purinergic receptor P2Y1 in spatiotemporal Ca(2+) dynamics in astrocytes. *J. Neurosci.* 38, 1383–1395.
126. Shigetomi E., Saito K., Sano F., Koizumi S. (2019). Aberrant Calcium Signals in Reactive Astrocytes: A Key Process in Neurological Disorders. *Int J Mol Sci.* Feb 25;20(4).
127. Staley, K. (2015). Molecular mechanisms of epilepsy. *Nat. Neurosci.* 18, 367–372.
128. Sun W., McConnell E., Pare J., Xu Q., Chen M., Peng W., Lovatt D., Han X., Smith Y., Nedergaard M. (2013). Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science* 339, 197–200.
129. Thom M. (2004). Recent advances in the neuropathology of focal lesions in epilepsy. *Expert Rev Neurother.* Nov;4(6):973-84.
130. Thom M., Eriksson S., Martinian L. et al. (2009). Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features. *J Neuropathol Exp Neurol* 68: 928–938.
131. Tian G., Azmi H., Takano T., Xu Q., Peng W., Lin J., Oberheim N., Lou N., Wang X., Zielke H. (2005). An astrocytic basis of epilepsy. *Nat. Med.* 11, 973–981.
132. Timofeev, I., Bazhenov, M., Seigneur, J., and Sejnowski, T. (2012). Neuronal Synchronization and Thalamocortical Rhythms in Sleep, Wake and 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).

133. Vasil'ev DS, Tumanova NL, Lavrent'eva VV, Starshinova LA, Zhabko EP, Lukomskaia NIa, Zhuravin IA, Magazanik LG. (2013). The ability of NMDA glutamate receptor blockers to prevent a pentylenetetrazole kindling in mice and morphological changes in the hippocampus. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. Sep;99(9):1023-35.
134. Velisek L. (2006). Models of chemically-induced acute seizures. In: A Pitkänen, PA Schwartzkroin, SL Moshe´ (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, pp. 127–152.
135. Verkhratsky A. & Nedergaard M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiol. Rev.* 98, 239–389
136. Volterra A., Liaudet N., Savtchouk I. (2014). Astrocyte Ca²⁺ signalling: an unexpected complexity. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 327–335..
137. Walker MC, White HS, Sander JW. (2002) Disease modification in partial epilepsy. *Brain*. Sep;125(Pt 9):1937-50.
138. Watanabe T., Morimoto K., Hirao T., Suwaki H., Watase K., Tanaka K. (1999). Amygdala-kindled and pentylenetetrazole-induced seizures in glutamate transporter GLAST-deficient mice. *Brain Res.* 845, 92–96.
139. Wei D., Yang F., Wang Y., Yang F., Wu C., Wu S., Jiang W. (2015). Degeneration and regeneration of GABAergic interneurons in the dentate gyrus of adult mice in experimental models of epilepsy. *CNS Neurosci Ther.* Jan;21(1):52-60.
140. Wetherington J., Serrano G., Dingledine R. (2008). Astrocytes in the Epileptic Brain. *Neuron*, Apr 24; 58(2): 168–178.

141. Wieser H., ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy (2004). ILAE Commission report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 45: 695–714.
142. Wilcox K., Gee J., Gibbons M., Tvrđik P., White J. (2015). Altered structure and function of astrocytes following status epilepticus. *Epilepsy Behav.* 2015 Aug;49:17-9.
143. Zhang Z., Chen G., Zhou W., Song A., Xu T., Luo Q., Wang W., Gu X., Duan, S. (2007). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 9, 945–953.
144. Zorec R., Araque A., Carmignoto G., Haydon P., Verkhratsky A., Parpura, V. (2012). Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro* 4.
145. Zucker R., Wade R. (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64:355–405