

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

Implicación de la actividad glial en el desarrollo de la epileptogénesis mediante estudios longitudinales de neuroimagen PET

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Nira Hernández Martín

DIRECTORES

Miguel Ángel Pozo García  
Eduardo Daniel Martín Montiel

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

IMPLICACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLIAL EN EL DESARROLLO DE LA  
EPILEPTOGÉNESIS MEDIANTE ESTUDIOS LONGITUDINALES DE NEUROIMAGEN  
PET

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

NIRA HERNÁNDEZ MARTÍN

DIRECTORES

Prof. Dr. MIGUEL ÁNGEL POZO GARCÍA  
Dr. EDUARDO DANIEL MARTÍN MONTIEL



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

IMPLICACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLIAL EN EL DESARROLLO DE LA  
EPILEPTOGÉNESIS MEDIANTE ESTUDIOS LONGITUDINALES DE NEUROIMAGEN  
PET

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

NIRA HERNÁNDEZ MARTÍN

DIRECTORES

Prof. Dr. MIGUEL ÁNGEL POZO GARCÍA  
Dr. EDUARDO DANIEL MARTÍN MONTIEL

INSTITUTO PLURIDISCIPLINAR

DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA





*A la memoria de mi tío,  
Juan Carlos Martín Martín  
y de mi amiga,  
Beatriz Lima Cruz*



# AGRADECIMIENTOS

---

Quiero comenzar agradeciendo a mis directores, Miguel Ángel Pozo y Eduardo D. Martín, el valor incalculable del aprendizaje que me han otorgado desde aquel día (allá por 2016) en el que una clase sobre epilepsia me hizo acercarme para saber más y, sin esperarlo, acabar realizando una tesis doctoral sobre esta patología. Durante todos estos años me han acompañado paso a paso, no sólo instruyéndome y regalándome un conocimiento inconmensurable, sino también apoyándome y alentándome en mi camino hacia la investigación científica. Por todo esto y por la libertad, gracias.

También quiero agradecer a la gente del Instituto Pluridisciplinar, el *Pluri*, que han disfrutado y sufrido conmigo en el desarrollo de este trabajo. A Rubén Fernández de la Rosa, la figura central de mi vida en el Pluri, que desde el primer momento me “adoptó” y me enseñó cosas de la ciencia y cosas de la vida. Gracias por instruirme con tu infinita paciencia, por las charlas en las tardes, por los sustos, por las miradas cómplices, por las risas inoportunas en momentos inadecuados, por el apoyo que me has dado en los momentos críticos y por celebrar conmigo cada pequeño éxito que obtenía. A Pablo Bascañana, que en estos dos últimos años, y de forma desinteresada, ha sacudido mis resultados, refutado mis hipótesis y terminado nuestras discusiones haciéndome aceptar que yo no tengo la razón (aunque eso me fastidie). Con todo, las nuevas perspectivas que me ha brindado no han hecho nada más que estimular mi pensamiento científico y renovar mi pasión por la investigación. Sin su ayuda y sugerencias esta tesis no hubiera sido lo mismo, pero es que, además, tengo que agradecerle el que se haya comportado como un amigo y me haya surtido de dulces caseros. Parte de la responsabilidad de esto último la tiene Mirjam Brackhan, a la que también agradezco su supervisión en el inglés, los trucos técnicos que me enseñó y toda la disponibilidad que me ha ofrecido. También a Blanca, por las horas que pasó a mi lado ayudándome con el cuidado de la estética de esta tesis: si les parece bonita, es gracias a ella. A Adriana Párraga, por todo el cariño y las horas que se dedicó a mirar señales de EEG a mi lado. Y a la gente del CAI de Resonancia, en especial a Palmira Villa, que tanto me ha ayudado con los experimentos de HR-MAS.

A María Gómez, que llegó al Pluri y luego se fue, pero yo me quedé con la hermana que nunca tuve. Porque estuviste conmigo en gran parte de mi tesis y me apoyaste siempre, porque sé las ganas que tenías de ver esto escrito por fin y por lo que trabajaste a mi lado para conseguirlo. Por enorgullecerte de mí, como yo lo estoy de ti, y lo lejos que vamos a llegar caminado juntas aunque estemos lejos. A los psicólogos de Cartografía Cerebral: a Eva Moreno por sus consejos, su templanza y su risa; a Verónica Romero por su disponibilidad, su curiosidad contagiosa y su ejemplo; a Pablo Rodríguez por su tranquila profesionalidad, por su acento y sus repeticiones.

Gracias a los tres por haber estado ahí, por las sobremesas eternas y el té en el jardín, porque pude contar con ellos para cualquier cosa que necesitaba. A Guillermo Santamaría, por estar ahí en mis inicios, pasando horas oscuras en el microscopio escuchando “*Girls just wanna have fun*” y haberme ayudado en todos los experimentos durante su tiempo en el Pluri, señalándome lo que no es criterio. Toda esta gente me ha enseñado que la ciencia es más bonita con un buen amigo al lado.

A mis compañeros del máster en Neurociencia, que desde que lo empezamos hace 8 años se han ligado irremediamente a mi desarrollo científico. Podrían haberse quedado en eso, en compañeros, pero son los mejores amigos que podría haber encontrado en Madrid. A Ágata Silván, por todo lo que compartimos en el Pluri, cuando éramos novatas y soñadoras, y en la URJC, cuando ya teníamos experiencia pero soñábamos diferente. Por la inspiración que siempre has sido para mí y por la amistad sincera y entregada que me brindas. A Elena Moreno por su lealtad, a Rebeca Gavrila por su optimismo, a Ana Cristina Ojalvo por su eficiencia (y por colarme en el confocal), a Candela González por su constancia, Santiago Guerra por su estoicismo y a Miguel Fernández por su templanza. Por compartir charlas, casas rurales, excursiones, *escape rooms* y meriendas. Por la red de apoyo y el equipo que hemos formado y por el orgullo que siento al tener semejantes profesionales como amigos.

Debo agradecer a la gente de la URJC por los dos años que investigué allí. A Teresa Fernández-Agulló, Nuria Lauzurica y Miriam García por todo lo que aprendí con ellas, en todos los sentidos. A Elia Escasany, a Almudena G. Carrasco y María Gutiérrez por ser mujeres fuertes y supervivientes, y referentes para mí. Porque siempre sacan toda la energía del mundo para apoyar a la que lo necesite. Para que siempre nos quede tiempo para un proyecto, un café y un desahogo.

Agradezco y dedico esta tesis a mis padres, porque siempre me han apoyado de forma incondicional y se han desvivido por darme lo necesario para llegar donde hoy estoy. Por preocuparse si trabajo demasiado, pero confiar en mí cuando les aseguro que estoy en el camino correcto. Por las veces que me han dicho “a ver cuando terminas eso ya, para que te quedes tranquila, mi niña” y yo no he tenido el valor de confesarles que esto no acaba aquí, que sólo estoy empezando. Porque, en esta tesis, el resultado más importante para ellos es que yo sea feliz, y eso les basta y les sobra. Porque aunque haya distancia de por medio, les llevo dentro en todo momento, igual que ellos a mí.

Y por último, doy las gracias a Ángel Damián Arbelo, mi compañero de vida. Por lanzarse a la aventura cuando quise volar y ayudarme a no rendirme nunca. Por su apoyo y su inspiración. Por celebrar mis éxitos como si fueran suyos. Por su paciencia, su amabilidad y generosidad durante estos años. Por toda la alegría que me da incluso en los días malos. Por su música. Por la vida que me regala. En definitiva: por todo el amor.

# ÍNDICE

---

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	I
<b>ÍNDICE</b>	III
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	VII
<b>ACRÓNIMOS</b>	IX
<b>RESUMEN</b>	XI
<b>ABSTRACT</b>	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Epilepsia</b>	<b>1</b>
1.1.1. Caracterización de la epilepsia	3
1.1.2. Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT)	4
1.1.3. Epileptogénesis	6
1.1.4. Investigación en epilepsia: Modelos animales	8
<b>1.2. Neuroimagen por Tomografía de Emisión de Positrones (PET)</b>	<b>11</b>
1.2.1. Características de la técnica PET	11
1.2.2. Imagen PET en epilepsia	15
<b>1.3. Astrocitos en la epilepsia</b>	<b>18</b>
1.3.1. Excitabilidad y plasticidad sináptica	18
1.3.2. Disrupción de la BHE y neuroinflamación	20
1.3.3. Metabolismo cerebral	21
1.3.4. Manipulación selectiva de astrocitos	24
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Animales de experimentación</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Preparaciones quirúrgicas</b>	<b>34</b>
3.2.1. Infecciones virales	34
3.2.2. Inducción de la epilepsia	35
3.2.3. Implantación de electrodo	36
3.2.4. Implantación de fibra óptica	37

<b>3.3. Tratamientos</b>	<b>38</b>
3.3.1. Diazepam	38
3.3.2. Quimiogenética	38
3.3.3. Optogenética	39
<b>3.4. Neuroimagen <sup>18</sup>F-FDG PET</b>	<b>40</b>
3.4.1. Estudios dinámicos	40
3.4.2. Estudios estáticos	40
<b>3.5. Electrofisiología <i>in vivo</i></b>	<b>41</b>
<b>3.6. Paradigma conductual</b>	<b>43</b>
3.6.1. Laberinto en T	43
3.6.2. Test de rotarod	44
<b>3.7. Técnicas histológicas</b>	<b>44</b>
3.7.1. Tinción de Nissl	45
3.7.2. Tinción con Fluoro-Jade C	45
3.7.3. Inmunofluorescencia	45
3.7.4. Autorradiografía <i>in vitro</i>	46
<b>3.8. Estudios de RMN HR-MAS</b>	<b>46</b>
<b>3.9. Análisis de datos</b>	<b>47</b>
3.9.1. Análisis de la imagen PET	47
3.9.2. Análisis de la señal EEG	48
3.9.3. Análisis del paradigma cognitivo	49
3.9.4. Análisis de HR-MAS 1H RMN	49
3.9.5. Análisis histológico	50
3.9.6. Análisis autorradiográfico	51
3.9.7. Análisis estadístico	51
3.9.8. Consideraciones metodológicas	52
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Estudio del metabolismo de la glucosa cerebral tras la activación de los astrocitos</b>	<b>55</b>
4.1.1. La activación de los astrocitos a través de DREADDs aumenta el metabolismo de la glucosa cerebral	55
4.1.2. El aumento del metabolismo provocado por la activación de los astrocitos está mediado por el calcio intracelular a través de Ip3r2	60
4.1.3. El efecto metabólico provocado por la activación de los astrocitos es independiente del transportador GLUT1	62
4.1.4. La activación de los astrocitos modifica el perfil metabólico en el hipocampo	65

<b>4.2. Efectos metabólicos durante epileptogénesis promovida por el <i>Status Epilepticus</i></b>	<b>69</b>
4.2.1. La actividad epileptiforme tras el SE se correlaciona con un hipometabolismo cerebral	69
4.2.2. La supresión farmacológica del SE modifica el patrón metabólico inducido por KA	71
4.2.3. El DZP no previene la muerte neuronal en el modelo de epilepsia	74
<b>4.3. Reversión del cambio metabólico durante la epileptogénesis tras la activación de los astrocitos</b>	<b>80</b>
4.3.1. La activación quimiogénica de los astrocitos revierte el patrón metabólico tras el SE	80
4.3.2. La activación quimiogénica de los astrocitos reduce el deterioro en la memoria espacial asociados al KA	82
4.3.3. La activación de los astrocitos modifica el EEG movilizando calcio a través de Ip3r2	84
4.3.4. La activación optogénica de los astrocitos revierte el patrón metabólico en el modelo de epilepsia por KA	86
<b>4.4. Efecto neuroprotector de la activación de los astrocitos en la epileptogénesis</b>	<b>89</b>
4.4.1. La activación de los astrocitos con quimiogénica protege de la pérdida neuronal inducida por KA a los 9 días	89
4.4.2. La activación de los astrocitos con quimiogénica protege de la pérdida neuronal inducida por KA a los 29 días	97
4.4.3. La activación de los astrocitos con optogénica protege de la pérdida neuronal inducida por KA a los 9 días	99
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>105</b>
<b>5.1. El efecto de la activación de los astrocitos en el metabolismo cerebral</b>	<b>105</b>
<b>5.2. El rol de los astrocitos en la epileptogénesis</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>123</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.1. Clasificación de los tipos de crisis y epilepsias.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 1.2. Desorganización del giro dentado en la ELT.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 1.3. Alteraciones durante el progreso de la epileptogénesis.....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 1.4. Representación de la temporalidad de los modelos de epilepsia.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 1.5. Representación de la aniquilación de un positrón.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 1.6. Representación de los tipos de evento detectados en el PET.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 1.7. Esquema de la incorporación de <sup>18</sup>F-FDG en las células.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 1.8. Esquema del metabolismo de <sup>18</sup>F-FDG en el modelo de 2 compartimentos.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 1.9. Imagen cerebral de <sup>18</sup>F-FDG PET en un paciente con epilepsia.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 1.10. Representación del papel de los astrocitos en la epilepsia.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 1.11. Representación de diferentes receptores para quimiogénica y optogénica, sus ligandos y su efecto celular.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 2.1. Resumen de la implicación de los astrocitos en la epilepsia.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 3.1. La escala de Racine.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 3.2. Representación esquemática de los procedimientos quirúrgicos.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 3.3. Esquema del tratamiento con quimiogénica.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 3.4. Esquema del tratamiento con optogénica.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 3.5. Método de los estudios de imagen PET.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 3.6. Esquema del tratamiento en los experimentos de electrofisiología.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 3.7. Prueba de laberinto en T.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 4.1. Valoración del éxito de la infección vírica.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 4.2. Curvas de incorporación <sup>18</sup>F-FDG en el tiempo tras la inyección de CNO o CZP.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 4.3. Representación de las constantes del modelo 2TC tras la activación de astrocitos en ratón CD1.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 4.4. Representación de las constantes de la cinética de la glucosa en el ratón C57BL/6J WT tras la activación de astrocitos.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 4.5. Estudios estáticos tras la activación de astrocitos en el ratón C57BL/6J.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 4.6. Representación de las constantes de la cinética de la glucosa en el ratón Ip3r2<sup>-/-</sup> tras la activación de astrocitos.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 4.7. Estudios estáticos tras la activación de astrocitos en el ratón Ip3r2<sup>-/-</sup>.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 4.8. Representación de las constantes de la cinética de la glucosa en los ratones GLUT1<sup>ΔGFAP</sup> tras la activación de astrocitos.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 4.9. Estudios estáticos tras la activación de astrocitos en el ratón GLUT1<sup>ΔGFAP</sup>.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 4.10. Representación del espectro para tejido cerebral.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 4.11. Gráfica PLS de comparación entre tratamiento salino y CNO.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 4.12. Cuantificación de la concentración de metabolitos tras la activación de los astrocitos.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 4.13. Correlación de los niveles de metabolitos con los datos PET.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 4.14. Cuantificación de la imagen <sup>18</sup>F-FDG PET en las concentraciones de 2 mM y 1 mM de KA a los 8 y 14 días.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 4.15. Estudios PET de las diferentes concentraciones de KA para el modelo de epilepsia.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 4.16. Estudio EEG de diferentes concentraciones de KA para el modelo de epilepsia.....</i>	<i>71</i>

<i>Figura 4.17. Cuantificación de la imagen <sup>18</sup>F-FDG PET en el modelo de KA al día 1 y 8 tras la administración de DZP.</i>	72
<i>Figura 4.18. Estudios PET tras extinguir el SE con DZP en el modelo de KA.</i>	73
<i>Figura 4.19. Valoración de la desestructuración de los hipocampos en el modelo de epilepsia tras tratamiento con DZP.</i>	74
<i>Figura 4.20. Muerte neuronal en el modelo epiléptico tras el tratamiento con DZP.</i>	75
<i>Figura 4.21. Neurodegeneración en el modelo epiléptico tras el tratamiento con DZP.</i>	76
<i>Figura 4.22. Astrogliosis en el modelo epiléptico tras el tratamiento con DZP.</i>	77
<i>Figura 4.23. Correlaciones entre la imagen PET y la cuantificación inmunohistoquímica.</i>	78
<i>Figura 4.24. Correlación de la imagen PET e inmunofluorescencia entre los grupos con epilepsia tras el tratamiento con DZP.</i>	79
<i>Figura 4.25. Estudios PET tras la activación de astrocitos con quimiogenética en el modelo de KA.</i>	81
<i>Figura 4.26. Cuantificación de la imagen <sup>18</sup>F-FDG PET en el modelo de KA al día 1 y 8 tras la activación de los astrocitos con quimiogenética.</i>	82
<i>Figura 4.27. Análisis del comportamiento en el laberinto en T.</i>	83
<i>Figura 4.28. Análisis de la prueba Rotarod.</i>	84
<i>Figura 4.29. Análisis de señal EEG tras tratamiento con quimiogenética en el día 7 post KA.</i>	85
<i>Figura 4.30. Análisis de señal EEG tras tratamiento con quimiogenética en el día 29 post KA.</i>	86
<i>Figura 4.31. Cuantificación de la imagen <sup>18</sup>F-FDG PET en el modelo de KA al día 1 y 8 tras la activación de los astrocitos con optogenética.</i>	87
<i>Figura 4.32. Efectos de la estimulación optogenética en el metabolismo cerebral.</i>	88
<i>Figura 4.33. Inmunofluorescencia de NeuN tras el tratamiento con quimiogenética.</i>	90
<i>Figura 4.34. Tinción de FJC tras el tratamiento con quimiogenética.</i>	91
<i>Figura 4.35. Inmunofluorescencia contra GFAP tras el tratamiento con quimiogenética.</i>	92
<i>Figura 4.36. Autorradiografía contra TSPO (neuroinflamación) tras 7 días de tratamiento con quimiogenética.</i>	94
<i>Figura 4.37. Correlaciones entre el metabolismo cerebral y la inmunofluorescencia tras el tratamiento con quimiogenética.</i>	95
<i>Figura 4.38. Correlación de la imagen PET e inmunofluorescencia entre los grupos con epilepsia tras la activación de astrocitos con quimiogenética.</i>	96
<i>Figura 4.39. Inmunofluorescencia contra NeuN y GFAP tras el tratamiento con quimiogenética al día 29 post SE.</i>	97
<i>Figura 4.40. Autorradiografía de <sup>3</sup>H-PK11195 el día 29 post SE.</i>	98
<i>Figura 4.41. Inmunofluorescencia tras el tratamiento de optogenética al día 7 post SE.</i>	99
<i>Figura 4.42. Autorradiografía de <sup>3</sup>H-PK11195 tras el tratamiento con optogenética.</i>	100
<i>Figura 4.43. Correlaciones entre el metabolismo cerebral y la inmunofluorescencia tras el tratamiento con optogenética.</i>	101
<i>Figura 5.1. La activación de astrocitos aumenta el consumo de <sup>18</sup>F-FDG a través de la movilización de calcio mediada por I<sub>p</sub>3r2 y el transportador de glucosa GLUT1.</i>	110
<i>Figura 5.2. La activación de astrocitos durante la epileptogénesis recupera el metabolismo cerebral y la muerte neuronal.</i>	116

# ACRÓNIMOS

---

**<sup>18</sup>F-FDG** <sup>18</sup>F-fluoro-2-desoxi-D-glucosa

**2TC** 2 compartimentos, del inglés *2 Tissue Compartment*

**AMPA** Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

**ATP** Adenosin trifosfato

**BHE** Barrera hematoencefálica

**BSA** Albúmina de suero bovino, del inglés *Bovine Serum Albumin*

**CB** Cerebelo

**CE** Crisis espontáneas

**CNO** Clozapina-N-óxido

**CT** Tomografía computarizada, del inglés *Computed Tomography*

**CZP** Clozapina

**DI** Dosis inyectada

**DP** Densidad de potencia

**DREADDs** Receptores diseñados para activarse exclusivamente con fármacos diseñados, del inglés *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*

**DZP** Diazepam

**EEG** Electroencefalografía

**EH** Esclerosis hipocampal

**ELT** Epilepsia del lóbulo temporal

**FJC** Fluor jade C

**GABA** Ácido  $\gamma$ -aminobutírico, del inglés  *$\gamma$ -Aminobutyric Acid*

**GD** Giro dentado

**GFAP** Proteína ácida fibrilar glial, del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*

**GFP** Proteína verde fluorescente del inglés, *Green Fluorescent Protein*

**GLUT1** Transportador de glucosa 1

**GLUT3** Transportador de glucosa 3

**GPCR** Receptores acoplados a proteínas G, del inglés *G Protein-Coupled Receptors*

**hm3Dr** Receptor M3 muscarínico humano, del inglés *Human M3 Muscarinic Receptor*

**HR-MAS** Ángulo mágico giratorio de alta resolución del inglés *High-resolution magic angle spinning*

**iHPC** Intra-hipocampal

**Ip3** inositol 1,4,5-trifosfato / **Ip3r2** Receptor Ip3 tipo 2

**KA** Ácido kaínico, del inglés *Kainic Acid*

**MLN** Melanopsina

**NMDA** Ácido N-metil-D-aspartato, del inglés *N-Methyl-D-Aspartate Acid*

**PBR** Receptor de benzodiazepina periférico, del inglés *Peripheral Benzodiazepine Receptor*

**PBS** Tampón fosfato salino, del inglés *Phosphate Buffered Saline*

**PET** Tomografía por emisión de positrones, del inglés *Positron Emission Tomography*

**RMN** Resonancia Magnética Nuclear

**ROI** Región de interés, del inglés *Region Of Interest*

**SAL** Tratamiento con solución salina

**SE** Estado epiléptico, del latín *Status Epilepticus*

**SPM** Mapa paramétrico de estadística, del inglés *Statistical Parametric Mapping*

**TBS** Tampón tris-salino, del inglés *Tris Buffered Saline*

**TSPO** Proteína translocadora del inglés *Translocator Protein*

**VEH** Vehículo

**VOI** Volumen de interés, del inglés *Volume Of Interest*

**WT** Ratón silvestre o común, del inglés *Wild Type*

# RESUMEN

---

La epilepsia es un trastorno crónico, caracterizado clínicamente por la ocurrencia de crisis espontáneas (CE) recurrentes, que afecta a alrededor del 2% de la población mundial. La epilepsia está lejos de ser una enfermedad única y bien caracterizada, ya que incluye varios síndromes epilépticos, pero una de las más comunes es la epilepsia del lóbulo temporal (ELT). La ELT suele estar asociada a la farmacorresistencia, ya que el 40% de los pacientes que la padecen no responden a los fármacos anticonvulsivos. Otro de los rasgos de la ELT, que también se asocia a la farmacorresistencia, es la esclerosis hipocampal, caracterizada por la muerte neuronal, gliosis reactiva y cicatrices gliales en esta área cerebral. Las células gliales, y en particular los astrocitos, presentan cambios fisiológicos y moleculares en las áreas esclerotizadas que parecen estar asociados al desarrollo de una red neuronal hiperexcitable que genera CE. Los avances en el estudio de la epilepsia han sido restringidos por el poco entendimiento del proceso del desarrollo de la enfermedad, o epileptogénesis, motivo por el cual aún no se han encontrado tratamientos capaces de prevenir el desarrollo de la patología tras un evento potencialmente epileptógeno. Esto señala la importancia de renovar la perspectiva terapéutica en esta enfermedad y encontrar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas para estudiar la epilepsia. El metabolismo cerebral de la glucosa ha demostrado ser un potente biomarcador para evaluar la progresión de la enfermedad, ya que pacientes con ELT muestran un marcado hipometabolismo asociado con un peor pronóstico. Los astrocitos tienen un papel clave en la regulación del metabolismo cerebral de la glucosa y, también, están implicados en la epilepsia, modulando la excitabilidad neuronal y contribuyendo a la respuesta inflamatoria tras las crisis.

De acuerdo a esto, el objetivo de esta tesis doctoral fue evaluar las consecuencias de la activación de los astrocitos en los cambios metabólicos asociados a la epileptogénesis. Para ello, utilizamos un modelo de epilepsia en ratón inducido por la inyección de ácido kaínico intrahipocampal (KA iHPC) en el cual se emplearon técnicas de quimiogenética (DREADDs) y optogenética para activar los astrocitos del hipocampo. Para valorar la activación astrocitaria como tratamiento, se evaluó el metabolismo cerebral de la glucosa a través de la tomografía por emisión de positrones (PET), y se estudió su correlato electrofisiológico (EEG) e histopatológico.

En primer lugar, se realizaron estudios PET dinámicos con  $^{18}\text{F}$ -fluoro-2-desoxi-D-glucosa ( $^{18}\text{F}$ -FDG) para evaluar los cambios en la cinética de la glucosa mediada por la activación de los astrocitos con clozapina-N-óxido (CNO). Con el fin de estudiar los mecanismos celulares, se usaron animales control y ratones modificados genéticamente ( $\text{Ip3r2}^{-/-}$  -*knock out* para el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato de tipo 2, encargado de la movilización de calcio-, y  $\text{GLUT1}^{\Delta\text{GFAP}}$  -ratón *floxeado* para el transportador de glucosa 1 en los astrocitos). Además, se valoraron los efectos de la activación de astrocitos en los metabolitos cerebrales a través de HR-MAS, sacrificando a los animales 25 minutos después de la administración de CNO. Después, se estudió el impacto de la activación de los astrocitos durante la epileptogénesis, administrando un tratamiento crónico de CNO desde el día 1 al 7. Se realizaron tres estudios con  $^{18}\text{F}$ -FDG PET para valorar los cambios en el metabolismo: uno antes de la inyección de KA, y dos después, el día 1 y día 8 post KA. Además, se realizaron estudios de EEG tras el tratamiento y estudios histopatológicos para evaluar la muerte neuronal, la astrogliosis y la inflamación.

La activación de los astrocitos aumentó la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en el ratón WT, pero no en los ratones  $\text{Ip3r2}^{-/-}$  o  $\text{GLUT1}^{\Delta\text{GFAP}}$ , por lo que los cambios metabólicos parecen ser mediados por la movilización de calcio y el transporte de glucosa en los astrocitos. El estudio longitudinal de imagen  $^{18}\text{F}$ -FDG PET en el modelo de epilepsia por KA iHPC mostró un hipermetabolismo en el día 1 tras la inyección de KA y un hipometabolismo en el día 8 post inyección. La activación crónica de los astrocitos con CNO durante este periodo de epileptogénesis revirtió el hipometabolismo post-ictal y previno la pérdida neuronal. Esta tesis contribuye a la comprensión de los mecanismos celulares de la epileptogénesis y señala a los astrocitos como elementos clave para el estudio de las epilepsias adquiridas.

# ABSTRACT

---

Epilepsy is a chronic disorder, clinically characterized by the occurrence of spontaneous seizures (CE) and affects approximately about 2% of the world population. Epilepsy is far from being a single, well-characterized disease, as it includes other epileptic syndromes, but one of the most common is temporal lobe epilepsy (ELT). ELT is often associated with drug resistance, as 40% of patients with ELT do not respond to anticonvulsants. Another feature of ELT, also associated with drug resistance, is hippocampal sclerosis, which is characterized by neuronal death, reactive gliosis, and glial scarring in this brain area. Glial cells, particularly astrocytes, exhibit physiological and molecular changes in sclerosed areas that appear to be associated with the development of a hyperexcitable neuronal network that generates CE. Progress in the study of epilepsy has been limited by the poor understanding of the process of disease development, or epileptogenesis, which is why treatments capable of preventing the development of pathology after a potentially epileptogenic event have not yet been found. This highlights the importance of renewing the therapeutic perspective in this disease and finding new biomarkers and therapeutic targets to study epilepsy. Brain glucose metabolism has emerged as a powerful biomarker for assessing disease progression, as patients with ELT exhibit marked hypometabolism, which is associated with a worse prognosis. Astrocytes play a key role in the regulation of brain glucose metabolism and are involved in epilepsy by modulating neuronal excitability and contributing to the inflammatory response after seizures.

To this end, we used a mouse model of epilepsy induced by intrahippocampal kainic acid injection (KA iHPC) in which hippocampal astrocytes were activated using chemogenetic (DREADDs) and optogenetic techniques. To evaluate astrocyte activation as a treatment, brain glucose metabolism was assessed by positron emission tomography (PET) and its electrophysiological (EEG) and histopathological correlates were studied.

First, dynamic PET studies with  $^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxy-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) were performed to evaluate changes in glucose kinetics mediated by clozapine-N-oxide (CNO) activation of astrocytes. With the aim to study the cellular mechanisms we used control animals and genetically modified mice (*Ip3r2<sup>-/-</sup> -knock out* for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2, responsible for calcium mobilization-, and *GLUT1<sup>AGFAP</sup> -mouse floxed* for glucose transporter 1 in astrocytes-). In

addition, the effects of astrocyte activation on brain metabolites were assessed by HR-MAS by sacrificing animals 25 min after CNO administration. Next, the impact of astrocyte activation during epileptogenesis was investigated by administering chronic CNO treatment from day 1 to day 7. Three  $^{18}\text{F}$ -FDG PET studies were performed to assess metabolic changes: one before KA injection and two after, on day 1 and day 8 after KA. In addition, post-treatment EEG studies and histopathologic studies were performed to assess neuronal death, astrogliosis and inflammation.

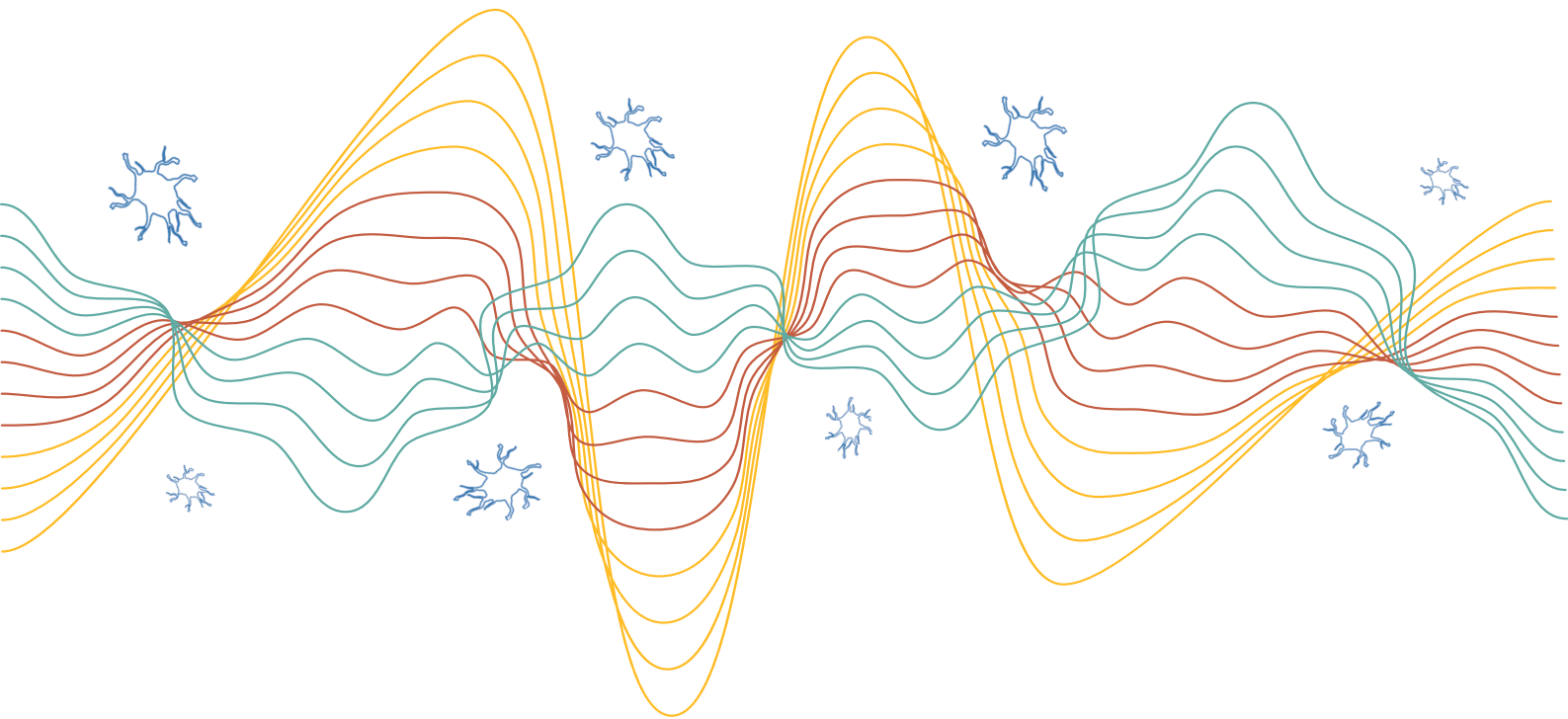
Activation of astrocytes increased  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake in WT mice but not in  $\text{Ip3r2}^{-/-}$  or  $\text{GLUT1}^{\Delta\text{GFAP}}$  mice, suggesting that metabolic changes are mediated by calcium mobilization and glucose transport in astrocytes. Longitudinal  $^{18}\text{F}$ -FDG PET imaging in KA iHPC epilepsy model showed hypermetabolism at day 1 post KA injection and hypometabolism at day 8 post-injection. Chronic activation of astrocytes with CNO during this period reversed post-ictal hypometabolism and prevented neuronal loss. This work contributes to the understanding of the cellular mechanisms of epileptogenesis and points to astrocytes as a key player in the study of epilepsy.

*La historia de la **epilepsia** se puede resumir como 4.000 años de **ignorancia**, superstición y estigma, seguidos de 100 años de **conocimiento**, superstición y estigma.*

*Rajendra Kale – BMJ, 1997*



- CAPÍTULO 1 -  
INTRODUCCIÓN





# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. Epilepsia

La epilepsia es un trastorno neurológico que se caracteriza por una predisposición continuada de padecer crisis epilépticas, entendiendo éstas como la aparición recurrente de signos y síntomas provocados por una actividad neuronal anormal y excesiva en el cerebro. Su prevalencia a nivel mundial estima alrededor de 50 millones de personas afectadas, y aproximadamente 2,4 millones de casos son diagnosticados anualmente (Organización Mundial de la Salud, 2023).

La etimología de la palabra epilepsia sitúa su origen en el término griego *epilambano*, que significa “tomar por sorpresa, ataque súbito que sobrecoge”. Las características de este desorden propiciaron que desde tiempos antiguos se asociara a un origen demoníaco, sobrenatural o sagrado. Es por esto que las personas epilépticas han sido sometidas a toda clase de prácticas y rituales atroces que atentaban contra su seguridad y su vida: desde las craneotomías que se realizaban en Egipto (que, de algún modo, ya situaban el origen de la epilepsia en el cerebro) hasta exorcismos incitados por el impacto de la religión en el medievo (*de Boer, 2010*).

El estudio moderno de la epilepsia comenzó en torno a 1860-1870, cuando John Hughlings Jackson comenzó a categorizar las crisis motoras focales. Más tarde, en 1886, Victor Horsley trató a un paciente con traumatismo craneoencefálico y crisis epilépticas realizando una lobotomía de la zona cercana a la lesión, comprobando la remisión de las crisis focales (*Westbrook, 2014*). Pero el primer tratamiento farmacológico no apareció hasta 1912, año en el que Alfred Hauptmann usó fenobarbital en pacientes con crisis epilépticas y así hacer más llevadera su

guardia hospitalaria, comprobando con sorpresa que las crisis remitían (*Hauptmann, 1912*). Pese al gran avance que esto pudo suponer, existían algunos casos de epilepsias farmacorresistentes que no eran capaces de responder al tratamiento. Fue Wilder Penfield en 1943, quien aplicó la electrocorticografía (ECG) para registrar la actividad eléctrica de la corteza cerebral expuesta y detectar los focos epilépticos (*Penfield, 1954*). Aquellos que presentaban epilepsias no tratables, eran derivados directamente al neurocirujano. Este fue el caso de Henry Molaison (el paciente H.M.), al que en 1953, tras localizarse focos epilépticos en su lóbulo temporal, le extirparon gran parte de su hipocampo, giro hipocampal y amígdala (estructuras relacionadas con la memoria), generándole graves problemas de amnesia retrógrada y consolidación de recuerdos, y convirtiéndolo en un hito científico dentro de la neuropsicología (*Dossani et al., 2015*)<sup>1</sup>. A lo largo del tiempo, se han desarrollado otros fármacos anti-epilépticos. Actualmente, sin embargo, aún un 30% de los pacientes epilépticos son resistentes al tratamiento farmacológico y su indicación terapéutica es la cirugía para extirpar el foco epiléptico, sin que esto ofrezca garantías de mejora (*Sheng et al., 2018*). Esto sucede porque a día de hoy se desconoce en detalle la etiopatogenia de la enfermedad y los mecanismos responsables de la farmacorresistencia de estos pacientes.

A pesar de los avances en el conocimiento y el estudio de la enfermedad, el paciente epiléptico ha sufrido y sufre de la discriminación y el estigma social. Por ejemplo, en China e India, la epilepsia es considerada a menudo como motivo para prohibir o anular el matrimonio, y en Reino Unido, la ley que permitía la nulidad del matrimonio por epilepsia no se enmendó hasta 1971, debido a las creencias sobre la transmisión de la enfermedad a la progenie. Además, en los Estados Unidos de América, hasta los años 70, a las personas epilépticas se les podía negar el acceso a restaurantes, teatros, centros recreativos y otros edificios públicos. Y aún todavía tienen dificultades para acceder a la enseñanza superior, mantener un trabajo o, incluso, obtener el permiso de conducir (*Kaur et al., 2019*). Con todo esto, la epilepsia se presenta como un trastorno neurológico que precisa con urgencia del estudio de nuevas alternativas terapéuticas basadas en una mejor comprensión de los mecanismos celulares de las crisis y su impacto en el desarrollo de la enfermedad.

---

<sup>1</sup> Henry Molaison (1926-2008) vivió en una institución de cuidados en Windsor Locks (Connecticut), donde colaboró como sujeto de investigación hasta su muerte, a causa de una insuficiencia respiratoria a los 82 años. Su cerebro se dividió en secciones histológicas para su estudio y se encuentra en la Universidad de California.

### 1.1.1. Caracterización de la epilepsia

En 2005, la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) diferenció una crisis epiléptica, “*ocurrencia transitoria de signos y síntomas debidos a la actividad neuronal anormal, excesiva y sincrónica en el cerebro*”, de la patología en sí, que se define como la predisposición permanente a generar estas crisis, con las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición (Fisher *et al.*, 2005). La terminología se revisó en 2014 (Fisher *et al.*, 2014) para crear criterios que soporten un diagnóstico clínico efectivo de la patología, dentro de las diferentes etiologías que presenta. De esta forma, la ILAE propuso un diagnóstico de la epilepsia basado en la ocurrencia dos crisis espontáneas (CE) en menos de 24 horas, o una sola crisis a la que se añade una alta posibilidad (60%) de que se repita, o un diagnóstico de síndrome epiléptico. El avance de esta definición fue englobar en el diagnóstico las crisis de origen sistémico (infección, infarto o traumatismo cerebral) o neurológico (fotosensibilidad), aunque en este caso se denominan “epilepsia secundaria” ya que no se han producido de forma espontánea, y suelen ser las menos comunes. Sin embargo, la última clasificación de la ILAE en 2017 (Fisher *et al.*, 2017) propone 3 niveles de criterios para el diagnóstico de la epilepsia (Fig. 1.1):

- 1) Tipo de crisis: origen focal, generalizado o desconocido.
- 2) Tipo de epilepsia: focal, generalizada, combinación focal-generalizada o desconocido.
- 3) Síndrome epiléptico.

Se entiende como origen focal aquellas crisis que aparezcan en una región específica del cerebro (localizada en un lóbulo o hemisferio), con la posibilidad de poder generalizarse a otras regiones posteriormente. Dentro de esta categoría se distingue la crisis parcial simple, cuando no hay pérdida de conciencia, de la crisis parcial compleja, cuando sí la hay. En las crisis generalizadas no se distingue un inicio localizado que haga pensar en una crisis focal. A su vez pueden categorizarse por una serie de síntomas de inicio motor o no motor. Algunos ejemplos son los movimientos tónicos (extensión y rigidez) o clónicos (espasmos) de los miembros, y su consecuente combinación hacia una crisis tónico-clónica, lo que anteriormente se denominaba la epilepsia del *gran mal*. La epilepsia del *pequeño mal*, por el contrario, se caracteriza por crisis no convulsivas, o crisis de ausencia, con pérdida de conciencia y falta de actividad motora. La ILAE también propone una clasificación etiológica, aunque la causa más frecuente es la idiopática, es decir, de origen desconocido.

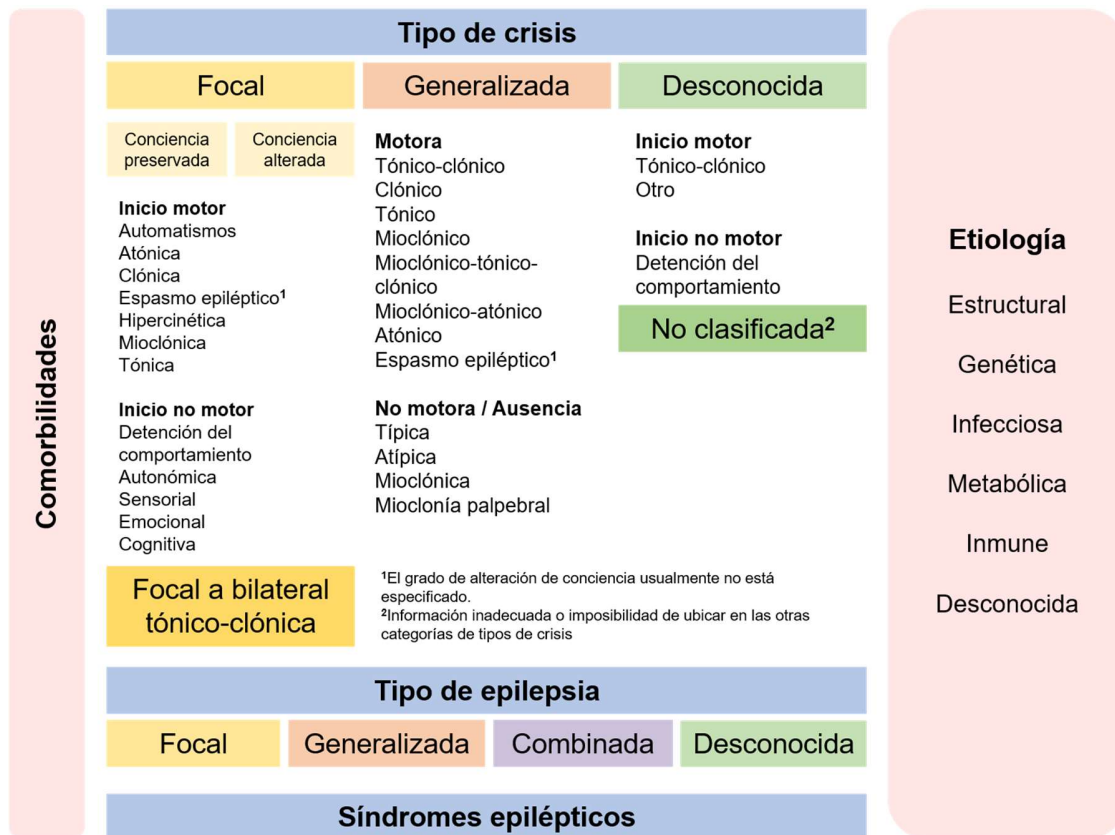
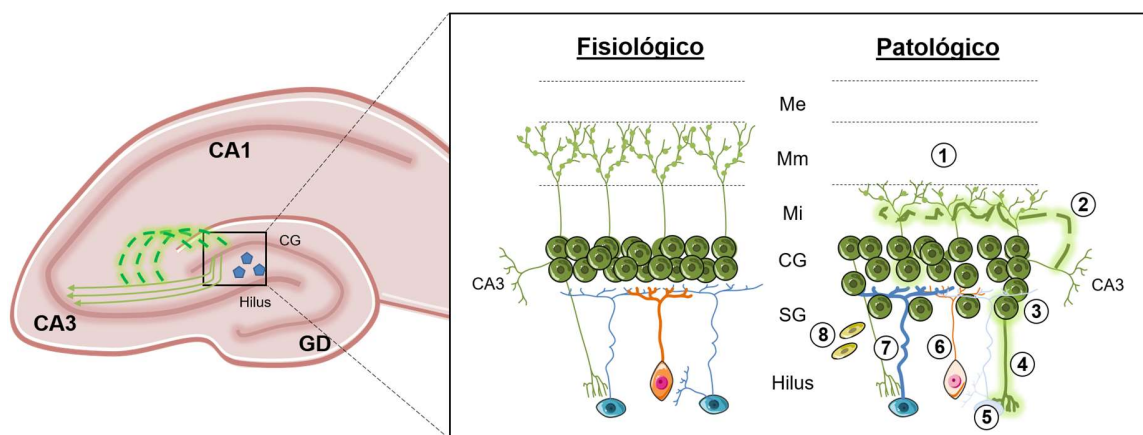


Figura 1.1. Clasificación de los tipos de crisis y epilepsias. La tabla presenta la última clasificación de la ILAE (Fisher et al., 2017) de los tipos de crisis y tipos de epilepsia en base al inicio de las crisis, distinguiéndose entre focal, generalizada o desconocida. Además, tiene en consideración los síndromes epilépticos y la etiología dentro de la clasificación.

### 1.1.2. Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT)

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es una de las epilepsias más comunes y con más porcentaje de farmacorresistencia (20%). Su nombre viene dado por la localización del foco epiléptico, en el lóbulo temporal, y se distingue en dos tipos según las estructuras afectadas: la medial, cuando está implicada la amígdala, el hipocampo y el giro hipocampal, y la lateral o neocortical, cuando afecta el neocórtex temporal y áreas corticales asociativas (Maillard et al., 2004; Williamson, 1998). Ambas pueden diferenciarse según el patrón EEG. La ELT medial se caracteriza por una actividad focal del rango theta (5-9 Hz) en su fase ictal, y en su fase interictal alteraciones paroxísticas del tipo espiga onda en el temporal anterior (Sadler and Desbiens, 2000). La ELT lateral, por otro lado, en su fase ictal tiene un inicio más extenso con actividad irregular

en los 2-5 Hz, y en la fase interictal presenta espigas aisladas en el temporal posterior (*Fernández-Torre, 2002; Foldvary et al., 1997; Pascual, 2007*). Normalmente, el inicio de esta patología se desencadena a partir de una crisis durante la infancia (crisis febriles) o traumatismos cerebrales. Tras estas lesiones iniciales, existe un periodo de tiempo latente de varios años en los que no se experimentan crisis. Este periodo se denomina epileptogénesis, el proceso por el cual se desarrolla la epilepsia (*Mathern et al., 1996; Sloviter, 2008*). La característica patológica más representativa de la ELT medial es la esclerosi hipocampal (EH), una condición que incluye disminución del volumen hipocampal por la pérdida de células piramidales en CA1, CA3 y el giro dentado (GD) y la gliosis reactiva (*Wiebe, 2000*). Las hipótesis que se postulan en la relación con la EH y con el aumento de excitabilidad en el hipocampo y la aparición de CE son: 1) daño en las interneuronas que hacen sinapsis con las neuronas gabaérgicas del hilus del GD; 2) denervación de las células musgosas, lo que provoca un crecimiento hacia áreas vecinas que dan lugar a células granulares hiperexcitables en el GD; y 3) dispersión de las células granulares del GD debido a la neurogénesis en esa área, que compromete a nuevas neuronas en los circuitos hiperexcitables (*Ammothumkandy et al., 2022; Chang and Lowenstein, 2003; Ratzliff et al., 2002*) Fig. 1.2).



**Figura 1.2. Desorganización del giro dentado en la ELT.** Entre los cambios que se asocian al aumento de la excitabilidad son un acortamiento de las dendritas de las células granulares (1), nuevas sinapsis de las fibras musgosas con la capa granular (2), migración de las células granulares a la zona subgranular (3), hiperexcitabilidad de las células granulares (4), muerte de las células musgosas (5), ineficacia de las células en cesta (*basket cells*) al perder aferencia de las células musgosas (6), aumento de la excitabilidad de las células musgosas supervivientes (7) y neurogénesis aberrante de células que se acoplan al circuito hiperexcitado (8). SG: Subgranular; CG: Capa granular; Mi: Molecular interna; Mm: Molecular media; Me: molecular externa.

El origen de esta lesión hipocampal se relaciona con factores desencadenantes, por lo que aquellos casos en los que cuentan con episodios de crisis durante la infancia y que expresan EH en la etapa adulta, tienen un mejor pronóstico para la intervención quirúrgica que aquellos que no expresan este correlato patológico y cuyo origen epiléptico es desconocido (*Mathern, et al., 1996*). Este podría ser el motivo de las alteraciones cognitivas descritas en pacientes con epilepsia, entre las que se encuentran la memoria, las funciones ejecutivas y el lenguaje (*Allone et al., 2017*).

### 1.1.3. Epileptogénesis

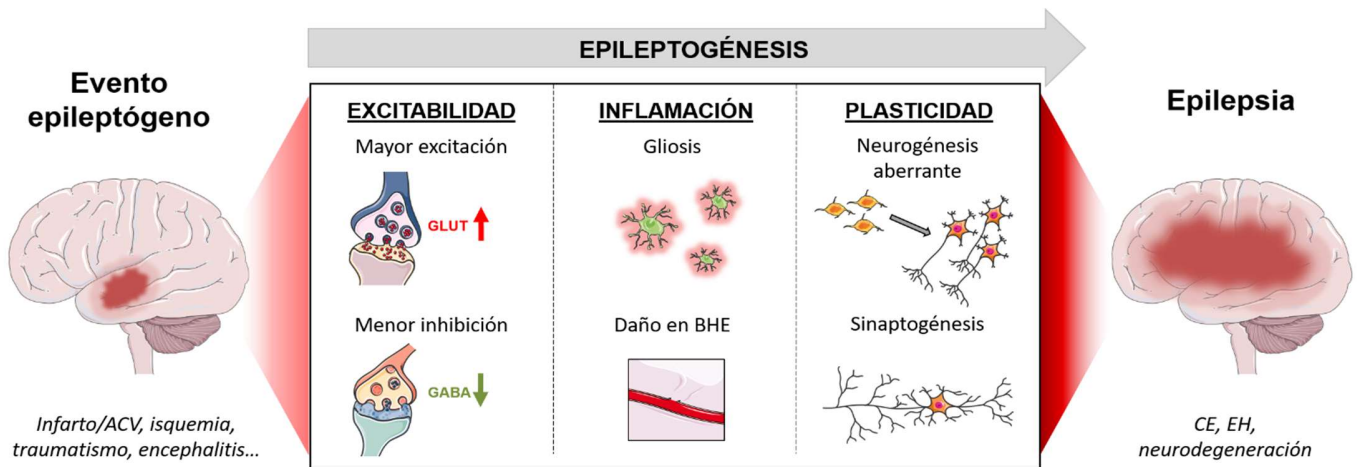
El desarrollo de la epilepsia se llama epileptogénesis y comprende un proceso que incluye cambios moleculares, celulares y tisulares que conllevan la aparición de CE recurrentes, y convierten una red neuronal normal en una hiperexcitada. En la epileptogénesis pueden distinguirse tres fases: 1) un insulto inicial, daño o evento precipitante; 2) un periodo “latente” durante el cual suceden los cambios que causan la epilepsia; y 3) una vez iniciada ésta, se producen otros cambios a favor de la progresión y la severidad de la enfermedad (*Engel et al., 2013*). Esto depende de las propiedades intrínsecas de cada célula (tipo y número de canales que contenga), la eficacia sináptica (aumentando la actividad excitadora se facilita la crisis) y las conexiones sinápticas (una circuitería que favorezca la conexión con otras redes) (*Paur and Chazot, 2007*).

Las crisis se definen como una actividad eléctrica excesiva y sincrónica en una población neuronal. Durante las crisis (fase ictal), las neuronas muestran cambios paroxísticos en el umbral de despolarización, una variación del potencial de membrana de -85 mV a +30 mV en un tiempo de 50-200 ms. Esta despolarización se produce por la activación de canales dependientes de ligando activados por glutamato, el receptor de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), que genera un tren de potenciales de acción. Posteriormente aparece una post-hiperpolarización para delimitar la actividad neuronal, generada por canales de potasio calcio dependiente. Tras la aparición de un foco epiléptico, la hiperpolarización neuronal vuelve a valores basales (potencial de membrana en reposo) y la crisis se expande más allá del foco inicial (*Kubista et al., 2019; Westbrook, 2014*). En las fases interictales (entre crisis) se observan despolarizaciones paroxísticas, representadas como

una secuencia rápida de potenciales de acción seguidas de un potencial de despolarización lento. Aún se desconocen los mecanismos celulares que favorecen este tipo de sincronización. La consecuencia final es un desequilibrio sináptico entre la excitación e inhibición cerebral. Las posibles causas de este proceso son: 1) fallos en el mecanismo que inhibe la despolarización de las neuronas, 2) aumento de la actividad excitadora y 3) creación de nuevos circuitos neuronales (*Scharfman, 2007*).

El neocórtex y el hipocampo son zonas particularmente sensibles a la actividad epiléptica al poseer una alta actividad excitadora que prioriza ante los mecanismos inhibidores del circuito, además de contar con células hiperexcitables y una fuerte influencia de los cambios en las propiedades intrínsecas neuronales (*Reddy and Kuruba, 2013*). El incremento de la excitación en el hipocampo puede explicarse a través de la formación de nuevos circuitos excitadores recurrentes, por causa del crecimiento de nuevos axones que crean sinapsis excitadoras entre las células granulares. Otra estructura subcortical importante es la amígdala, que también se sitúa en el lóbulo temporal y que, gracias a su conexión con el hipocampo, es un área fundamental en varios modelos experimentales de epilepsia (*Wolf et al., 1997*).

A medida que se van sufriendo más crisis, ocurren cambios celulares severos que se asocian con la reorganización de las conexiones para favorecer la sincronización de las redes neuronales epilépticas. A consecuencia de la excitabilidad descontrolada en el hipocampo, las neuronas tienden a acumulación de calcio intracelular, activación de segundos mensajeros y modificación de la síntesis de proteínas y la expresión génica. Esto puede llevar a procesos inflamatorios y activación glial, los cuales están relacionados con el desarrollo de la EH (*Sofroniew and Vinters, 2010*). Finalmente, las crisis pueden aumentar la neurogénesis aberrante, y aumentar la arborización dendrítica que integra a las nuevas neuronas en las redes epilépticas (*Chen et al., 2021; Parent et al., 2006*). Esto indica la capacidad del circuito para generar nuevas conexiones neuronales (sinaptogénesis) que crean bucles excitadores y promueve que la excitabilidad se expanda más allá de la región afectada (*Morimoto et al., 2004*) (Fig. 1.3).

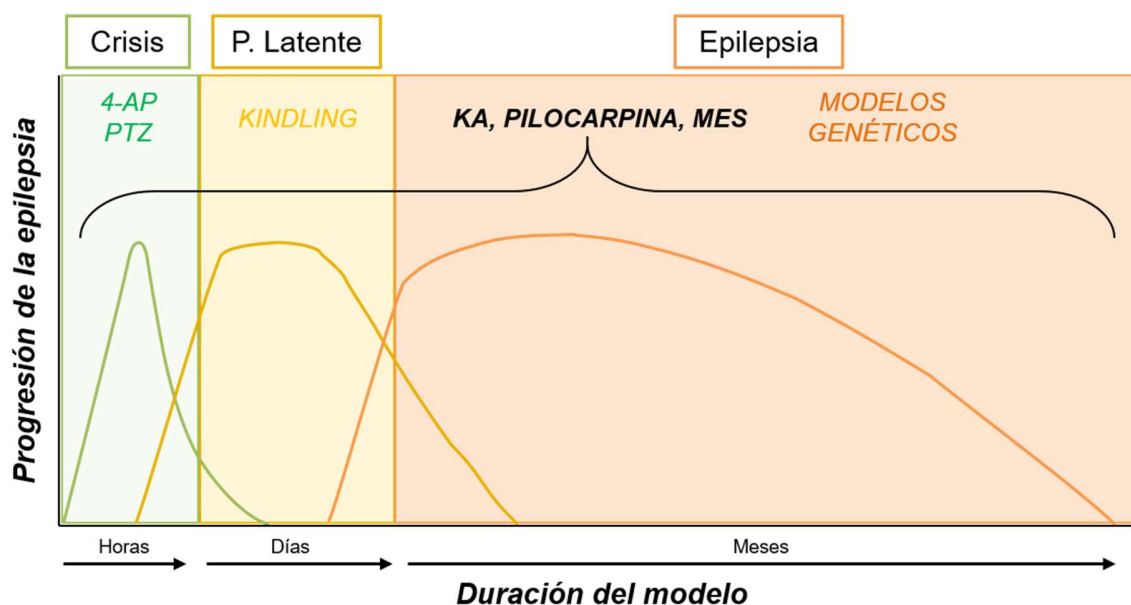


**Figura 1.3. Alteraciones durante el progreso de la epileptogénesis.** Tras un evento epileptógeno comienza un periodo de latencia en el que ocurren cambios morfológicos y moleculares que derivan en el establecimiento de la epilepsia. Entre ellos encontramos cambios en la excitabilidad, con un aumento de la excitación y una disminución de la inhibición, procesos inflamatorios que provocan gliosis y daño en la BHE y cambios en la plasticidad, como la aparición de la neurogénesis aberrante y la sinaptogénesis que se suman a circuitos hiperexcitados. Figura adaptada de (Marques *et al.*, 2022).

#### 1.1.4. Investigación en epilepsia: Modelos animales

Para el estudio de la epilepsia se han utilizado modelos animales con una doble aproximación: el desarrollo preclínico de nuevos fármacos anticonvulsivos y el empleo de modelos que permitan el estudio de la epileptogénesis para intentar entender las bases fisiopatológicas del inicio de este desorden, ya que una de las desventajas en el estudio en humanos es que la patología se estudia una vez que los adultos muestran CE, cuando ya se ha producido la epileptogénesis (Löscher, 2017). Los modelos animales pueden clasificarse en modelos de crisis convulsivas, que se utilizan para evaluar fármacos anticonvulsivos, o modelos de epilepsia, en el que se busca que la patología evolucione por sí sola a un estado crónico, es decir, que conlleve un proceso de epileptogénesis y que desarrolle CE (Sarkisian, 2001). Entre ellos, podemos distinguir modelos genéticos, animales manipulados genéticamente que aumentan la propensión a sufrir crisis, o modelos de epilepsia adquirida, que se crean mediante lesiones químicas o físicas. Por la clasificación de agentes convulsivos encontramos los modelos eléctricos, en los que se estimula de forma focal áreas sensibles como el hipocampo o la amígdala para generar una red hiperexcitable, o modelos químicos, que se basan en desnivelar el equilibrio de excitación/inhibición cerebral aumentando la actividad glutamatergica -pilocarpina (Curia *et*

al., 2008), ácido kaínico-KA (Lévesque and Avoli, 2013)- o disminuyendo la GABAérgica - (pentilentetrazol (Park et al., 2006)- (Fig. 1.4).



**Figura 1.4. Representación de la temporalidad de los modelos de epilepsia.** La gráfica muestra la clasificación de los modelos dependiendo de la duración. Los modelos de crisis duran unas horas y su objetivo es el estudio de los mecanismos de las crisis epilépticas o SE p.e: inyección aguda de 4-aminopiridina (4-AP) o pentilentetrazol (PTZ). Los modelos que estudian el periodo latente (como el *kindling*) estudia los mecanismos celulares tras provocar un evento epileptógeno pero antes de que ocurran las CE. Para estudiar la epilepsia como síndrome se pueden utilizar modelos animales genéticos (p.e. modelos de crisis audiogénicas). Otros modelos como el KA, pilocarpina o máximo electroshock (MES) permiten caracterizar el desarrollo de la epileptogénesis tras un evento epiléptico, a través de las diferentes etapas.

Para emular las características de la ELT es necesario seleccionar un modelo de epilepsia que curse con CE y que genere cambios fisiopatológicos en el hipocampo relacionados con la muerte neuronal y la gliosis de la EH. Los modelos de *status epilepticus* (SE) son modelos de epilepsia adquirida en los que se provocan crisis mantenidas durante varios minutos (Trinka et al., 2015), y que, después de un periodo de latencia, son capaces de expresar CE (Martin and Pozo, 2006). Uno de los más conocidos es el modelo de KA. El KA es un análogo de L-glutamato y un agonista del receptor ionotrópico de KA, por lo que funciona como un neurotransmisor muy efectivo que provoca cambios en la excitabilidad y toxicidad. Los receptores de KA se distribuyen ampliamente por el hipocampo. En el GD el daño que provoca el KA genera muerte neuronal, neurogénesis aberrante y sinaptogénesis. Además, el KA limita la acción de GABA por su acción en el incremento de la excitabilidad en la neurona post-sináptica (Falcon-Moya et al., 2018; Lévesque and Avoli, 2013). La administración del KA intracerebral, al inyectarse en

estructuras como el hipocampo (modelo de KA intra-hipocampal - iHPC), reproduce en parte los cambios histopatológicos observados en la ELT (*Ben-Ari et al., 1979*). Dosis entre 0,4 y 2  $\mu\text{g}$  pueden generar un SE 5-60 minutos tras la inyección (cuando la administración se realiza a través de una cánula con el animal despierto) (*Raedt et al., 2009*). La gravedad del SE se puede categorizar en base a escalas de severidad de la crisis ya establecidas, siendo la escala de Racine una de las más empleadas (*Racine, 1972*). El modelo cursa con modificaciones en el EEG que se basan en despolarizaciones paroxísticas, espigas interictales y oscilaciones gamma antes de la propagación de las crisis (*Jinde et al., 2009; Medvedev et al., 2000*). Cuando se cronifica, se observa una disminución en el ritmo theta (4-12 Hz) de las interneuronas del *stratum oriens-lacunosum-moleculare* que modifican su actividad aumentando el ritmo gamma (30-80 Hz), señalando una posible alteración de las propiedades inhibitoras de estas neuronas (*Bragin et al., 2005; Dugladze et al., 2007; Riban et al., 2002*). Una vez que el KA es inyectado y se une a sus receptores, se generan desbalances osmóticos a la vez que aumenta el flujo de calcio hacia las células y se activan enzimas endonucleasas y proteasas, que dañan la estructura celular. La acumulación de calcio genera disfunción mitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno. Todo esto genera la apoptosis de las células (*Rusina et al., 2021*). Por ello, a nivel histopatológico se observa muerte neuronal en las regiones de CA1 y CA3, una pérdida de interneuronas gabaérgicas en el GD y un engrosamiento de la capa granular en la misma zona, a partir de las primeras 48 horas tras el SE (*Bouilleret et al., 1999; Bouilleret et al., 2000; Cavalheiro et al., 1982*), un correlato muy similar al encontrado en la ELT. Además, las CE en este modelo se manifiestan en un periodo relativamente corto de tiempo, a partir del día 5 y hasta el día 30 post-SE, (*Groticke et al., 2008; Riban, et al., 2002*), que pueden ser no convulsivas en ratones (*Bouilleret, et al., 1999; Lévesque and Avoli, 2013*). La brevedad de la ventana de epileptogénesis de este modelo es ideal para la aplicación de tratamientos crónicos.

## 1.2. Neuroimagen por Tomografía de Emisión de Positrones (PET)

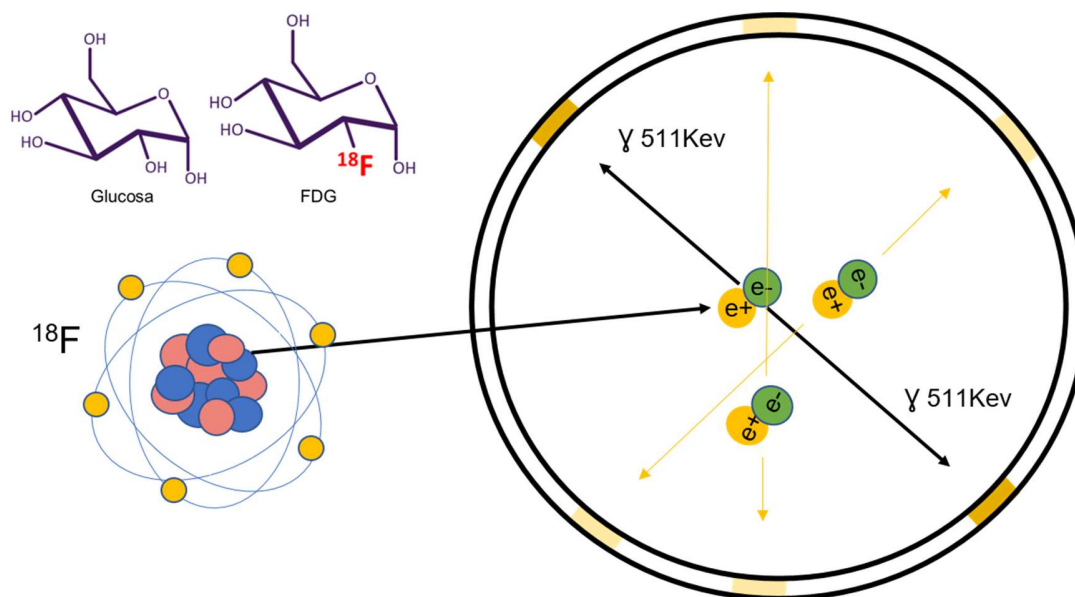
Dadas las características de la epilepsia, uno de los propósitos de la investigación clínica y pre-clínica es identificar biomarcadores tempranos de la epileptogénesis susceptibles de modificación para implementar nuevas terapias anti-epilépticas (Bascuñana et al., 2019; Engel, 2019). Las técnicas de neuroimagen no invasivas han demostrado tener un gran potencial para mejorar el diagnóstico de epilepsias refractarias que no responden al tratamiento, al identificar la zona epileptogénica y prevenir o reducir el riesgo en las intervenciones quirúrgicas (Sueri et al., 2018). La aplicación pre-clínica de estudios longitudinales de neuroimagen a lo largo del tiempo y en el mismo sujeto experimental ofrece la posibilidad de investigar la epileptogénesis de forma no invasiva: desde pocos momentos tras el SE, incluso antes de que se manifiesten los signos de la patología, hasta las fases crónicas, convirtiéndose en la herramienta ideal para el estudio de la epileptogénesis y valorar la efectividad de varias terapias antiepilépticas (Goffin et al., 2008; Loscher, 2011; Martín and Pozo, 2006). Dentro de la variedad de técnicas de neuroimagen *in vivo*, las más usadas son la tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés *positron emission tomography*), la tomografía computarizada por emisión de un fotón único (SPECT, del inglés *single photon emission computerized tomography*) y la imagen por resonancia magnética nuclear (RMN) (Bertoglio et al., 2017).

### 1.2.1. Características de la técnica PET

El PET es una técnica de imagen molecular *in vivo* que utiliza los positrones emitidos por radionúclidos, como  $^{18}\text{F}$  (flúor), entre otros<sup>1</sup>, asociados a moléculas. Cuando estas moléculas se inyectan en el organismo, los positrones que emiten estos radionúclidos impactan con los electrones del tejido (Fig. 1.5). Esto provoca una aniquilación de las partículas: sus masas se convierten rápidamente en energía electromagnética y se generan dos fotones con una energía de 511 KeV que se alejan en la misma dirección, pero en sentido contrario (Turkington, 2001).

---

<sup>1</sup> Los radionúclidos no se encuentran en la naturaleza, por lo que se precisa un acelerador de partículas (ciclotrón) para desarrollarlos con reacciones nucleares. El  $^{18}\text{F}$ , por ejemplo, se crea a partir del bombardeo con agua enriquecida con  $^{18}\text{O}$  (oxígeno) al flúor, lo que hace que se excite y tenga la habilidad de emitir positrones, partículas con la misma masa que un electrón pero con carga positiva.

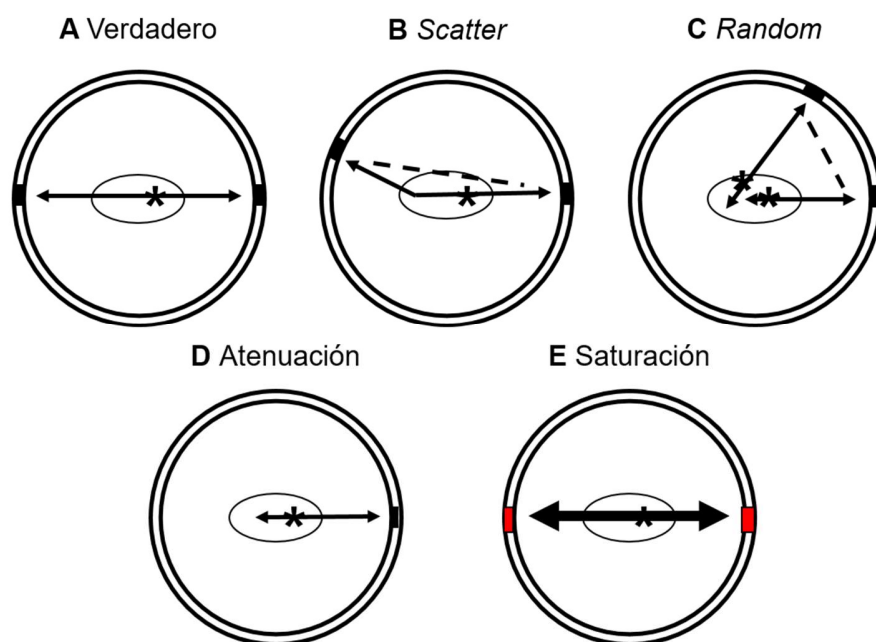


**Figura 1.5. Representación de la aniquilación de un positrón.** Los positrones que emite el radiotrazador se aniquilan con los electrones del organismo, generando dos fotones antiparalelos de 511 KeV que son detectados por los anillos del PET.

El escáner PET cuenta con varios anillos con foto-detectores de rayos gamma, capaces de detectar y posicionar espacialmente los lugares en los que tiene lugar esa aniquilación, mediante una reconstrucción matemática basada en la geometría y teniendo en cuenta la coincidencia en el tiempo de esos fotones. De esta forma, la coincidencia de los fotones se puede dar en tres situaciones (Fig. 1.6):

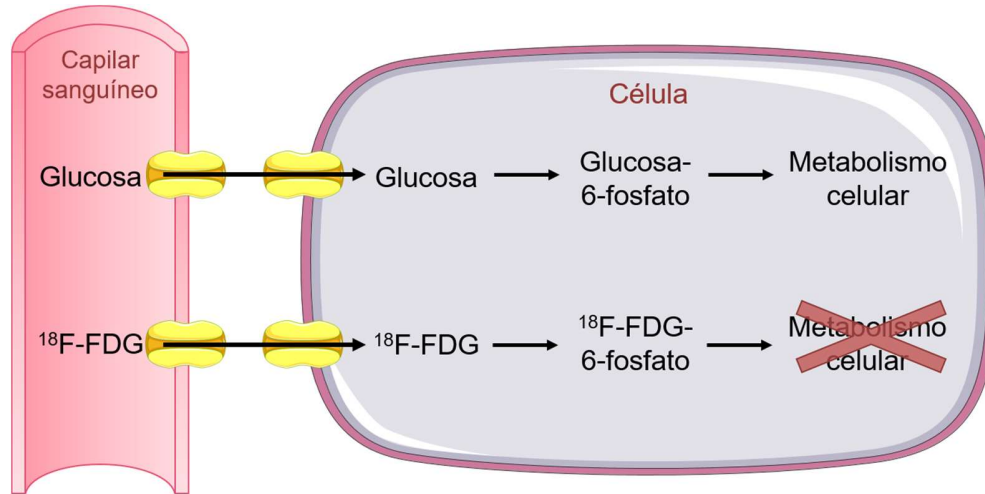
- 1) Evento verdadero: cuando la línea dibujada entre los detectores activados pasa por el punto de origen de la aniquilación.
- 2) Evento *scatter*: cuando uno de los fotones cambia de dirección al atravesar el tejido.
- 3) Evento *random*: cuando dos fotones de aniquilaciones distintas activan dos detectores a la vez.

Como sólo muestran la posición real de la aniquilación los eventos verdaderos, el algoritmo de reconstrucción puede añadir correcciones de *scatter* y *random*. Además, también se puede corregir la atenuación (cuando hay una pérdida de la detección de una coincidencia verdadera por la pérdida de energía de los fotones al atravesar el tejido) y la saturación del detector (cuando impactan más fotones de los que puede registrar).



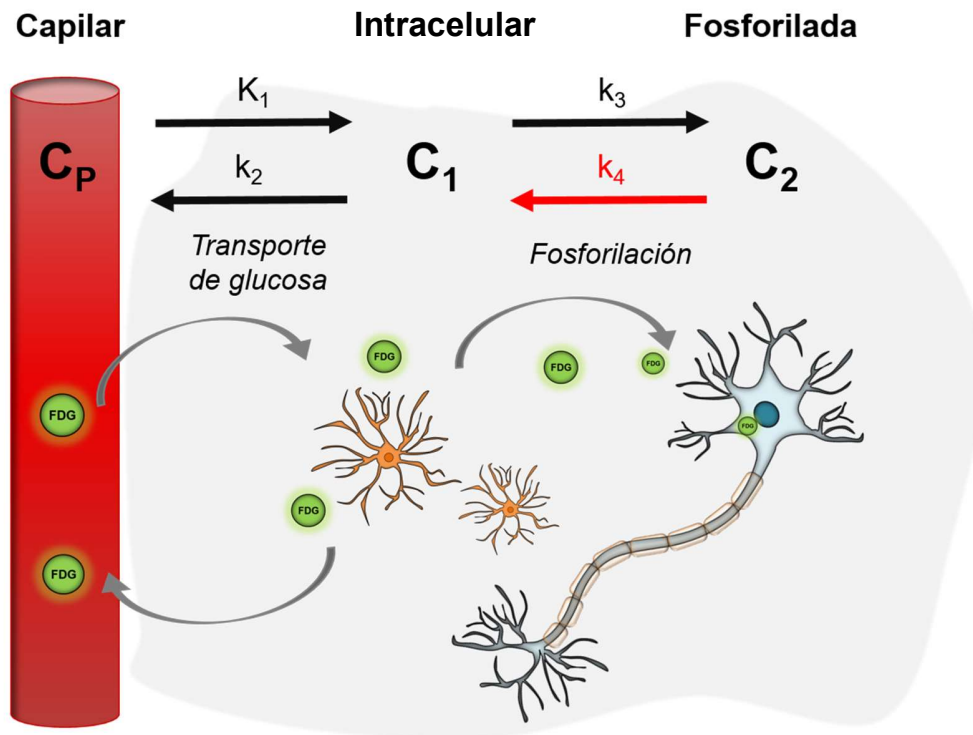
**Figura 1.6. Representación de los tipos de evento detectados en el PET.** **A.** Un evento verdadero localiza de forma precisa la aniquilación en el espacio. **B.** Un evento *scatter* es una localización errónea por la desviación del rayo gamma. **C.** Un evento *random* es provocado por la detección de dos aniquilaciones simultáneas. **D.** La atenuación se refiere a las detecciones perdidas por la incapacidad de atravesar el medio. **E.** La saturación se produce cuando varios rayos impactan simultáneamente contra el detector y éste no los puede registrar.

Si bien la resolución espacial de la imagen está limitada con respecto a otras técnicas de imagen (alrededor de 1mm en el centro campo de visión), esta técnica cuenta con varias ventajas: es una técnica altamente sensible, cuantitativa, mínimamente invasiva y además con resolución temporal suficiente para la adquisición de datos cinéticos que permiten valorar la incorporación del radiotrazador. Uno de los radiotrazadores más utilizados en oncología, cardiología y ahora también neurología, es la  $^{18}\text{F}$ -fluoro-2-desoxi-D-glucosa ( $^{18}\text{F}$ -FDG), que se obtiene sustituyendo el grupo hidroxilo del carbono 2 de una molécula de glucosa por un átomo de flúor-18. Su metabolismo es similar al de la glucosa con la diferencia de que una vez que entra en las células da lugar a la FDG-6-fosfato, la cual no puede metabolizarse por la vía glicolítica, por lo que se queda atrapada y funciona como un indicador del metabolismo celular (Fig. 1.7). Por ello, el aumento de la captación  $^{18}\text{F}$ -FDG se asocia a un mayor consumo de glucosa por parte de las células activadas funcionalmente (Sokoloff et al., 1977).



**Figura 1.7. Esquema de la incorporación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en las células.** Cuando la glucosa entra en las células, es metabolizada a glucosa-6-fosfato y utilizada para el metabolismo celular. La  $^{18}\text{F}$ -FDG no puede ser metabolizada más allá de la  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-fosfato, por lo que queda atrapada dentro de las células y funciona como un marcador del metabolismo cerebral.

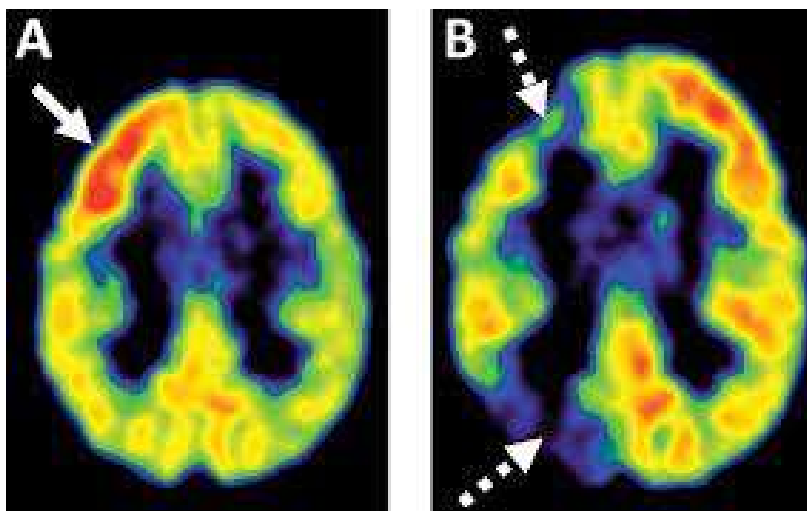
El PET permite realizar estudios dinámicos en los que se registra la acumulación del radiotrazador en las células a través de unas ventanas temporales o *frames*. En el caso de la  $^{18}\text{F}$ -FDG se propone un modelo de análisis de la cinética de esta molécula, llamado el modelo de 2 compartimentos para  $^{18}\text{F}$ -FDG (2TC, del inglés *2 tissue compartment*). El 2TC estima la incorporación de la  $^{18}\text{F}$ -FDG generando diferentes constantes de cinética, donde  $K_1$  (ml/min/ml) representa el transporte del plasma arterial al tejido y  $k_2$  (1/min) el transporte en el sentido contrario,  $k_3$  (1/min) representa la fosforilación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en las células y no existe un proceso de desfosforilación ( $k_4 = 0$ ) (Fig. 1.8). Además existe una constante que indica la entrada total de la  $^{18}\text{F}$ -FDG a través de los compartimentos, llamada  $k_i$ , que resulta del cálculo de las otras constantes:  $k_i = \frac{(K_1 + k_3)}{k_2}$  (Feng *et al.*, 1995; Hong and Fryer, 2010; Koeppe *et al.*, 1985).



**Figura 1.8. Esquema del metabolismo de  $^{18}\text{F}$ -FDG en el modelo de 2 compartimentos.** Este modelo propone el paso del radiotrazador a través de un compartimento plasmático (C<sub>p</sub>), al tejido, pudiendo encontrarse libre (C<sub>1</sub>) o fosforilada (C<sub>2</sub>). Las constantes  $K_1$  y  $k_2$  representan el transporte de glucosa desde el plasma sanguíneo al C<sub>1</sub> y la constante  $k_3$  representa la fosforilación de la molécula. En este modelo  $k_4$  es inexistente ya que no se contempla la desfosforilación, siendo igual a 0.

### 1.2.2. Imagen PET en epilepsia

La  $^{18}\text{F}$ -FDG como trazador PET es ampliamente utilizada en pacientes con ELT con el objetivo de localizar focos epilépticos, ya que durante la fase ictal el foco epiléptico muestra un hipermetabolismo que progresa a una zona hipometabólica en la fase inter-ictal (Carne *et al.*, 2004; Duncan, 2009) (Fig. 1.9). Esto ocurre en un 60-90% de los pacientes con ELT, de los cuales 20-44% no mostraban alteraciones en RMN (Carne, *et al.*, 2004). Aunque el hipometabolismo pronto se relacionó con la pérdida neuronal (Diehl *et al.*, 2003), también se presentaba en pacientes que no presentaban pérdida del volumen hipocampal (Duncan, 2009; Lamusuo *et al.*, 2001). Además, en epilepsias infantiles se ha utilizado para caracterizar epilepsias farmacorresistentes (Govil-Dalela *et al.*, 2018).



**Figura 1.9. Imagen cerebral de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET en un paciente con epilepsia.** A. Muestra del aumento de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en el foco epiléptico. B. Una vez ha progresado la epilepsia, la misma área muestra hipometabolismo en esa región y otras áreas.

(Jubász and Mittal, 2019).

En modelos animales, la imagen metabólica PET se ha utilizado para obtener datos tras un suceso epileptogénico, incluso antes de la manifestación de la epilepsia, lo que permite hacer un seguimiento de la progresión de la epileptogénesis (Loscher, 2011; Martin and Pozzo, 2006). Modelos animales como el de pilocarpina y KA, han mostrado un hipermetabolismo, entendido como una mayor captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG, cuando el estudio se realizaba inmediatamente después del SE (Kornblum et al., 2000; Mirrione et al., 2006; Mirrione et al., 2007). Por el contrario, estos y otros modelos han revelado un marcado hipometabolismo en periodos tempranos tras el SE, entendiéndose entre 24 a 72 horas posteriores (García-García et al., 2016; Goffin, et al., 2008; Shiba et al., 2015), replicando los resultados en pacientes humanos (Jubász and Mittal, 2019). En las fases crónicas este hipometabolismo puede remitir en la mayoría de áreas extra-temporales, pero persiste en el hipocampo y áreas temporales (Guo et al., 2009). Otros estudios han caracterizado el hipometabolismo en el modelo de *kindling* con pentilentetrazol y han demostrado su viabilidad como predictor de las crisis (Bascañana et al., 2016). Además, a nivel histopatológico, el hipometabolismo se relaciona con mayor pérdida neuronal y descenso del flujo sanguíneo cerebral, lo que implica un desequilibrio en los mecanismos metabólicos que mantienen la homeostasis cerebral durante la epileptogénesis y que incluyen la participación de los astrocitos (Jupp et al., 2012). Por otro lado, el hipometabolismo puede ser prevenido e incluso revertido con tratamientos farmacológicos, y con él se puede evitar la muerte neuronal y los procesos inflamatorios (García-García et al., 2023; Shiba, et al., 2015). Si consideramos que las deficiencias

en las vías metabólicas son representativas de varias enfermedades neurodegenerativas (Blass, 2002), es razonable asociar las alteraciones metabólicas cerebrales con aspectos de la epileptogénesis. Por lo tanto, la alteración del metabolismo de la glucosa puede ser un biomarcador cuantificable de la severidad de las crisis y usarse como un índice del éxito de intervenciones terapéuticas.

Sin embargo, la imagen PET puede utilizarse más allá del estudio del metabolismo cerebral. Otros radiotrazadores han servido para caracterizar diferentes características de la epilepsia. El  $^{18}\text{F}$ -Flumazenilo ha revelado una reducción de unión de agonistas del receptor  $\text{GABA}_A$  y se ha relacionado con la alta frecuencia de las crisis en pacientes (Koepp *et al.*, 2000; Padma *et al.*, 2004), aunque sin posibilidad de utilizarlo como biomarcador, ya que su detección no se corresponde con el foco epiléptico (Hammers *et al.*, 2002). En modelos animales de epilepsia, la señal inflamatoria se puede estudiar a través de marcadores de la proteína translocadora (TSPO), como el radiotrazador  $^3\text{H}$ -PK11195, que señala la neuroinflamación mediada por células gliales (Bertoglio *et al.*, 2021; Wolf *et al.*, 2020) y ha demostrado ser un biomarcador de la eficiencia del tratamiento (García-García *et al.*, 2018). A partir de ahí se han desarrollado otros marcadores de neuroinflamación, como otros marcadores del TSPO, como el  $^{18}\text{F}$ -GE180 (Brackhan *et al.*, 2018) o  $^{18}\text{F}$ -DPA-714 (Nguyen *et al.*, 2018), u otras alternativas como el  $^{18}\text{F}$ -JNJ-64413739 que marca el receptor P2X7, que está incrementado en pacientes con epilepsia y se ha correlacionado con la severidad de las crisis en animales (Morgan *et al.*, 2023). También se han desarrollado otros radiotrazadores específicos para valorar la activación de astrocitos, como el  $^{18}\text{F}$ -Deprenil (Bascunana *et al.*, 2019).

### 1.3. Astrocitos en la epilepsia

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, los astrocitos son un tipo celular íntimamente ligado con la EH, el distintivo histopatológico más representativo de la ELT. La EH se caracteriza por la astrogliosis, en la que los astrocitos sufren cambios moleculares y fisiológicos que promueven la formación de cicatrices gliales, facilitando la neurodegeneración y la hiperexcitabilidad de la estructura hipocampal, pero que en primera instancia parece ser un mecanismo de soporte para disminuir el daño de las crisis (*Sofroniew and Vinters, 2010*). De hecho, en otras patologías se proponen nuevos tratamientos enfocados en regular la actividad glial, en contra de las estrategias clásicas que tenían como diana controlar la hiperexcitabilidad de las neuronas (*Li et al., 2016*). Además, los astrocitos están implicados en los procesos inflamatorios y la muerte neuronal, las características más comunes de las enfermedades neurodegenerativas, y también de las fases tempranas de la epileptogénesis (*Henshall and Engel, 2013*). Por último, estas células están íntimamente ligadas al metabolismo cerebral, así que están implicados en varias funciones homeostáticas importantes que comprenden la supervivencia celular y el consumo de glucosa cerebral (*Attwell et al., 2010; Barros et al., 2018*), el cual, como ya hemos comentado, se ve alterado tras la epileptogénesis (Fig. 1.10).

#### 1.3.1. Excitabilidad y plasticidad sináptica

Durante muchos años se creyó que la comunicación química neuronal, o sinapsis, dependía sólo de las neuronas. Sin embargo, se ha demostrado que los astrocitos juegan un papel muy importante en la regulación de la transmisión sináptica, participando en lo que se denomina Sinapsis Tripartita (*Araque et al., 1999*). De esta forma, pueden responder a los neurotransmisores de la hendidura sináptica liberando gliotransmisores, como glutamato, adenosin trifosfato (ATP), adenosina, GABA y el factor de necrosis tumoral-alfa que pueden actuar en la neurona pre- o post-sináptica (*Araque et al., 2001; Haydon and Carmignoto, 2006; Navarrete et al., 2013*). La participación de los astrocitos reactivos en la modulación de la epilepsia tiene que ver con su capacidad de regular el glutamato extracelular y los niveles de potasio, ya que incrementan la excitabilidad neuronal y la susceptibilidad a las crisis (*Garzillo and Mello, 2002*). Durante las fases de la epileptogénesis, se producen alteraciones como cambios en los receptores GABA, AMPA y NMDA y cambios en la plasticidad sináptica, que promueven la hiperexcitabilidad (*Jabs et al.,*

2008). Por un lado, los principales canales de potasio en los astrocitos, Kir4.1, están disminuidos en la EH (Heuser et al., 2012; Das et al., 2012). Por otro lado, los astrocitos cuentan con transportadores de glutamato, EAAT, que también disminuyen en la EH (Binder and Steinhauser, 2021; Danbolt, 2001). Además, con las crisis también disminuye la glutamina sintetasa, que se encarga de metabolizar el glutamato, por lo que éste se acumula en astrocitos y el medio extracelular (Eid et al., 2004). Por último, los astrocitos tienen la capacidad de producir adenosina que cumple un papel inhibitorio a nivel pre-sináptico y que a largo plazo puede generar cambios epigenéticos que controlan la aparición de las crisis (Boison, 2012). Sin embargo, cuando aumentan los niveles de la adenosinquinasa, que metaboliza la adenosina, se traduce en un aumento de la excitabilidad y de las crisis (Binder and Steinhauser, 2021; Henning et al., 2023; Li et al., 2008).

Los astrocitos no tienen capacidad de responder a estímulos eléctricos de la misma forma que hacen las neuronas, ya que poseen un alto número de canales de potasio (Kir4.1) y menor expresión de canales voltaje dependientes, lo que impide la generación de cambios significativos en su potencial de membrana (Perea and Araque, 2005). Sin embargo, son capaces de responder al detectar neurotransmisores o iones del medio extracelular, respuesta que puede manifestarse con una elevación del calcio intracelular y que es responsable de liberar los gliotransmisores (Allen and Eroglu, 2017; Araque et al., 2000; Verkhratsky et al., 2016). De esta forma, una de las principales vías de comunicación entre astrocitos y neuronas es dependiente del calcio (Araque et al., 2014). La señalización de calcio está mediada a través del receptor para inositol 1,4,5-trifosfato (Ip3) de tipo 2 (Ip3r2) principalmente (Weerth et al., 2007), aunque también puede estar mediada por la permeabilidad a calcio o el intercambio de sodio/calcio (Brazhe et al., 2018). El aumento de la señal de calcio puede expandirse hasta células vecinas, funcionando como una señal de activación entre los astrocitos. Además, los astrocitos pueden captar el ATP del medio extracelular a través de receptores purinérgicos P2Y1 y responder elevando sus propios niveles de calcio (Bazargani and Attwell, 2016). Los astrocitos son capaces de modular la actividad de las crisis (Tian et al., 2005) y sus oscilaciones de calcio intracelular son un buen indicador de los cambios de la actividad glial en condiciones patológicas (Ujita et al., 2017). Un aumento de la frecuencia de las oscilaciones de calcio en los astrocitos se asocia con un aumento de las crisis (Fellin et al., 2006). Esto sugiere que la hiperactividad de estas células puede ser la responsable de que se generen las descargas paroxísticas hipocampales, tan relevantes en la ELT y que están mediadas por el glutamato que liberan los propios astrocitos (Carmignoto and Haydon, 2012).

### 1.3.2. Disrupción de la BHE y neuroinflamación

Como se comentó en apartados anteriores, los astrocitos se sitúan cerca de la BHE, y cubren con sus procesos o “pies” los capilares sanguíneos. De esta forma, son mediadores de todas las moléculas y sustancias que puedan pasar al Sistema Nervioso Central, por lo que se les atribuye un papel protector, también hacia la integridad de la BHE (*Jukkola et al., 2013*). La eficiencia de esta tarea depende de las uniones comunicantes (o *gap junctions*) que forman los astrocitos con la barrera y que permiten el paso de una cantidad limitada de moléculas (aquellas que puedan atravesar ese espacio estrecho). Cuando los astrocitos se dañan, la BHE se ve comprometida, sobre todo en condiciones patológicas. Por un lado, el daño en la BHE, permite el paso de moléculas de mayor tamaño, como la albúmina, que provoca cambios en Kir4.1, que, como ya hemos comentado, se asocia a un aumento de la excitabilidad (*Binder and Steinhauser, 2021; Henning, et al., 2023*). Por otro lado, durante la ELT, ya sea en humanos o en modelos animales, se ha observado un desacoplamiento de los astrocitos, lo que crea una disminución de esas uniones. Este efecto se ve sobre todo en los hipocampos que sufren esclerosis y no en los hipocampos contralaterales a la lesión. Esto provoca la acumulación del ion potasio en el medio extracelular, lo cual genera un aumento de la excitabilidad. Sin embargo, el desacoplamiento no se asocia a cambios en las proteínas de los astrocitos que están implicadas en las *gap junction*, como la conexina 43 y conexina 30. Curiosamente, la inhibición de las *gap junctions* tiene efectos en el metabolismo a corto plazo, cambiando la localización del transportador de glucosa 1 (GLUT1) y la hexoquinasa I (específicos de astrocitos), dedicados la incorporación y fosforilación de la glucosa en estas células. A largo plazo, puede aumentar la expresión de estos dos, pero además aumenta la expresión del transportador de glucosa 3 (GLUT3) y hexoquinasa II (específicos de neuronas) con el objetivo de internalizar y metabolizar grandes cantidades de glucosa (*Taberner et al., 2006*). Normalmente este efecto del desacoplamiento de astrocitos se debe a la acción de citoquinas pro-inflamatorias, algunas liberadas por los propios astrocitos, y que posteriormente generarán procesos inflamatorios mediados por otras células gliales, como la microglía. Del mismo modo, los astrocitos cuentan con una ruta anti-inflamatoria protectora ante las crisis. Por un lado, son capaces de almacenar glutatión, que es antioxidante y que puede generar energía para las neuronas si es necesario. Del mismo modo, durante las crisis, el aumento de la actividad neuronal promueve la actividad del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) en los

astrocitos, activando vías antioxidantes, antiinflamatorias y citoprotectoras, aumentando así la neuroprotección (*Purnell et al., 2023*).

Finalmente, en la EH también se ven cambios en la acuaporina 4. La acuaporina 4 pertenece a una familia de proteínas transmembrana que trasladan selectivamente moléculas de agua, y se localiza en los podocitos astrocitarios, por lo que controla los movimientos de agua en el cerebro. Por ello, se asocia a la formación edemas cerebrales, migración astrocitaria, actividad neuronal y adhesión entre astrocitos y células (*Nagelbus and Ottersen, 2013*). En la ELT hay un aumento general de estos canales en los astrocitos, pero una disminución en el nivel perivascular. La reducción perivascular modifica el paso del agua y del ion de potasio, lo que se relaciona con un aumento de las crisis (*Binder and Steinhauser, 2021; Henning, et al., 2023*).

### 1.3.3. Metabolismo cerebral

Aunque se ha demostrado la complejidad de los astrocitos y su implicación en el reciclaje de neurotransmisores y la sinaptogénesis, su localización entre la barrera hematoencefálica (BHE) y las neuronas les concede un rol principal a la hora de controlar la homeostasis cerebral. Por un lado, son capaces de detectar cambios en la sangre de pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> y pH, pudiendo modificar el flujo sanguíneo de acuerdo a las necesidades de las neuronas (*Attwell, et al., 2010; Barros et al., 2018; Gordon et al., 2007*). Por otro lado, cuentan con transportadores de glucosa específicos para detectar e incorporar esta molécula hacia su interior (*Marina et al., 2018*), convertirla en lactato a través de la vía glucolítica y aportar ese lactato a las neuronas como sustrato energético (*Bélanger et al., 2011*). GLUT1 está presente tanto en la BHE como en los astrocitos. Las neuronas presentan otro tipo de transportador llamado GLUT3, además del GLUT4 que es dependiente de insulina, situado en los axones y dendritas. La glucosa podría, por tanto, atravesar los capilares sanguíneos y difundirse por el medio extracelular, por los pies astrocitarios que tienen conexión con la BHE y luego por las neuronas (*Simpson et al., 2007*). Aunque poco se sabe sobre la preferencia de la glucosa por estos transportadores, se ha propuesto que GLUT3 tiene mayor afinidad por esta molécula (*Duelli and Kuschinsky, 2001; Peng et al., 2021; Simpson, et al., 2007*). De hecho, durante su estimulación, las neuronas obtienen la mayor parte de su energía a través de la oxidación de la glucosa, lo que genera una disminución de glucosa y un aumento del lactato intracelular (*Díaz-García et al., 2017*). Esto no es de extrañar,

ya que la glucosa siempre ha sido la molécula preferente en caso de hipoglucemia (Clarke, 1999). Además, un estudio reciente comprobó que las neuronas requieren captar glucosa a través de GLUT3 y metabolizarla por glicólisis, o por el contrario se producen déficits en la memoria. En este estudio comprobaron que GLUT3 no tiene la capacidad de responder a los niveles de glucosa extracelulares (al contrario que los GLUT1, que sí responden a la demanda del medio) y que por otro lado, un ratón *knock out* para este receptor no mostró cambios en el metabolismo medido con  $^{18}\text{F}$ -FDG PET, con lo cual se realza el papel de los astrocitos en la homeostasis de la glucosa, ya que sugiere que la glía es la responsable de la mayor parte de captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG, impidiendo la observación de la captación de la glucosa neuronal *in vivo* (Li et al., 2023).

Se ha comprobado que los cerebros humanos utilizan mayormente el consumo de lactato como fuente energética (Smith et al., 2003) ya que provee de energía a las neuronas (Schurr et al., 1999). Los astrocitos tienen transportadores de lactato específicos (MCT4, del inglés *monocarboxylate transporter 4*), que se transfiere a las neuronas a través de MCT2, siendo el transportador que garantiza el acceso del producto de la glicólisis de forma directa (Descalzi et al., 2019; Pellerin et al., 2007). Una de las diferencias entre astrocitos y neuronas es que los primeros presentan altos niveles de lactato deshidrogenasa 5, que permite la metabolización de piruvato a lactato, mientras que las segundas tienen lactato deshidrogenasa 1, que permite metabolizar el lactato a piruvato (Bittar et al., 1996). Esto indica la preferencia de los astrocitos para generar lactato y proporcionárselo a las neuronas, y la capacidad de las neuronas de usarlo para generar piruvato y usarlo en el ciclo tricarboxílico para obtener energía. Pero, por otro lado, los astrocitos también facilitan el paso de la glucosa a las neuronas, ya que pueden liberar la glucosa no metabolizada al medio extracelular para el consumo neuronal (Barros et al., 2017). Además, se ha encontrado que la glucosa en las neuronas es metabolizada por la vía de las pentosas, cuyos productos resultantes como la NADPH generan antioxidantes con carácter antiinflamatorio (Chen et al., 2019).

Durante las crisis, los astrocitos captan el glutamato de la hendidura sináptica para disminuir la excitabilidad neuronal, lo que conlleva un aumento de la glicólisis en los astrocitos, traduciéndose en un aumento de lactato y una disminución de glucosa a largo plazo, tal y como refleja la  $^{18}\text{F}$ -FDG PET en humanos y animales. Además, los astrocitos son capaces de almacenar glucógeno en fases interictales, que se metaboliza rápidamente en presencia de crisis para proveer de energía a las neuronas (Boison and Steinhäuser, 2018). El hipometabolismo que se observa en



Por otro lado, vías alternativas para mantener la energía cerebral parecen ser beneficiosas en la epilepsia. Aunque en un principio se recomendaba el ayuno para ayudar a controlar las crisis en epilepsias severas (*McGarry and Foster, 1980*), pronto descubrieron que una dieta alta en grasa y baja en carbohidratos, la dieta cetogénica, podría provocar el mismo efecto. Durante el desarrollo, el 30-70% de la energía cerebral viene del metabolismo de cuerpos cetónicos (*Nehlig, 2004; Page et al., 1971*). Los cuerpos cetónicos se metabolizan a través del ciclo TCA, mejorando la función mitocondrial. Esta dieta ha mostrado ser efectiva en la inhibición de crisis en epilepsias infantiles, pero en adultos con TLE es únicamente beneficiosa a largo plazo (*Boison and Steinhäuser, 2018*).

### 1.3.4. Manipulación selectiva de astrocitos

Muchas investigaciones han intentado modular la actividad de los astrocitos con varios métodos, desde la aplicación de agonistas (*Martin et al., 2015*) a técnicas de liberación de calcio (*Parpura and Zorec, 2010; Perea and Araque, 2007*). Las nuevas técnicas de manipulación celular, como la quimiogenética y la optogenética permiten un estudio de los astrocitos más específico.

La quimiogenética se basa en la implantación de receptores DREADDs, que traducidos del inglés corresponden a las siglas de Receptores Diseñados para ser Activados Exclusivamente por Fármacos Diseñados. Estos se activan cuando se exponen a fármacos específicos, como la clozapina-N-óxido (CNO) (*Roth, 2017*). Los DREADDs son receptores muscarínicos humanos para acetilcolina modificados, acoplados a proteínas G (GPCRs) (*Armbruster et al., 2007*). Entre ellos podemos encontrar cuatro familias diferentes (Fig. 1.11):

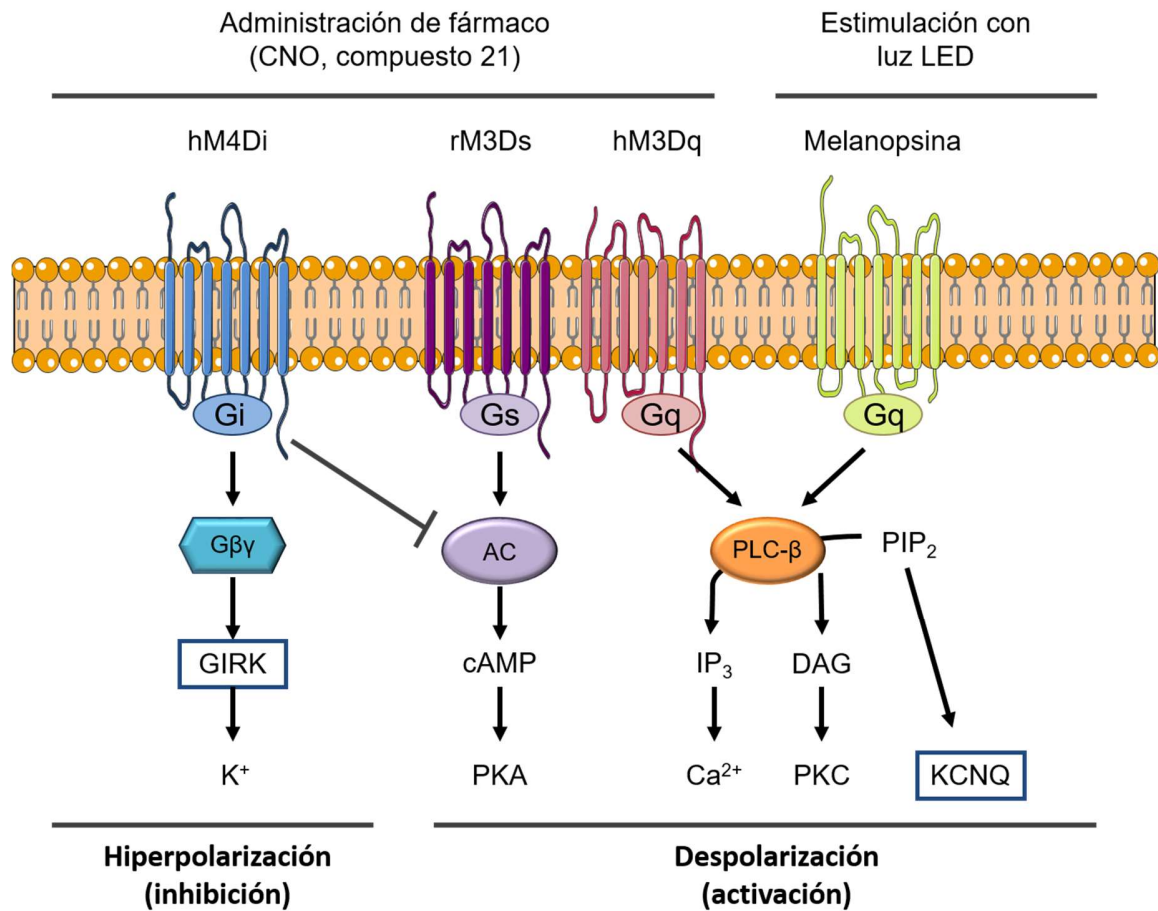
- i. Gq: proteína que activa la señalización de fosfatidilinositol
- ii. Gi: proteína que inicia los canales de potasio de rectificación interna de la proteína G e inhibe la enzima adenilciclase
- iii. Gs: activa la adenilciclase.
- iv. G12: asociado a la función citoesquelética

Los más comunes son el Gq, que corresponde al hM3Dq (receptor muscarínico 3 humano) y se asocia al incremento del calcio intracelular y por tanto a la despolarización y excitabilidad (*Roth, 2016; Urban and Roth, 2015*), y el Gi, de los cuales el más representativo es el hM4Dq (receptor muscarínico 4 humano) y que inhibe la actividad celular provocando la

hiperpolarización a través de la rectificación interna de la proteína G y la inhibición axonal para evitar la liberación de neurotransmisores (*Alexander et al., 2009; Katznel et al., 2014*). Los genes que codifican estos receptores se acoplan a un adenovirus bajo el promotor específico de astrocitos: la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *glial fibrillary acidic protein*) (*Agulhon et al., 2013*). Por otro lado, se ha demostrado que tanto los Gq como los Gi activan las mismas vías de calcio en los astrocitos y genera la liberación de gliotransmisores, lo que indica la complejidad de la respuesta astrocitaria en la señalización excitatoria e inhibitoria (*Durkee et al., 2019*). Varias publicaciones ya han demostrado que la activación quimiogénica de los astrocitos puede modular mecanismos celulares que producen alteraciones en el comportamiento (*Jones et al., 2018; Lim et al., 2021; MacDonald et al., 2020; Nwachukwu et al., 2021*) a través del aumento de la señalización de calcio astrocítico, que genera efectos diversos en otras células cerebrales (*Bonder and McCarthy, 2014; Shen et al., 2021*).

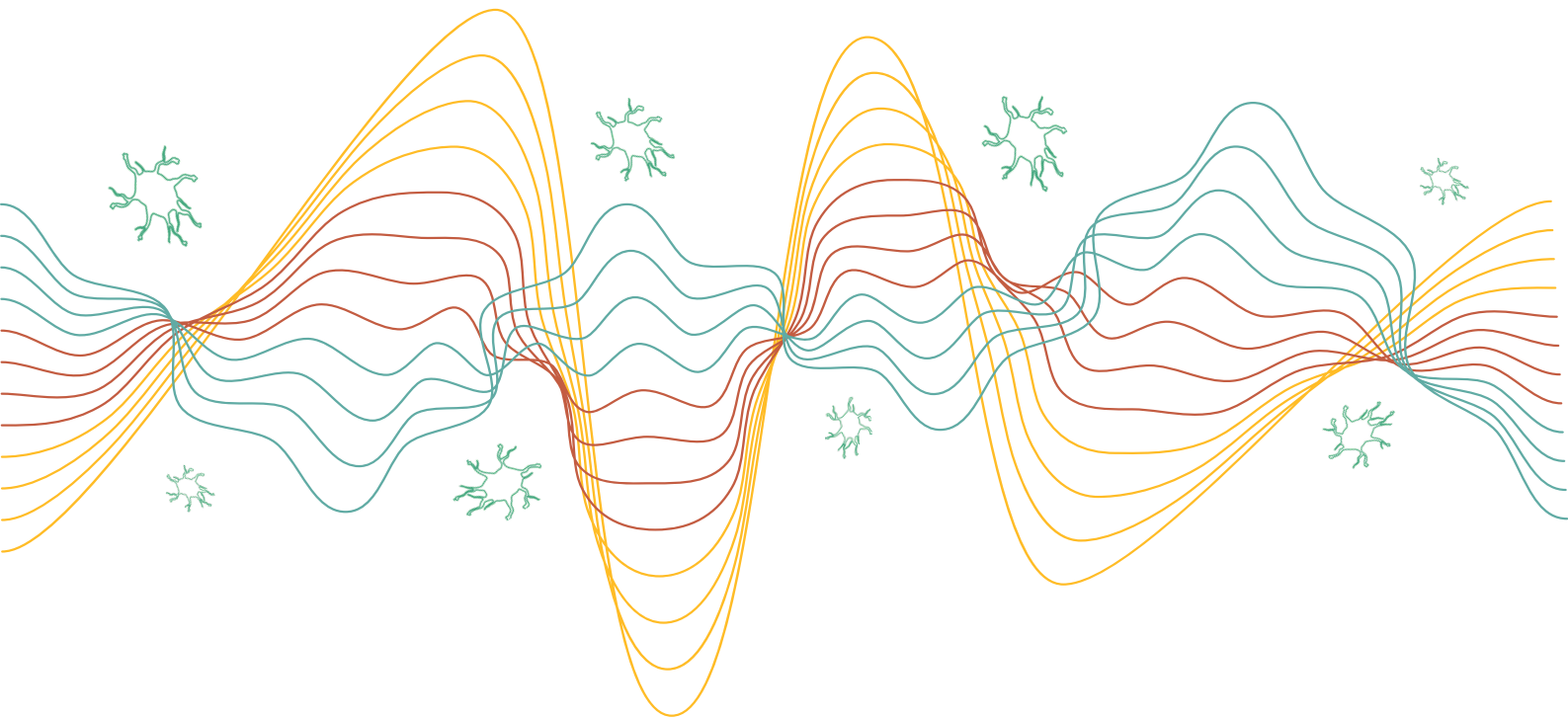
Aunque los DREADDs en astrocitos hayan sido probados con éxito, una de las desventajas de esta técnica es que, una vez inyectado el ligando, no se puede delimitar la duración de su acción, pudiendo activar los receptores hasta dos horas después (*Guettier et al., 2009*). Por ello, el campo de la Neurociencia precisaba una técnica con más resolución temporal que pudiera, del mismo modo, manipular la actividad de poblaciones celulares concretas.

La optogenética ha solucionado ese problema, ya que se basa en factores genéticos y en proteínas sensibles a la luz (opsinas) que, una vez son estimuladas con una luz de una longitud de onda específica, generan cambios estructurales en la proteína y apertura de canales iónicos o modificación de la señalización intracelular (*Zhang et al., 2011*). Esto permite la activación de las células únicamente cuando son excitadas por luz, con una gran mejora de la resolución temporal. Una de las opsinas más utilizadas en esta técnica es la rodopsina (*Nagel et al., 2003*), aunque otras investigaciones han desarrollado otras, también muy eficientes para la activación de los astrocitos, como la melanopsina (MLN) (*Mederos et al., 2019*).



**Figura 1.11. Representación de diferentes receptores para quimiogénica y optogénica, sus ligandos y su efecto celular.** A la izquierda, la señal Gi activa canales de potasio GIRK, provocando la hiperpolarización e inhibición celular. Además, también puede inhibir la adenil ciclasa (AC) que promueve la formación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y la activación de la proteína quinasa A (PKA), que es la vía de despolarización que provoca la activación del receptor rM3Ds. A la derecha, se observan los mecanismos de despolarización: Gq activa la fosfolipasa C beta (PLC-β), la cual hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) and diacilglicerol (DAG). Esto provoca un aumento de los niveles de calcio (Ca<sup>2+</sup>) o la proteína quinasa C (PKC). La reducción de PIP<sub>2</sub> además provoca el cierre de los canales KCNQ causando la despolarización de la célula.

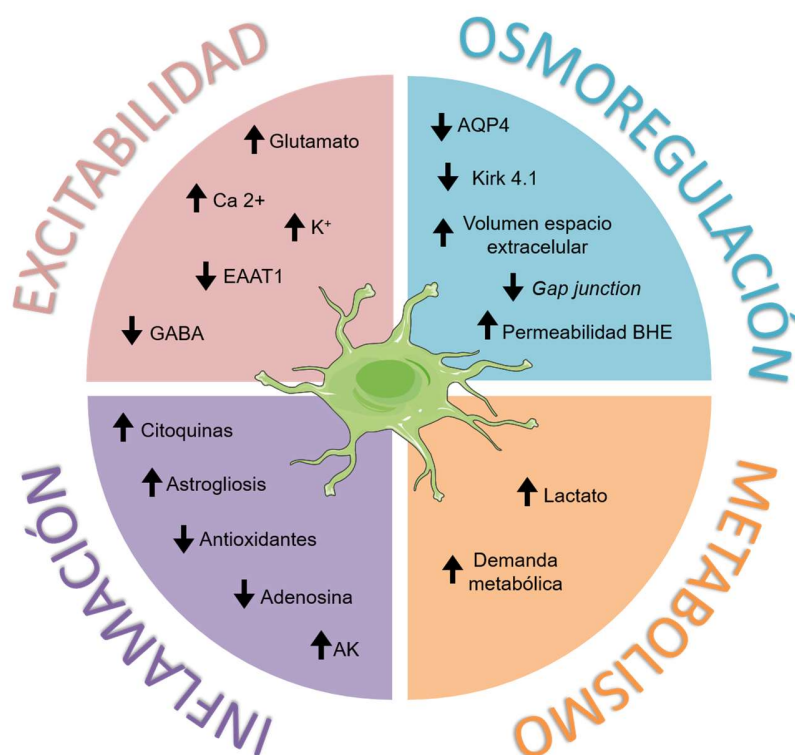
- CAPÍTULO 2 -  
**OBJETIVOS**





## 2. OBJETIVOS

Sólidas evidencias experimentales indican que existe una comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas que permite la regulación de procesos como la transmisión sináptica, la excitabilidad y el metabolismo cerebral. En base a estos datos, nuestra hipótesis de trabajo propone que la activación de la astrogliá está implicada en la epileptogénesis, contribuyendo a la transformación de un circuito neuronal normal en uno hiperexcitable, y favoreciendo los mecanismos de neuroprotección. Estos cambios provocados por los astrocitos pueden tener implicaciones terapéuticas en la epilepsia (Fig. 2.1).



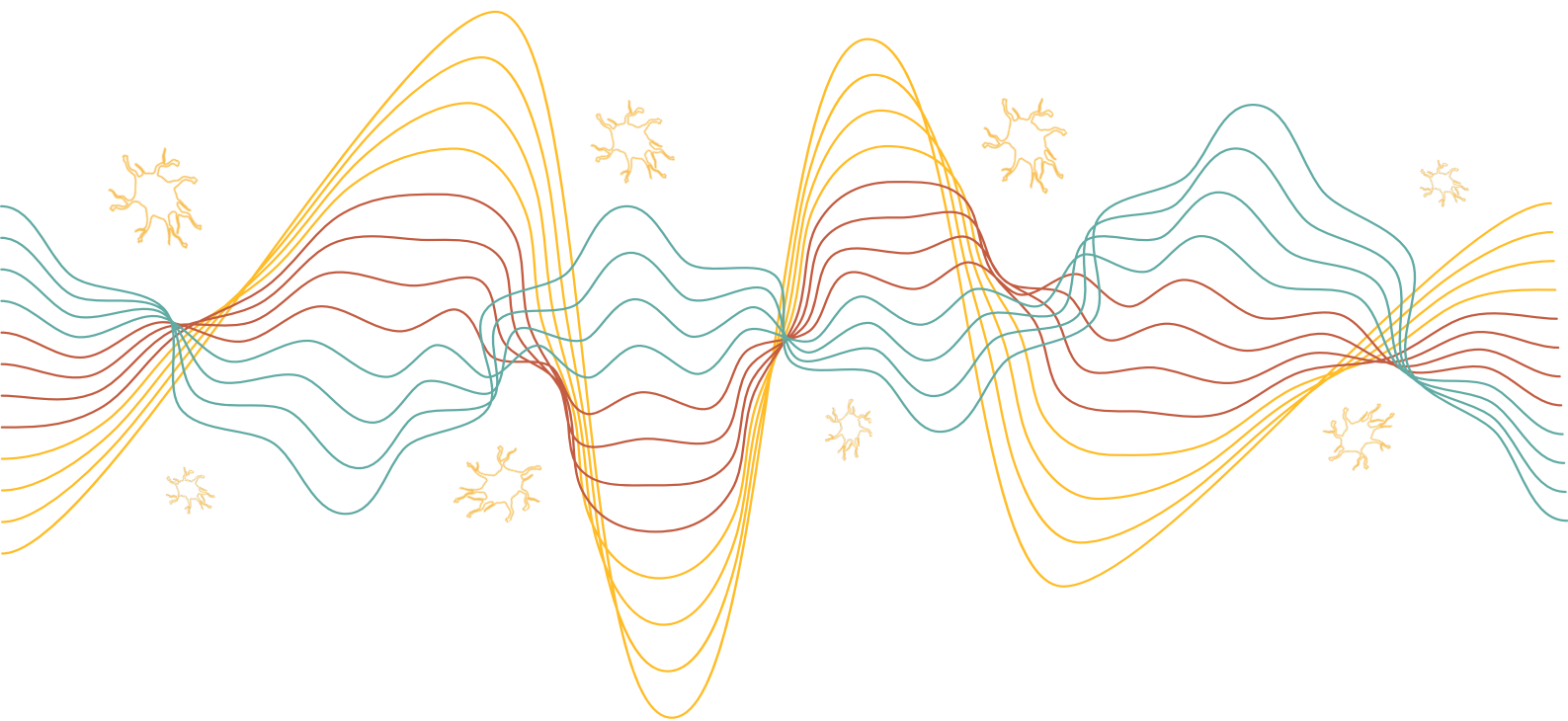
**Figura 2.1. Resumen de la implicación de los astrocitos en la epilepsia.** Los astrocitos están implicados en varias funciones que afectan a la osmoregulación, excitabilidad, inflamación y metabolismo cerebral durante la epilepsia.

Por lo tanto, la presente tesis tiene como objetivo general investigar el rol de los astrocitos en el origen y progresión de la actividad epileptiforme, así como las consecuencias metabólicas y neuroprotectoras asociadas a su activación

Para la consecución de este objetivo general se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Investigar el efecto de la activación de los astrocitos en el metabolismo cerebral. Para ello utilizamos estudios de neuroimagen PET y técnicas de quimiogenética.
- Determinar los posibles mecanismos celulares y moleculares implicados en los cambios metabólicos inducidos por la activación de los astrocitos. Para llevar a cabo este objetivo, se utilizaron animales modificados genéticamente para evaluar el papel de la señalización de calcio intracelular ( $Ip3r2^{-/-}$ ) y el transportador de glucosa astrocitario GLUT1 ( $GLUT1^{\Delta GFAP}$ ) así como técnicas de RMN HR-MAS.
- Estudiar el rol de los astrocitos en los cambios metabólicos asociados al proceso de epileptogénesis secundario a una crisis convulsiva prolongada (SE). Para ello, utilizamos el modelo de epilepsia inducida por la inyección de KA iHPC, técnicas de neuroimagen PET, electrofisiología, quimiogenética, optogenética y estudios de comportamiento.
- Determinar el efecto de la activación de los astrocitos sobre el daño neuronal, neurodegeneración y neuroinflamación durante epileptogénesis secundaria al SE inducido por KA. Para la consecución de este objetivo, se combinaron técnicas de histología, inmunofluorescencia, autorradiografía, RMN HR-MAS, quimiogenética y optogenética.

- CAPÍTULO 3 -  
MATERIAL Y MÉTODOS





# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Todos los protocolos y procedimientos experimentales descritos en esta tesis se realizaron de acuerdo con la legislación española vigente (RD53/2013), las Directivas del Consejo de Europa de 2010 (2010/63/UE) para la investigación animal, y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Complutense de Madrid. Durante esta tesis doctoral se tomaron las medidas necesarias y se realizaron todos los esfuerzos para minimizar, dentro de lo posible, el número de los animales de experimentación y su sufrimiento.

## 3.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones CD1, C57BL/6J (Charles Rivers Laboratories, Sant Cugat del Vallès, España), *Ip3r2<sup>-/-</sup>* (ratones *knock out*, sin el receptor *Ip3* del retículo endoplásmico en las células, cedidos amablemente por G. Perea) y *GLUT1<sup>ΔGFAP</sup>* (ratones *floxeados*, para poder eliminar *GLUT1* específicamente de los astrocitos, en colaboración con M. Solas). A su llegada, los animales fueron estabulados en grupos de 5 en jaulas estandarizadas acopladas a un rack ventilado (Tecniplast, Buguggiate, Italia) en una sala con temperatura y humedad controladas ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $>25\%$ ) y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con acceso libre a alimento estándar (Safe, Augy, Francia) y agua. Tras su llegada los animales tuvieron una semana para aclimatarse a su nuevo hábitat, durante la cual se les manipuló para promover la habituación al manejo por parte del investigador, con el fin de reducir el estrés asociado con los procedimientos. Todos los experimentos tuvieron lugar entre las 08:00 h y las 16:00 h para reducir la influencia del ritmo

circadiano. Para los experimentos de caracterización del modelo de epilepsia se utilizaron sólo ratones machos para reducir la variabilidad experimental.

## 3.2. Preparaciones quirúrgicas

### 3.2.1. Infecciones virales

Los animales fueron anestesiados con isoflurano (5% en oxígeno para inducción y 1-2% para mantenimiento, a un flujo de 0,8 l/min), colocados en un marco estereotáxico (Stereotaxic Stoelting, Illinois, EEUU) y sus ojos fueron protegidos con gel para evitar la sequedad y posibles lesiones. Los signos vitales (temperatura y respiración) fueron controlados con un Sistema de monitorización para pequeños animales (MR-Compatible, Model 1025, Psymtec, Madrid, España). La cabeza fue afeitada y se aplicó una fina capa de benzocaína (1 mg) en la línea media como anestesia local. Tras una espera de dos minutos y una vez se comprobó que no había reflejos de dolor en el animal, se realizó una incisión con un bisturí para exponer el cráneo y se retiró el periostio. Se comprobó la alineación de bregma y lambda para después localizar las coordenadas del área CA1 en el hipocampo dorsal desde bregma (AP -2,1; LM  $\pm$ 1,6; DV -1,5), según el atlas de George Paxinos y Keith Franklin (*Paxinos and Franklin, 2012*). Una vez fijadas las coordenadas se trepanó el cráneo perforando la calota con un minitaladro (Foredom Electric, Connecticut, USA) hasta que la duramadre quedó expuesta. Los vectores virales fueron inyectados usando una jeringa Hamilton de 2  $\mu$ l (Microliter Syringe Model 7002 ref. 88411, Hamilton Company, Nevada, EEUU) con una aguja de 34 gauges conectadas a un microinyector estereotáxico (53311, Stoelting, Illinois, EEUU). La inyección fue bilateral con un volumen de 0,5  $\mu$ l en cada hipocampo a una velocidad de 0,5  $\mu$ l/min. Una vez finalizó la inyección, se esperó un tiempo de 2 minutos antes de retirar la jeringa para favorecer la correcta difusión de los virus y para prevenir el flujo retrógrado hacia la aguja. Finalmente, se suturó la piel de los animales, se les aplicó povidona yodada (100 mg/ml) y se depositó en una jaula sobre una manta térmica hasta que despertaban de la anestesia. La duración total de este procedimiento fue de 20-25 minutos por animal. Se dejó un plazo de dos semanas para que los animales se recuperaran antes de realizar otros procedimientos.

Los virus inyectados para los experimentos de quimiogenética fueron DREADDs (pAAV-GFAP-hm3D(Gq)-mCherry Titer:  $1,2 \times 10^{13}$  GC/ml, 0,5  $\mu$ l) de forma bilateral. En los

animales GLUT1<sup>ΔGFAP</sup>, al tratarse de un animal *floxeado* condicionalmente, se canceló la expresión de GLUT1 localmente en el hipocampo, inyectando un virus GFAPCre (AAV2/5-GFAP104-cre-mCherry; viral titer 2,8x10<sup>12</sup>, 0,5 μl) junto con los virus DREADDs, por lo que el volumen total de la inyección fue 1 μl a una velocidad de 1 μl/min.

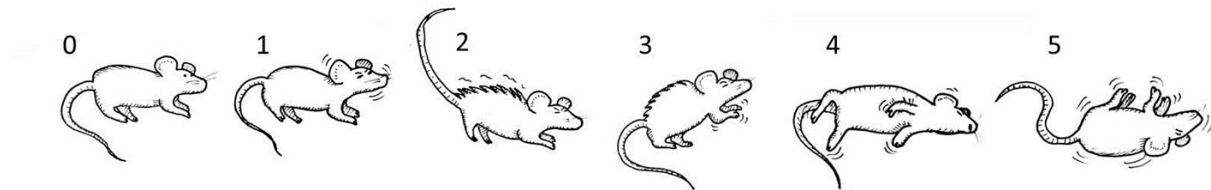
Para los experimentos de optogenética se inyectó sólo en el hipocampo derecho MLN (AAV2/5-GFAP104-melanopsin-mCherry; Titer 2,8x10<sup>12</sup>, 0,5 μl) (Mederos, *et al.*, 2019) o sólo el salino como control.

### 3.2.2. Inducción de la epilepsia

El modelo de epilepsia conlleva una cirugía estereotáxica para la inyección de una concentración 2 mM de KA (Merck Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), que corresponde a 0,213 μg en 0,5 μl de solución salina, en el área CA1 del hipocampo. El procedimiento de la cirugía es similar a la inyección de virus, salvo que esta vez no se trepanó el cráneo y se utilizaron los orificios de la cirugía anterior para asegurar que la inyección de KA se realizaría en el mismo lugar de la infección vírica. El KA se inyectó de forma unilateral en el hipocampo derecho y en los animales controles se inyectó solución salina. La inyección se hizo a una velocidad de 0,5 μl/min y la Hamilton no se retiró hasta los 2 minutos de reposo correspondientes. La duración del procedimiento era de unos 20-25 minutos. Para algunos experimentos, a este procedimiento quirúrgico se le añadía la implantación de un electrodo o una cánula que se describen en los siguientes apartados aumentando la duración del procedimiento a 40 minutos.

Una vez el animal despertaba en la jaula sobre la manta eléctrica se observaba detenidamente su conducta para valorar los efectos del SE en función de la escala de Racine (Racine, 1972). La escala se divide en los siguientes niveles (Fig. 3.1):

- 0- Inmovilidad.
- 1- Movimientos faciales y cabeceo.
- 2- Ondas convulsivas a través del cuerpo. Piloerección y cola erguida.
- 3- Sacudidas mioclónicas en extremidades anteriores.
- 4- Convulsiones clónicas en todas las extremidades. Caída sobre un lado.
- 5- Convulsiones tónico-clónicas en todo el cuerpo. Caída sobre la espalda.



**Figura 3.1. La escala de Racine.** Las imágenes numeradas muestran las características comportamentales de las crisis epilépticas por cada nivel de severidad. La amplitud de observación de estos niveles se puede ver modificada por el tipo de modelo epiléptico.

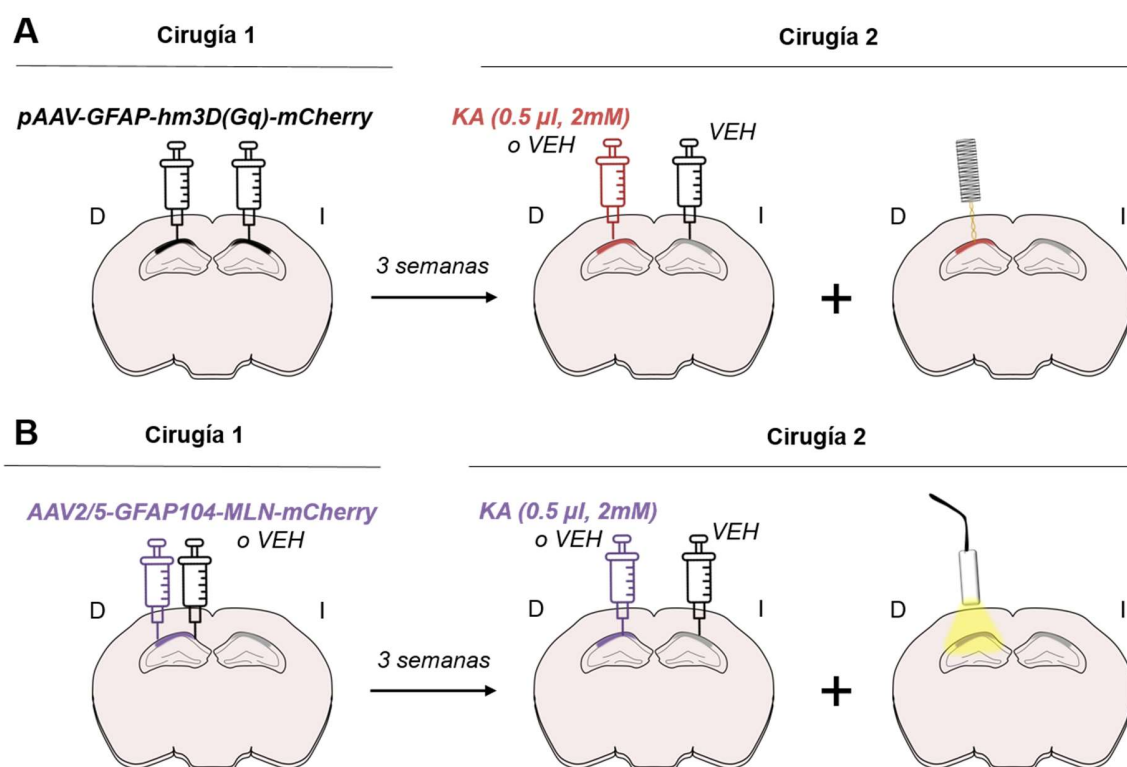
Tras las crisis, el animal puede mostrar inmovilidad que se corresponde con el período postictal. La recuperación se reconoce cuando el animal comienza a realizar conductas exploratorias. Se valoró el tiempo que transcurrió entre la hora de la inyección y la hora de finalización de la anestesia y el SE, entendido como la conducta que llegaba a los niveles 4 o 5 de la escala. Aquellos animales que no llegaron a SE en las primeras horas tras la inyección fueron excluidos del análisis, ya que, aunque el SE puede producirse hasta 24 horas después de la inyección y ocurrir cuando el animal no está bajo observación (durante la noche), no podíamos garantizar la efectividad del modelo.

### 3.2.3. Implantación de electrodo

Los electrodos sólo fueron implantados en un subgrupo de animales a los que se les inyectó KA para la caracterización de la señal EEG. La implantación del electrodo se llevó a cabo durante el mismo procedimiento quirúrgico de la inyección de KA. Una vez se retiraba la Hamilton y tras asegurarse de que la superficie estuviera seca, un electrodo bipolar (MS333/1-BIU/SPC, Bilaney Consultans, Dusseldorf, Alemania), que previamente fue recortado para que se acoplara a la profundidad de la zona de registro, se implantó en el mismo orificio de la inyección de KA. Se realizó una perforación adicional en el hemisferio contralateral para añadir un tornillo de sujeción (Screw-Holding PlasticOne, Texas, EEUU), que se usó como tierra y como soporte para ayudar a fijar el pedestal del electrodo. Finalmente, se aplicaron dos capas de cemento dental y una vez endurecida la mezcla se suturaron mínimamente los extremos de la incisión para terminar de cerrar la exposición del cráneo y así evitar posibles infecciones. La correcta localización del electrodo se constató con la imagen CT que se adquirió durante los estudios de neuroimagen.

### 3.2.4. Implantación de fibra óptica

Para los experimentos de optogenética, se implantó una fibra óptica de  $\text{Ø}200\ \mu\text{m}$ , 0,50 NA (FP200URT, Thorlabs, Dachau, Alemania) acoplada con una férula de cerámica de  $\text{Ø}1,25\ \text{mm}$  (CFMLC52U-20, Thorlabs, Dachau, Alemania), que fue recortada previamente con una punta de diamante para adaptarla a la profundidad de forma apropiada. El método fue similar a la implantación del electrodo: se situó la fibra óptica donde previamente se había inyectado MLN y KA o sus vehículos, se añadió un tornillo para tener una sujeción adecuada y se cementó toda la estructura. Se suturó la piel casi por completo dejando que sólo sobresaliera la férula. El resumen de los métodos quirúrgicos se detalla en la figura 3.2.



**Figura 3.2. Representación esquemática de los procedimientos quirúrgicos.** **A.** Muestra de las cirugías de los experimentos con quimiogenética, con la inyección de los DREADDs el día 1 y de KA el día 2. La cirugía del día 2 comprendía la implantación del electrodo si se destinaba a los experimentos de EEG. **B.** Las cirugías de los experimentos de optogenética se dividían en un día de inyección de MLN o VEH y otro día para la inyección de KA y la implantación de la fibra óptica.

### 3.3. Tratamientos

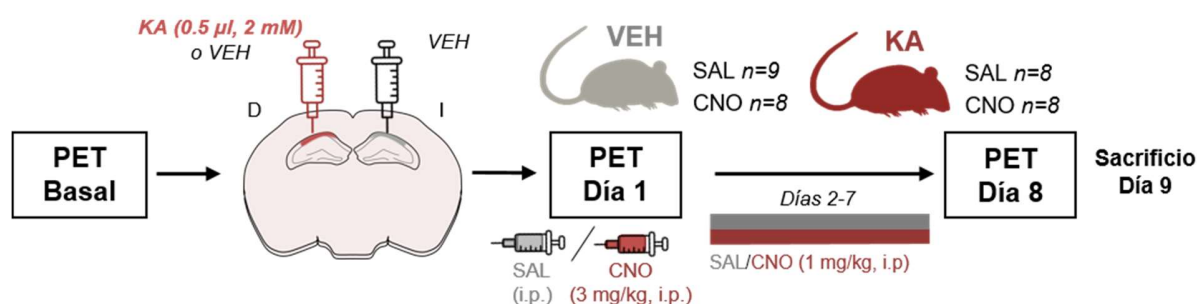
#### 3.3.1. Diazepam

En algunos grupos experimentales del KA iHPC se utilizó una dosis de diazepam (DZP, 10 mg/kg, i.p.), para detener el SE una hora después de que comenzaran los signos comportamentales, ya que este fármaco ya se ha usado para detener los crisis en otros modelos animales de epilepsia (Töllner *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019). Los cuatro grupos experimentales resultantes fueron: dos con epilepsia, (KA+DZP, n=9; KA+SAL, n=15) y dos controles (VEH+DZP, n=6; VEH+SAL, n=9), a los que se administró solución salina o DZP.

#### 3.3.2. Quimiogenética

La activación de los DREADDs localizados en los astrocitos en la imagen PET se realizó con clozapina (CZP 0,3 mg/kg i.p., Merck Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) y con CNO (3 mg/kg i.p., Merck Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), y se comparó el efecto de cada tratamiento con una medida control tras una inyección de solución salina, ya que se ha discutido efectividad de ambos fármacos (Gomez *et al.*, 2017). En estos experimentos, cada animal fue su propio control, ya que todos recibieron todos los tratamientos en diferente orden, para evitar un posible efecto de la interacción de los fármacos. De esta forma, cada animal tiene 3 estudios de PET, realizados uno por semana, con tratamientos balanceados. Estos experimentos se realizaron en ratones CD1 (n=10) y C57BL/6J (n=9) (Fig. 3.3).

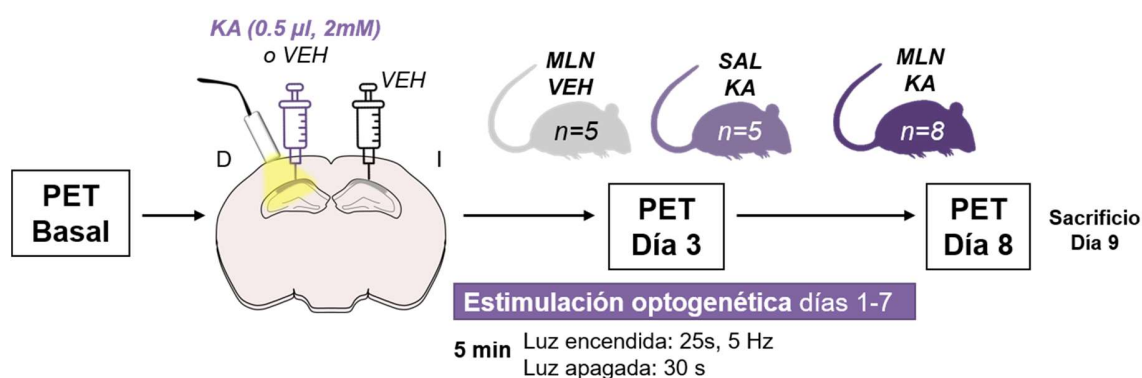
Para valorar el metabolismo cerebral con el PET, el tratamiento se realizó tras la inyección de KA iHPC desde los días 1 al 7, inyectando CNO (3 mg/kg i.p.) sólo el día 1 y CNO (1 mg/kg i.p.) los días del 2 al 7. Cuando el tratamiento coincidía con el día de un estudio PET, la inyección se realizó 10 minutos antes de la <sup>18</sup>F-FDG, para asegurar que la incorporación del radiotrazador coincidiera con la concentración máxima del fármaco en sangre. Por otro lado, cuando coincidía con la evaluación conductual, se inyectaba 30 minutos antes del test. Los grupos experimentales fueron: VEH+SAL (n=9), KA+SAL (n=8), VEH+CNO (n=8) y KA+CNO (n=8). Por otro lado, para caracterizar la señal de EEG en el modelo de epilepsia, se utilizaron ratones *Ip3r2<sup>-/-</sup>* (n=4) y ratones WT inyectados con DREADDs tratados con solución salina (n=4) o con CNO (n=6).



**Figura 3.3. Esquema del tratamiento con quimiogenética.** Se realizaron 3 estudios PET, 1 antes, 2 tras la inyección del KA (el día 1 y 7). El tratamiento con solución salina o CNO se realizó entre los días 1 y 7.

### 3.3.3. Optogenética

Para la estimulación optogenética, se acopló un cable de fibra óptica (M95L01, Thorlabs, Dachau, Alemania) en la una férula de cerámica previamente implantada en el animal, a través de un acoplamiento (ADAL 1-5, Thorlabs, Dachau, Alemania). El otro extremo del cable se conectó una fuente de luz LED azul (473 nm, LEDD1B, M00537361, Thorlabs, Dachau, Alemania) conectada a un estimulador (S48 Stimulator, Grass Instruments, Massachusetts, EEUU) para adaptar los pulsos del haz de luz una frecuencia de 5 Hz. La estimulación se realizó por pulsos de luz de 25 s ON y 35 s OFF durante 5 minutos. Si el tratamiento coincidía con un estudio PET, este se realizaba a los 5 minutos después de la inyección del radiotrazador para valorar los efectos de la estimulación en su incorporación. Los grupos experimentales fueron: un grupo control sin MLN (SAL+KA, n=5), y dos grupos con MLN, MLN+VEH (n=5), y MLN+KA (n=8). Todos recibieron el tratamiento de estimulación con luz (Fig. 3.4).



**Figura 3.4. Esquema del tratamiento con optogenética.** Se realizaron 3 estudios PET, 1 antes, 2 tras la inyección del KA (el día 3 y 7). El tratamiento de estimulación con luz se realizó entre los días 1 y 7.

### 3.4. Neuroimagen $^{18}\text{F}$ -FDG PET

Los estudios de neuroimagen funcional se desarrollaron en un equipo híbrido PET/CT dedicado a animales pequeños (Albira ARS PET/CT dual scanner, Bruker, Rheinstetten, Alemania), localizado en la Instalación Científica y Técnica Singular (ICTS) BIOIMAC perteneciente a la Universidad Complutense de Madrid. Las imágenes PET fueron reconstruidas usando un algoritmo *maximum likelihood expectation maximization* (MLEM, 12 iteraciones) y aplicando correcciones de *scatter*, *random* y de *decay*. El CT (400  $\mu\text{A}$  y 45 kV) se reconstruyó con un algoritmo con filtro de gran resolución (*filtered back projection*, FBP).

Previo a los estudios, los niveles de glucosa en sangre fueron medidos de la vena caudal del animal antes de la inyección del radiotrazador. Dado el tiempo de exposición a la anestesia, los ojos del animal fueron protegidos con gel para evitar sequedad y lesiones.

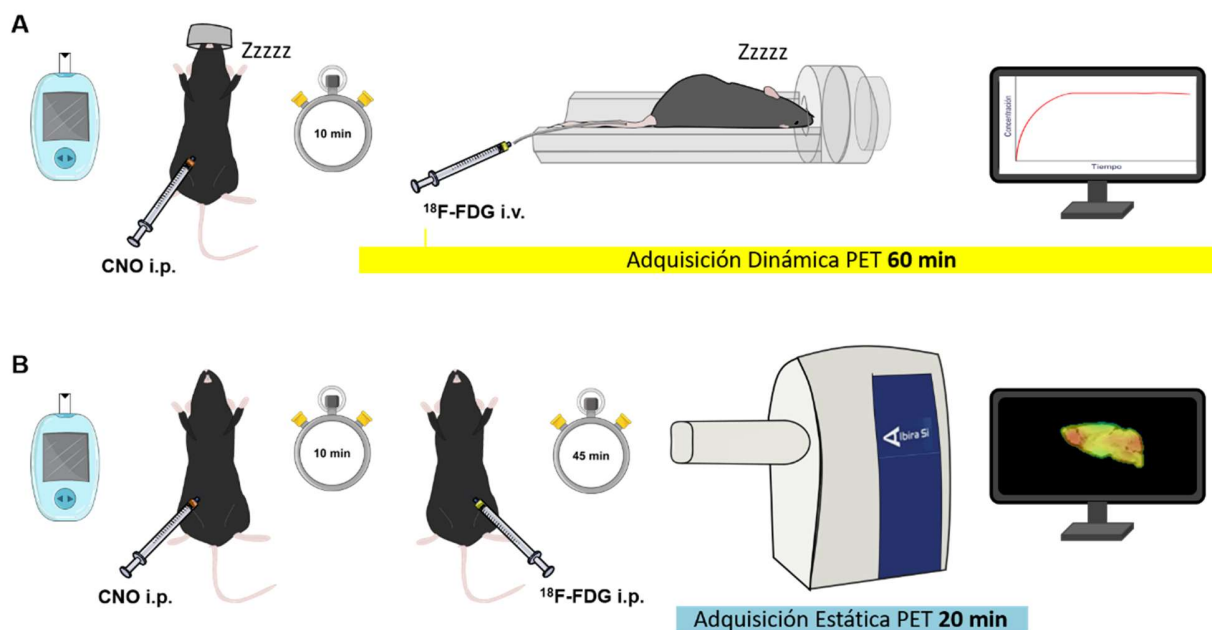
#### 3.4.1. Estudios dinámicos

Estos estudios se realizaron en los experimentos que buscaban valorar los cambios que provoca la activación de los astrocitos en la incorporación de la  $^{18}\text{F}$ -FDG. Cada animal tiene al menos dos estudios en los que se les inyectó solución salina (control) o CNO. Los animales se anestesiaron con isoflurano (2% en oxígeno) y se cateterizaron a través de la vena dorsal de la cola con una aguja de 34G conectada a una cánula. Seguidamente fueron introducidos en el equipo para realizar una adquisición de 60 minutos y tras una espera de 10 segundos (para fijar el valor 0 al inicio de la curva) se inyectó el radiotrazador ( $^{18}\text{F}$ -FDG, aprox. 5,55 MBq en o 150  $\mu\text{Ci}/200\ \mu\text{l}$  salino, i.v., Curium Pharma, Madrid, España) a través de la cánula. Tras el periodo de la adquisición del PET, se adquirió la imagen CT durante 10 min (Fig. 3.5). Para los estudios dinámicos, la reconstrucción iterativa del PET dividió la adquisición de 60 minutos en 32 *frames* (o ventanas temporales) de  $5 \times 2\ \text{s}$ ,  $4 \times 5\ \text{s}$ ,  $3 \times 10\ \text{s}$ ,  $8 \times 30\ \text{s}$ ,  $5 \times 60\ \text{s}$ ,  $4 \times 300\ \text{s}$  y  $3 \times 600\ \text{s}$ .

#### 3.4.2. Estudios estáticos

Estos estudios se realizaron en los experimentos de valoración del metabolismo cerebral en el modelo de epilepsia. Cada animal tiene tres estudios: uno basal anterior a la inyección de KA (día -1) y dos posteriores a la inyección (días 1 y 8). En los experimentos con optogenética los estudios se realizaron el día -1, 3 y 8. Los animales permanecieron en ayunas durante al menos

8 horas previas al estudio. Después, se les inyectó la dosis del radiotrazador  $^{18}\text{F}$ -FDG (aprox. 5,92 MBq en o 160  $\mu\text{Ci}$ /200  $\mu\text{l}$  salino i.p., Curium Pharma, Madrid, España). Tras 45 minutos de incorporación del radiotrazador, el animal se anestesió con isofluorano inhalatorio (2% en oxígeno) y se introdujo en el escáner donde se realizó una adquisición PET de 20 minutos y un CT de 10 minutos (Fig. 3.5).

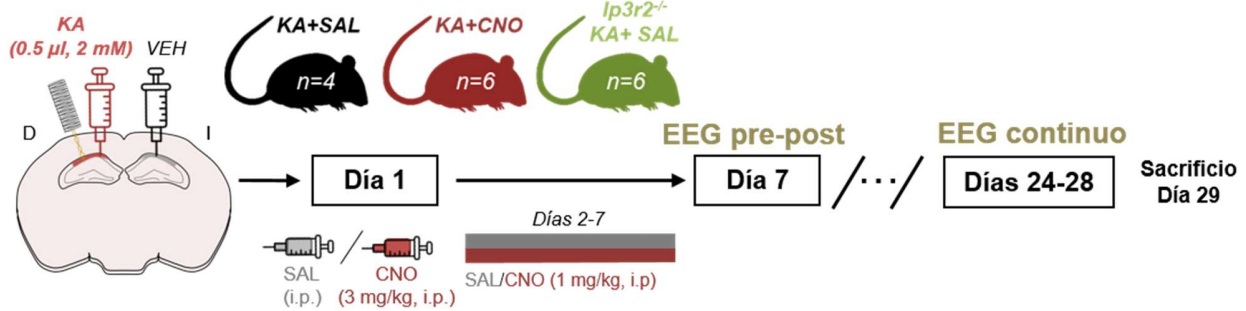


**Figura 3.5. Método de los estudios de imagen PET.** **A.** Representación del método de los estudios dinámicos. Tras la medida de glucosa inicial, se anestesia al animal, se canula en la vena dorsal y se le inyecta el tratamiento. Después se coloca en la camilla del escáner y se inicia el estudio antes de inyectar el radiotrazador. El resultado son las ratios de incorporación de la glucosa. **B.** Representación del método de los estudios estáticos. Tras medir la glucosa, se administra el CNO y 10 minutos después se inyecta el radiotrazador, que será incorporado con el animal despierto durante 45 minutos. Posteriormente, se realiza el estudio PET cuyo resultado es la imagen de la incorporación final de la glucosa.

### 3.5. Electrofisiología *in vivo*

Los animales implantados con electrodos intrahipocampales fueron registrados el día 1, día 7 (durante el tratamiento) y días 24-28 (etapa crónica) tras la inducción del modelo de KA. En los días 1 y 7, primero se adquirió un registro EEG basal de 30 minutos y seguidamente se realizaba otro de la misma duración en el cual se inyectaba el tratamiento al inicio del registro. En la etapa crónica se registró a los animales de forma continua durante cuatro días seguidos (del día 24 al día 28). Los animales utilizados para este experimento se clasificaron en los

siguientes grupos: grupos inyectados con DREADDs y tratados con solución salina (KA+SAL, n=4) o CNO (KA+CNO, n=6), y un grupo adicional de ratones  $Ip3r2^{-/-}$  (n=6), para valorar el papel de la movilización de calcio en el modelo de epilepsia, a los que se les trató con solución salina (Fig. 3.6).



**Figura 3.6. Esquema del tratamiento en los experimentos de electrofisiología.** La figura representa localización de las inyecciones y posición del electrodo, los grupos experimentales y el tratamiento con solución salina (SAL) o CNO. Los ratones  $Ip3r2^{-/-}$  fueron tratados con SAL y operados con una inyección de vehículo tres semanas antes, para igualar las condiciones de los otros grupos experimentales. Los registros de 30 minutos se hicieron el día 7 antes y después de la inyección de tratamiento. Durante los días 24 y 28 se realizaron registros de forma continuada.

Los registros EEG se realizaron con los animales despiertos y moviéndose libremente en un recipiente circular dentro de una jaula Faraday para disminuir las interferencias electromagnéticas. La señal fue amplificada 1000 veces (1000x), filtrada entre 0,03 y 300 Hz (P55 AC, Grass Instruments; Rhode Island, EEUU) y digitalizada a través de un sistema de adquisición de datos (e-corder E-410, eDAQ; Denistone East, Australia) a una velocidad de muestreo de 1 kHz. Para el procesamiento y análisis de la señal se utilizó el software e-DAQ Chart (eDAQ; Denistone East, Australia). La actividad del EEG se clasificó como una crisis epiléptica cuando cumplía los siguientes criterios: i. tener un comienzo y final abrupto, ii. una frecuencia igual o superior a los 5 Hz y iii. una amplitud tres veces superior a su línea basal. La actividad interictal o eventos paroxísticos se definieron como crisis cuando su duración superaba los 20 s y estaban separados por intervalos de 5 s, o como “trenes de espigas” si duraban menos de 20 s (Smith et al., 2018).

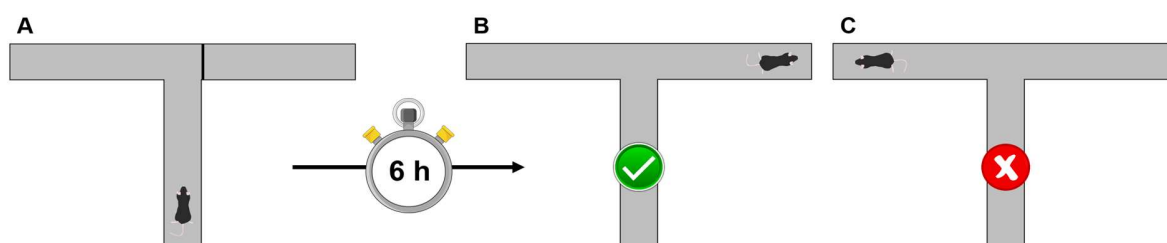
## 3.6. Paradigma conductual

Todas las pruebas conductuales se realizaron los días 9-10 tras la inducción del modelo de KA. Se ejecutaron en una habitación contigua al estabulario para que se mantuvieran las condiciones del entorno habitual, en la cual los animales estuvieron 15 minutos aclimatándose antes del comienzo del test. El instrumental fue limpiado con etanol 70% después de cada uso. La conducta del animal fue grabada para evitar la presencia del experimentador en la habitación.

### 3.6.1. Laberinto en T

Se utilizó un laberinto en T, ya que nuestra área principal de estudio, el hipocampo, se relaciona con el paradigma cognitivo relacionado con la memoria y en la orientación espacial en el animal, en el que se valoraba su condición natural para dirigirse a un camino que no había explorado previamente (*d'Isa et al., 2021*). Se procuró que la iluminación del laberinto fuera homogénea para no crear zonas de sombra. Así mismo, se valoraron los elementos situados en torno al laberinto que pudieran servir a los animales como claves visuales para la orientación. Los experimentos contaban con una fase de habituación al test y al entorno y una fase de test posterior, separadas por un periodo de 6 horas (Fig. 3.7).

- Fase de habituación: el animal se colocó en la base de la T (brazo de inicio, 46x11x10 cm) y se le permitió explorar libremente sólo un brazo del laberinto (80x11x10 cm) durante 5 minutos, mientras el otro se mantenía cerrado.
- Fase de test: 6 horas después de la fase de habituación, se colocó al animal en el punto de inicio del laberinto esta vez con ambos brazos abiertos, para valorar su interés por el brazo no explorado anteriormente.



**Figura 3.7. Prueba de laberinto en T.** A. El animal puede explorar libremente sólo uno de los brazos durante 5 minutos. 6 horas después se realiza el test. Si el animal recuerda el brazo explorado se dirigirá al contrario (B) y si no lo recuerda permanecerá en el brazo conocido (C).

### 3.6.2. Test de rotarod

Por otro lado, para valorar el posible efecto del tratamiento crónico con CNO en el sistema dopaminérgico (ya que es un fármaco derivado de la CZP) se utilizó el test de rotarod, que permite evaluar la coordinación motora y el equilibrio de los animales mientras caminan sobre un tubo que gira sobre sí mismo. Este test no cuenta con fase de habituación sino que directamente se realizaron tres ensayos con un intervalo de 15 minutos entre ellos para cada animal. La velocidad giro se ajustó a 4 rpm para acomodar a los animales en los carriles, para después iniciar el test con un incremento progresivo hasta 40 rpm en un periodo de 300 s. Cuando un ratón se aferraba al tubo sin desplazarse mientras giraba con él (lo que denominamos “rotación pasiva”), se detenía temporizador para ese ratón empujando hacia abajo la palanca y se registraba la latencia, dando por finalizado el test.

## 3.7. Técnicas histológicas

Los animales fueron sacrificados por decapitación el día 9 tras la inyección del KA, a excepción de los animales que se utilizaron para realizar registros de EEG continuos, que fueron sacrificados el día 29. Los cerebros se recolectaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se realizaron cortes coronales de  $25\ \mu\text{m}$  de grosor con un criostato (Leica CM1850, Wetzlar, Alemania) a  $-20^{\circ}\text{C}$ , los cuales fueron recolectados en porta-objetos de cristal Superfrost<sup>TM</sup>Plus (Epreidia<sup>TM</sup>, Michigan, EEUU) y almacenados otra vez a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el día de los experimentos. Todos los reactivos que se utilizaron en estos experimentos procedían de Sigma-Aldrich (Merck Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania).

Los estudios histoquímicos consistieron en diferentes procedimientos para evaluar la integridad del hipocampo (tinción de Nissl), neurodegeneración y muerte neuronal (tinción de Fluoro-Jade C e inmunofluorescencia de NeuN), marcadores de astro y microgliosis reactiva (inmunofluorescencia de GFAP) y neuroinflamación (autorradiografía con  $^3\text{H}$ -PK11195). Además, este procesamiento nos permitió verificar el emplazamiento de los electrodos y cánulas, y la correcta expresión de los vectores virales y su co-localización con las células de interés (astrocitos).

### 3.7.1. Tinción de Nissl

Los cortes se atemperaron en una placa a 36°C, se fijaron en formaldehído (4% en tampón fosfato salino, PBS, pH 7.4) durante 10 minutos, se lavaron dos veces en PBS y se transfirieron a una solución de violeta de cresilo al 0,5% en ácido acético 0,1% durante 1 hora. Después, se lavaron en agua destilada, se deshidrataron en soluciones alcohólicas (70%, 95% y 100%) y se aclararon con xileno. Finalmente, se montaron con DPX.

### 3.7.2. Tinción con Fluoro-Jade C

La tinción de Fluoro-Jade C (FJC) combinada con DAPI se utiliza para localizar las células en proceso de neurodegeneración. Los cortes se colocaron sobre una placa a 36°C y se fijaron a formaldehído al 4% en PBS y se lavaron dos veces en PBS. Luego, se sumergieron en alcohol básico (NaOH 1% en etanol 80%), etanol 70% y agua destilada. Después, se sumergieron en permanganato potásico 0,06% durante 10 minutos, se aclararon con agua destilada y se sumergieron en una solución de Fluoro-Jade C (Merck Millipore, Massachusetts, EEUU) 0.0001% en ácido acético 0,1%, con 1 ml de DAPI (stock a 0,01% en TBS) durante 10 minutos más. Finalmente, los cortes se lavaron con agua destilada, se secaron con aire caliente y se aclararon con xileno para montarlos con DPX.

### 3.7.3. Inmunofluorescencia

Las muestras se atemperaron en una placa a 36°C y se fijaron en formaldehído 4% en PBS pH 7,4 durante 10 minutos y se lavaron dos veces en PBS. Luego se lavaron con TBS durante 30 minutos y se bloquearon con BSA 3% en TBS con tritón X-100 0,1% durante 1 o 2 horas. Después del bloqueo, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes preparados en BSA 1% en TBS:

- Astrocitos: Mouse anti-GFAP (Alexa Fluor® 488); 1:500 (Invitrogen, RRID AB10598515).
- Neuronas: Rabbit Anti-NeuN antibody; 1:500 (Abcam, RRID AB177487).

Al día siguiente los cortes de las inmunofluorescencias para NeuN se lavaron con Tween-20 0,1% en TBS (3 x 5 minutos) y se incubaron con el anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit (Alexa Fluor® 488); 1:500 (Abcam, AB150077) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron con Tween-20 0,1% en TBS (3 x 5 minutos), añadiendo en el último lavado DAPI (1 ml de solución stock a 0,01% en TBS) para marcar los núcleos celulares, y se montaron directamente con Mowiol. Como el anticuerpo de GFAP estaba conjugado con Alexa Fluor® 488, los cortes se montaron directamente con Mowiol tras los lavados. Los porta-objetos se guardaron a 4°C hasta el día de adquisición de las imágenes.

### 3.7.4. Autorradiografía *in vitro*

Se realizaron estudios de autorradiografía para evaluar la neuroinflamación mediada por TSPO usando el marcador  $^3\text{H}$ -PK11195 (Perkin Elmer, Massachusetts, EEUU). Las muestras se atemperaron en una placa a 36°C y se pre-incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en Tris-HCl pH 7,4. Luego se incubaron durante una hora en  $^3\text{H}$ -PK11195 1 nM en Tris-HCl pH 7,4. Después se realizaron dos lavados de 5 minutos con Tris-HCl a 4°C y se aclaró con agua destilada a 4°C. Finalmente, los porta-objetos se secaron en una estufa a 36°C y se expusieron en una película fotográfica de alta resolución (Carestream® BioMax® MR film, Merck Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) durante 2 meses.

Tras ese tiempo, las películas se revelaron sumergiéndolas 5 minutos en líquido revelador, 2 minutos en agua y 5 minutos en líquido fijador).

## 3.8. Estudios de RMN HR-MAS

La espectroscopía  $^1\text{H}$ -RMN se realizó en la ICTS BIOIMAC (Universidad Complutense, Madrid, España) a 500,13 MHz utilizando un espectrómetro Bruker AVIII500 HD 11.7 T (Bruker, Rheinstetten, Alemania). Este equipo cuenta con una sonda HR-MAS ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ ) que se utiliza para estudios de metabolómica en biomedicina, para analizar pequeñas muestras de tejidos biológicos (5-20 mg), sin ningún tipo de manipulación de las mismas y a temperatura controlada, para definir el perfil bioquímico de regiones localizadas en tejidos heterogéneos, como el cerebro. En esta tesis, se usaron algoritmos estadísticos multivariados para clasificar el

espectro HR-MAS  $^1\text{H}$  RMN del hipocampo e identificar distintos perfiles metabólicos tras la activación de los astrocitos. Para ello, se utilizaron ratones WT, a los que previamente se les había realizado estudios PET, para inyectarles una dosis de CNO (3 mg/kg, i.p.; n=9) o solución salina (n=9) y sacrificarlos por decapitación a los 25 minutos para diseccionar el hipocampo.

El tejido cerebral intacto de hipocampo se examinó utilizando HR-MAS operando a 4°C para minimizar la degradación del tejido. Estas muestras se colocaron dentro de un rotor de óxido de circonio de 50  $\mu\text{l}$  con inserto cilíndrico y se hicieron girar a una velocidad de 5000 Hz, para eliminar los efectos de las bandas colaterales en los espectros adquiridos. Se intentó reducir al mínimo el tiempo de preparación de la RMN, pero durante todo este tiempo el análisis de RMN se enfrió a 4°C para minimizar los cambios metabólicos. En estas condiciones no se observó ninguna degradación apreciable durante la adquisición.

Se adquirieron espectros estándar con supresión de disolvente en 32000 puntos de datos, promediados en 256 adquisiciones, con una adquisición total de 20 min utilizando una secuencia basada en el primer incremento de la secuencia de pulsos NOESY (retardo de relajación-90°-t1-90°-tm-90°-adquisición *free induction decay*) en la que se aplica un campo de radiofrecuencia secundario a la frecuencia de resonancia del agua durante el retardo de relajación de 2 s y durante el periodo de mezcla (tm = 150 ms), con t1 fijado en 3  $\mu\text{s}$ . Se utilizó un espectro de 6009,62 Hz.

## 3.9. Análisis de datos

### 3.9.1. Análisis de la imagen PET

Para la cuantificación de regiones cerebrales se utilizó el software PMOD versión 4.2 (PMOD Technologies, Zúrich, Suiza). Con el módulo PFUS, se co-registró la imagen CT del cráneo con el *template* de RMN T2 de ratón (*Ma et al., 2005; Mirrione, et al., 2007*), en la que los volúmenes de interés (VOIs) se corresponden con la localización de las principales áreas cerebrales. Para los estudios estáticos, la imagen PET se corrigió por porcentaje de dosis inyectada (%ID/cc), ya que la corrección por SUV puede enmascarar el efecto del tratamiento cuando los animales sufren un cambio drástico de peso, como ocurre en el modelo de epilepsia. En los experimentos del bloque de resultados 4.1., para discriminar con más sensibilidad los cambios específicos en el hipocampo tras la activación de los DREADDs, los datos de los VOIs

se normalizaron al VOI del cerebelo, al ser un área común de referencia que se encuentra a bastante distancia del área de activación. La normalización a cerebelo no se ha realizado para los estudios con epilepsia porque normalmente el modelo compromete el metabolismo de forma generalizada en el cerebro.

En los estudios dinámicos, la cuantificación de la cinética de la  $^{18}\text{F}$ -FDG se realizó aplicando el análisis de 2TC (*Hong and Fryer, 2010; Jahreis et al., 2021*) en el módulo PKIN. Junto con los VOIs de las diferentes áreas cerebrales, se creó otro VOI esférico de la vena cava ( $3\text{ mm}^3$ ) (módulo PBAS) para determinar la función de entrada de sangre y su curva de tiempo-actividad se ajustó al modelo de tres exponenciales. Se aplicó una constante *lumped* de 0,67 (*Thorn et al., 2013*) y la curva de tiempo-actividad del VOI del hipocampo se corrigió minimizando los valores de Chi-cuadrado ajustándose a la medida de la sangre. Por otro lado, se usó el módulo PXMÓD para obtener una imagen paramétrica de cada una de las constantes resultantes del 2TC de cada animal ( $K_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  y  $k_i$ ), utilizando el modelo para 2 tejidos BFM.

Además, las imágenes PET de los estudios estáticos y de las constantes de los estudios dinámicos se analizaron con el *Statistical Parametric Mapping* (SPM12, Londres, Gran Bretaña) a través de MATLAB (*Leiter et al., 2019*). Se creó una matriz de dos muestras independientes, o pareadas si se comparaba con el mismo sujeto. Una vez estimada la matriz de comparaciones, se realizaron los T test, con una  $p = 0,05$  y un umbral de extensión del clúster de un mínimo de 20 vóxeles. Esto permite analizar las diferencias estadísticas en la comparación vóxel por vóxel de un conjunto de imágenes, generando una imagen del cerebro que señala aquellas áreas donde existen diferencias significativas entre los grupos.

### 3.9.2. Análisis de la señal EEG

Para analizar la señal EEG se utilizó el software e-DAQ Chart (eDAQ; Denistone East, Australia) para extraer la densidad de potencia (DP) espectral (tamaño 4000 con filtro Hamming) de los últimos 10 minutos del registro pre- y post-tratamiento del día 1 y día 7. Se comprobó el efecto del tratamiento normalizando la medida post-tratamiento con la medida pre-tratamiento y el resultado se expresó como porcentaje de la DP de la señal total. Este análisis nos informa sobre la distribución de la potencia de la señal sobre las distintas frecuencias que la conforman, y se utilizó para estudiar las diferencias en el modelo de epilepsia tras el tratamiento o relativas

al tipo de animal. Finalmente, se promediaron las diferentes bandas de frecuencias en base a las diferencias encontradas respecto al grupo control.

Para valorar los efectos del tratamiento a largo plazo y la evolución de la señal EEG, se normalizó el registro a los 28 días con su medida pre-tratamiento del día 7. Del mismo modo, se calculó el porcentaje de la densidad de potencia de la señal total y se promediaron las bandas de frecuencia.

### 3.9.3. Análisis del paradigma cognitivo

El análisis del desempeño en la prueba del laberinto en T se hizo a través de los vídeos que se habían recopilado durante las pruebas. Se tuvo en cuenta el tiempo que pasó en cada brazo y el número de entradas a cada brazo. Luego se establecieron las ratios del porcentaje de tiempo que pasaban en el brazo correcto o incorrecto, diferenciando los periodos en el que el animal estaba en movimiento (conducta exploratoria) o quieto (como posible signo de ansiedad o desinterés).

En el test de rotarod, se registró el tiempo de latencia hasta el fin de la prueba y la razón (caída, salto o rotación pasiva).

### 3.9.4. Análisis de HR-MAS $^1\text{H}$ RMN

Todos los espectros se procesaron con el software TOPSPIN, versión 3.5 (Bruker Rheinstetten, Alemania). Antes de la transformación de Fourier, los FID se multiplicaron por una función de peso exponencial correspondiente a un ensanchamiento de línea de 0,3 Hz. Los espectros se desfasaron, se corrigieron en base y se referenciaron al singlete de (3-trimetilsilil)-2,2,3,3-tetradeuteriopropionato de sodio a  $\delta$  0 ppm.

Se realizaron experimentos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$   $^2\text{D}$  para llevar a cabo las asignaciones de los componentes. Los experimentos HMQC se registraron con los siguientes parámetros: 70  $\mu\text{s}$  para el desacoplamiento GARP  $^{13}\text{C}$ , anchos espectrales de 6009 Hz y 22 kHz en las dimensiones  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , respectivamente, 2000 puntos de datos en  $f_2$  y 256 incrementos en  $f_1$ . Antes de la transformación de Fourier se aplicó el relleno cero en  $f_1$  y una función de ventana sinusoidal cuadrada no desplazada en ambas dimensiones.

En este estudio, se utilizaron algoritmos estadísticos multivariantes para clasificar los espectros HR-MAS  $^1\text{H}$  RMN de estas muestras e identificar perfiles metabólicos distintos para el tejido. Para el análisis de reconocimiento de patrones, se redujeron los datos de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  utilizando el programa informático AMIX (Analysis of MIXtures version 3.6.8, Bruker Rheinstetten, Alemania) sub dividiéndolos en regiones integrales de 0,02 ppm entre  $\delta$  0,6 y 9 ppm (excluyendo la región de agua de 5,7 a 4,7 ppm). Las regiones integrales individuales se normalizaron a la suma total de la región integral tras la exclusión de la resonancia del agua. Se aplicó el análisis de componentes principales (ACP) a los datos y no se utilizó escalado. Los gráficos de carga del ACP se utilizaron para identificar los picos principalmente responsables de las diferencias significativas. Por lo tanto, los picos se asociaron a metabolitos específicos basándose en la literatura previa existente.

### 3.9.5. Análisis histológico

Las imágenes de la tinción de Nissl se adquirieron con un sistema de Leica (Wetzlar, Alemania) que consistía en una cámara digital (DFC425 camera) acoplada a microscopio (Leitz Laborlux S) a través del software LAS, sólo para una valoración cualitativa del estado de la estructura hipocampal.

Para las imágenes de fluorescencia (Fluoro-Jade C, GFAP y NeuN) se utilizó una cámara de fluorescencia (Leica DFC 3000G, Leica, Alemania) acoplada al mismo microscopio (DM2000 LED) utilizando un filtro verde (excitación 395 nm; emisión 509 nm) para la fluorescencia y luz UV para DAPI. Para el análisis cuantitativo de la fluorescencia se utilizó el software FIJI-ImageJ (NIH, disponible en la web: <https://imagej.net/software/fiji/downloads>). Se valoró la expresión de los marcadores cuantificando la intensidad de la fluorescencia en el hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado/hilus). Para ello se creó un ROI adecuado a cada área hipocampal con el fin de cuantificar la intensidad en la misma franja del hipocampo. La imagen se pasó a 8-bit y se contrastaron las partículas con el mismo umbral para todos (Threshold Li) dentro de cada experimento. Finalmente se adquirieron los datos de intensidad media y área.

### 3.9.6. Análisis autorradiográfico

Las imágenes de las autorradiografías se obtuvieron a través de una lupa (Leica MZ6, Leica, Alemania) acoplada a la cámara digital. Para analizarlas, primero se procesaron con el software FIJI-ImageJ (NIH) para invertir su color. Posteriormente, se analizaron a través del software PMOD 4.2 y se cotejaron con un mapa de ROIs de la plantilla de RMN de ratón Mirrione (*Mirrione, et al., 2007*), que coincidían con el nivel de los cortes histológicos, para obtener el dato de la señal en cada una de las áreas de interés.

### 3.9.7. Análisis estadístico

Todos los grupos se analizaron para valorar si se ajustaban a una distribución normal (test Saphiro-Wilk) y así poder realizar el test estadístico correcto posteriormente. En el análisis paramétrico de factores independientes (grupo o tratamiento) se realizó un ANOVA de 1 vía ordinario (más de 2 muestras) o un test T de Student sin datos pareados (2 muestras). En el caso del análisis no paramétrico se usaron como alternativa los tests de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney respectivamente.

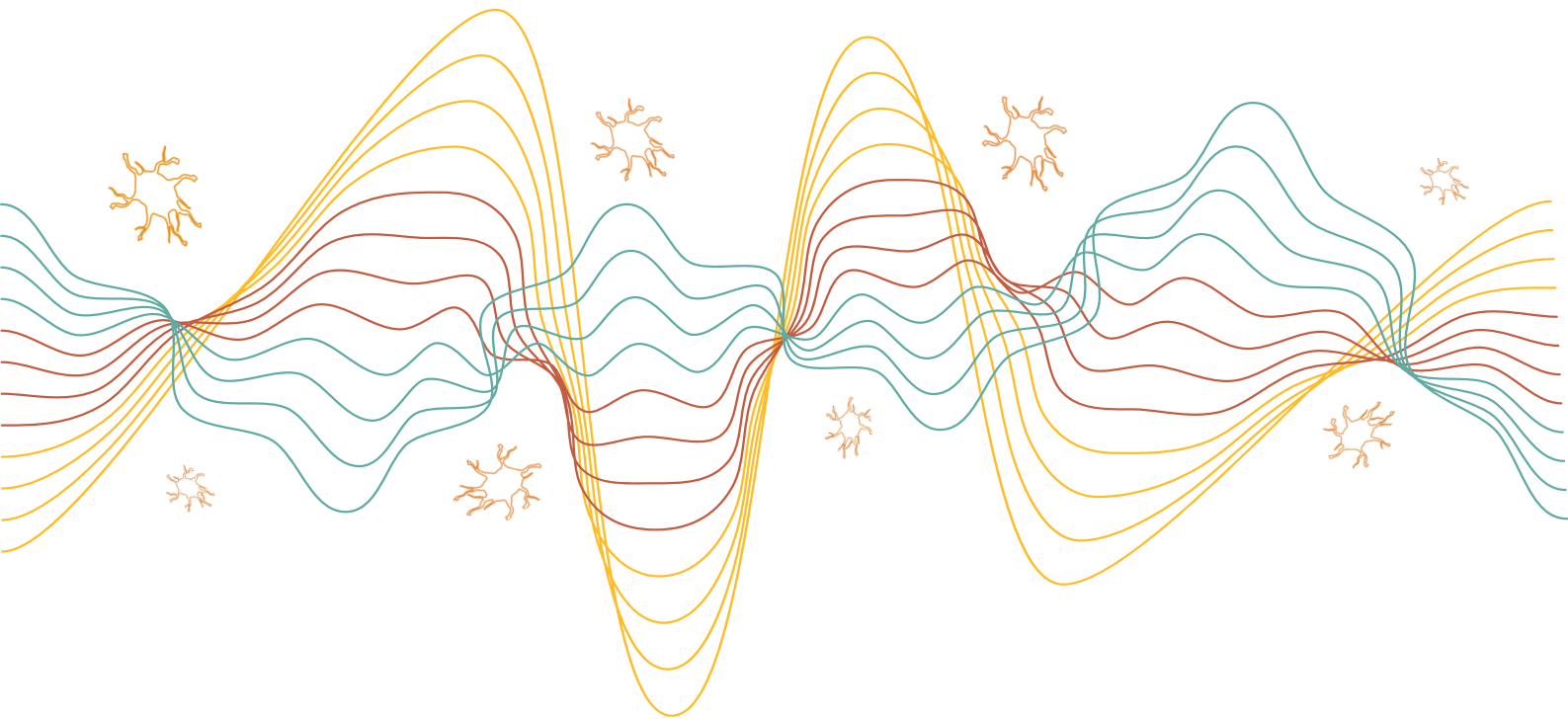
En aquellos experimentos en los que el animal pasaba por diferentes tratamientos o diferentes puntos temporales, se realizó un ANOVA de una vía de medidas repetidas (más de 2 muestras) o un test T de Student de medidas repetidas (dos muestras) si el análisis era paramétrico. Las alternativas no paramétricas fueron el test de Friedman/Dunns y el test de Wilcoxon respectivamente. Cuando en las medidas repetidas se perdió alguna medida de algún animal, se aplicó un test de análisis de efectos mixtos para evitar eliminar las medidas del animal en los otros tratamientos/puntos temporales. Para comparar dos factores (grupos x tratamiento) se analizaron los datos con un ANOVA de 2 vías. Si en los dos grupos de animales cada sujeto había pasado por varios tratamientos/puntos temporales se analizó con un ANOVA de 2 vías de medidas repetidas. Las figuras de esta tesis fueron parcialmente generadas usando *Servier Medical Art*, proporcionadas por *Servier*, con licencia bajo *Creative Commons Attribution 3.0 unported license*

Los datos se expresaron como media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM), con el tamaño muestral indicado en cada experimento. Las diferencias significativas se representaron de este modo:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*), y  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.9.8. Consideraciones metodológicas

En esta investigación se han considerado los 3 principios que rigen la ética en experimentación con animales: reemplazo, reducción y refinamiento. Por un lado, los diseños experimentales nos obligan a utilizar animales, ya que la epilepsia es un fenómeno que ocurre en el sistema nervioso central de forma global, y su desarrollo, de momento, sólo puede ser estudiado en organismos vivos. Sin embargo, una de las ventajas que tiene la técnica PET es precisamente el poder realizar estudios longitudinales y reducir el número de animales de experimentación. Del mismo modo, la cantidad de animales utilizados fue la mínima imprescindible para no comprometer la potencia estadística. Además, en el cálculo muestral se contempló la mortalidad de los animales a causa de los procedimientos, como puede ser las cirugías, la exposición a la anestesia durante los estudios de neuroimagen o la severidad de las crisis epilépticas.

- CAPÍTULO 4 -  
RESULTADOS





# 4. RESULTADOS

---

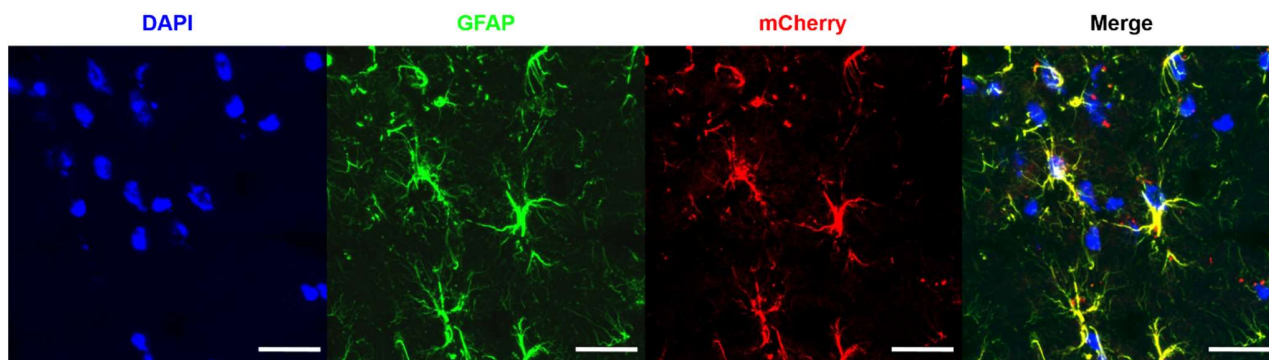
## 4.1. Estudio del metabolismo de la glucosa cerebral tras la activación de los astrocitos

Como ya se mencionó en la introducción, los astrocitos son fundamentales para mantener los niveles energéticos del cerebro (*Barros, et al., 2018; Bélanger, et al., 2011*), no obstante, no se conoce con exactitud el efecto de su activación en el metabolismo cerebral. Para resolver esta cuestión, realizamos estudios de neuroimagen por PET dinámicos (para valorar la cinética de la glucosa cerebral) y estáticos (para descartar el efecto de la anestesia) activando los astrocitos mediante DREADDs.

### 4.1.1. La activación de los astrocitos a través de DREADDs aumenta el metabolismo de la glucosa cerebral

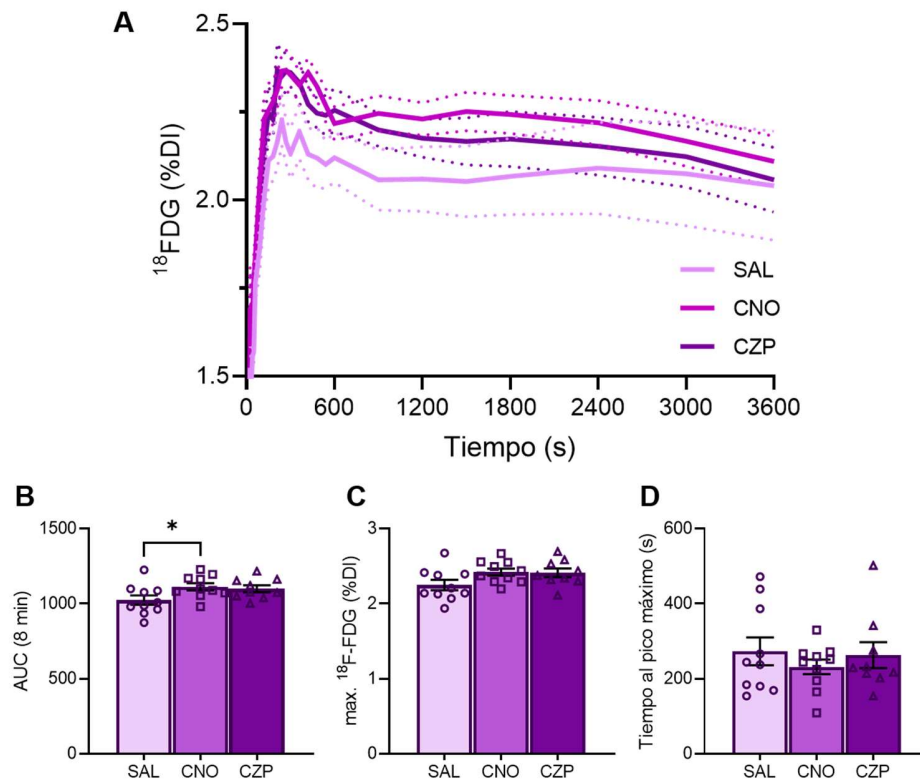
La quimiogenética es una técnica que se ha utilizado ampliamente en diferentes tipos celulares (*Jones, et al., 2018; Lim, et al., 2021; MacDonald, et al., 2020; Nwachukwu, et al., 2021*). Los estudios inmunohistoquímicos corroboraron el éxito de las infecciones virales en la zona de interés, mostrando una clara co-localización (amarillo) entre el marcador GFAP (astrocitos, verde) y el fluoróforo mCherry (adenovirus, rojo; Fig. 4.1). Aunque el CNO es el fármaco más comúnmente utilizado en esta técnica, algunas investigaciones han propuesto que se metaboliza rápidamente a CZP, siendo este metabolito el que cruza la BHE y se une a los DREADDs con más afinidad (*Armbruster, et al., 2007; Gomez et al., 2017*). Por lo tanto, en primer lugar, determinamos la eficacia del CNO y su metabolito CZP en ratones de la cepa CD1 tras la inyección intrahipocampal de DREADDs. Se utilizaron dosis de 3 mg/kg de CNO (*Jones et al.,*

2018; Kang *et al.*, 2020; Kätzel *et al.*, 2014; McCarthy *et al.*, 2017) y 0,3 mg/kg de CZP para evitar sus efectos neurolépticos (Cho *et al.*, 2020). Dado que los fármacos alcanzan su pico máximo en el cerebro entre los 15-30 minutos (Jendryka *et al.*, 2019), fueron inyectados 10 minutos antes de la administración de  $^{18}\text{F}$ -FDG para que coincidiera con el intervalo de tiempo de incorporación del radiotrazador.



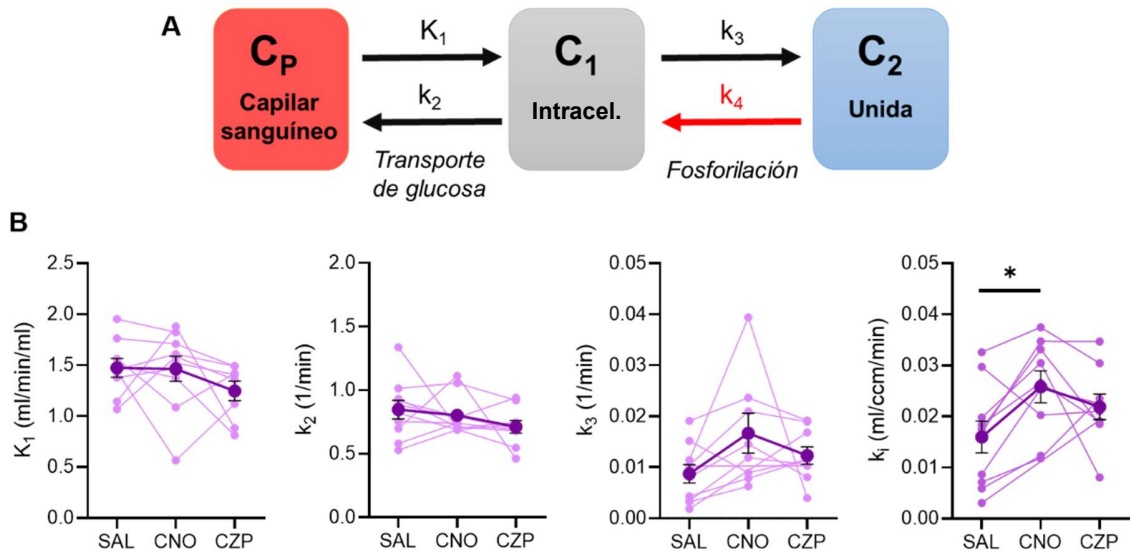
**Figura 4.1. Valoración del éxito de la infección vírica.** Las imágenes son una muestra de una inmunohistoquímica de GFAP (marcador astrocitario, en verde) y su co-localización en amarillo con el fluoróforo agregado a los vectores virales (mCherry, rojo) y DAPI (marcador de núcleos celulares, azul). Barra de escala a 20  $\mu\text{m}$ .

Al examinar las curvas de incorporación del radiotrazador, se observó un aumento de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en los animales con CNO respecto a su control salino por no con CZP. El análisis cuantitativo del área debajo de la curva, corroboró el efecto significativo del CNO vs CZP específicamente en los primeros 8 minutos en los que el tratamiento aumentó el consumo de  $^{18}\text{F}$ -FDG (SAL  $1024 \pm 31,63$   $n=10$ ; vs CNO  $1113,998 \pm 23,49$   $n=10$ ,  $p=0,04$ ; vs CZP  $1100 \pm 22,86$   $n=9$ ,  $p=0,13$ ). Por otro lado, no hubo diferencias en cuanto a la captación máxima del radiotrazador (SAL  $2,25 \pm 0,068$   $n=10$ ; vs CNO  $2,42 \pm 0,046$   $n=10$ ,  $p=0,08$ ; vs CZP  $2,41 \pm 0,058$   $n=9$ ,  $p=0,19$ ) o el tiempo de latencia hasta la captación máxima (SAL  $273,4 \pm 37,07$   $n=10$ ; vs CNO  $231,7 \pm 19,59$   $n=10$ ,  $p=0,29$ ; vs CZP  $263,1 \pm 34,48$   $n=9$ ,  $p=0,92$ ) (Fig. 4.2).



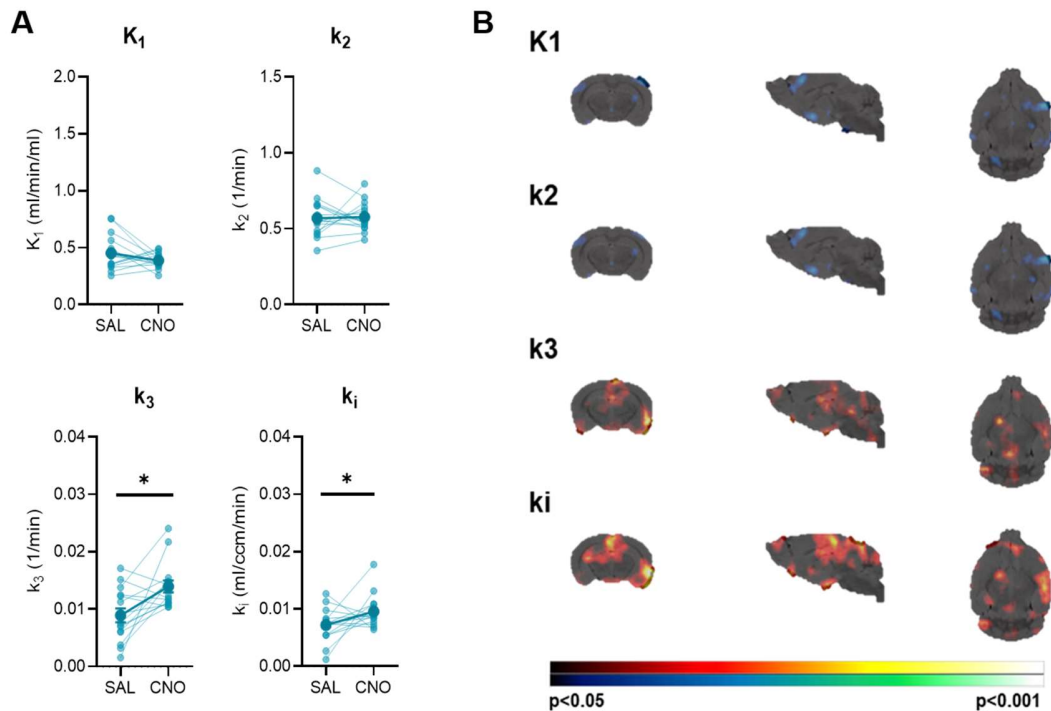
**Figura 4.2. Curvas de incorporación  $^{18}\text{F-FDG}$  en el tiempo tras la inyección de CNO o CZP. A.** Gráfica de representación de las curvas de captación de radioactividad en el tiempo con los tratamientos salino (SAL), CNO y CZP. **B.** Análisis del área de las curvas de los primeros 8 minutos de adquisición, donde se refleja una diferencia significativa en el tratamiento CNO ( $1119,998 \pm 35,468$   $n=10$ ) respecto al SAL ( $1025,869 \pm 34,593$   $n=10$ ;  $p=0,04$ ), mientras que no hubo diferencias con el tratamiento de CZP ( $1100 \pm 22,86$   $n=9$ ;  $p=0,13$ ). ANOVA de 1 vía de medidas repetidas (modelos mixtos). \* $p < 0,05$ . **C.** Representación del pico máximo de captación del radiotrazador tras los tratamientos. No se muestran diferencias estadísticas tras ANOVA de 1 vía de medidas repetidas (modelos mixtos). **D.** Representación del periodo de latencia hasta el pico máximo de captación del radiotrazador, donde no se observan diferencias entre tratamientos tras ANOVA de 1 vía de medidas repetidas (modelos mixtos).

Cuando se aplicó el modelo 2TC para  $^{18}\text{F-FDG}$  en los estudios dinámicos, el análisis del estudio total mostró un aumento de flujo de la  $^{18}\text{F-FDG}$ , representado por la constante  $k_i$  tras la inyección de CNO ( $0,025 \pm 0,003$   $n=9$ ) en comparación con su medida salino ( $0,016 \pm 0,003$   $n=10$ ;  $p=0,02$ ). Por el contrario, el tratamiento con CZP no mostró diferencias significativas respecto al tratamiento control ( $0,022 \pm 0,002$   $n=9$ ,  $p=0,3$ ; Fig. 4.3).



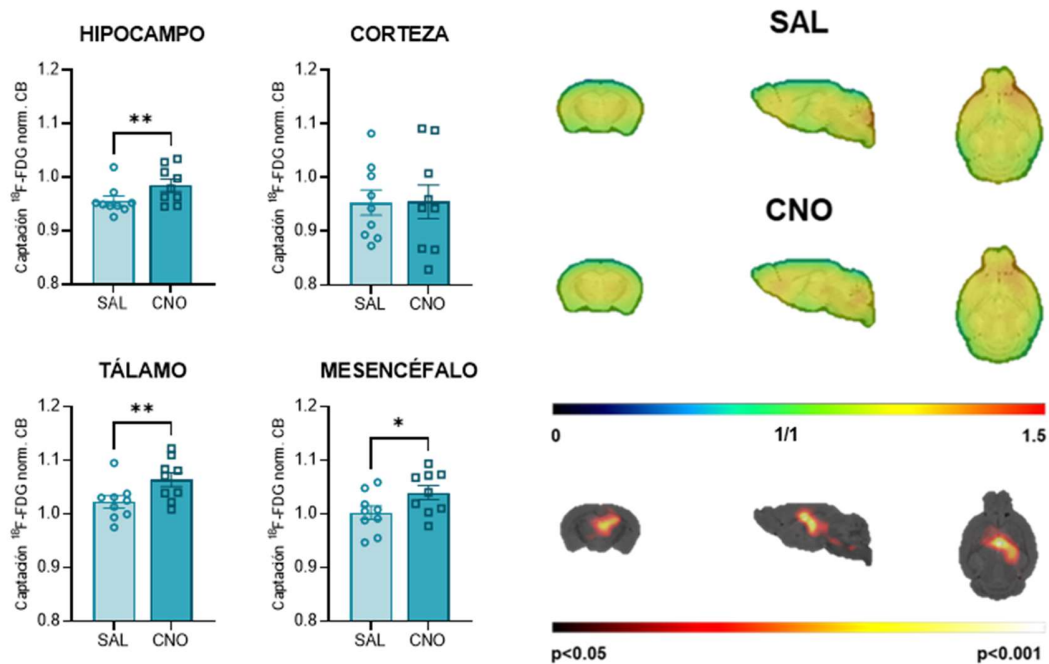
**Figura 4.3. Representación de las constantes del modelo 2TC tras la activación de astrocitos en ratón CD1.** **A.** Gráfica de las constantes resultantes del modelo 2TC.  $K_1$  y  $k_2$  representan la entrada y salida desde los capilares sanguíneos al medio extracelular,  $k_3$  la fosforilación de la  $^{18}\text{F}$ -FDG en las células y  $k_i$  es el índice de intercambio general. **B.** Representación de las constantes tras la administración de los tratamientos. Se muestra un aumento significativo en la constante  $k_i$  respecto al salino cuando se inyectó CNO (SAL  $0,016 \pm 0,003$   $n=10$  vs CNO  $0,025 \pm 0,003$   $n=9$ ;  $p=0,02$ ). ANOVA de 1 vía de medidas repetidas, post-hoc Bonferroni. \* $p < 0,05$ .

El siguiente paso fue comprobar que el efecto del CNO en los DREADDs se mantenía en el ratón C57BL/6J, ya que fue la cepa CD1 mostró una mayor mortalidad con el modelo de epilepsia inducido por KA. Los resultados fueron bastante similares en el modelo de 2TC. En este caso, comparando con el tratamiento de solución salina, las constantes  $k_3$  ( $0,009 \pm 0,001$ ,  $n=16$ ) y  $k_i$  ( $0,007 \pm 0,0008$ ,  $n=16$ ) se incrementaron tras la administración del CNO ( $k_3$   $0,014 \pm 0,001$ ;  $k_i$   $0,1 \pm 0,0007$   $n=16$ ;  $p=0,04$ ), lo que indica una mayor fosforilación de la  $^{18}\text{F}$ -FDG dentro de las células y una mayor entrada de glucosa en general, respectivamente (Fig. 4.4).



**Figura 4.4. Representación de las constantes de la cinética de la glucosa en el ratón C57BL/6J WT tras la activación de astrocitos.** **A.** Las gráficas muestran que la activación de astrocitos con CNO se incrementó el valor de la constante  $k_3$  (SAL  $0,009 \pm 0,001$   $n=16$  vs CNO  $0,014 \pm 0,001$   $n=16$ ;  $p=0,04$ ) y  $k_i$  (SAL  $0,007 \pm 0,0008$   $n=16$  vs CNO  $0,1 \pm 0,0007$   $n=16$ ;  $p=0,04$ ) lo que indica un aumento de la entrada de  $^{18}\text{F}$ -FDG general. Prueba T de Student para medidas repetidas, no paramétrico.  $*p<0,05$ . **B.** Imagen de SPM representando la comparación entre SAL y CNO de cada constante, en el que las zonas rojas y amarillas suponen un incremento significativo tras el tratamiento, y las azules y verdes la disminución.

Posteriormente se realizaron estudios estáticos para comprobar que la anestesia no modifica la incorporación de la glucosa inducida por la activación de los astrocitos. Los resultados confirmaron el aumento de la captación de la  $^{18}\text{F}$ -FDG, pero curiosamente, este aumento no se restringió únicamente al hipocampo (SAL  $0,9558 \pm 0,02655$   $n=9$  vs CNO  $0,9848 \pm 0,03387$   $n=9$ ;  $p=0,008$ ) sino que también afectó del mismo modo a otras áreas cerebrales como el tálamo (SAL  $1,022 \pm 0,03421$   $n=9$  vs CNO  $1,064 \pm 0,03900$   $n=9$ ;  $p=0,006$ ) y el mesencéfalo (SAL  $1,002 \pm 0,03744$   $n=9$  vs CNO  $1,040 \pm 0,03928$   $n=9$ ;  $p=0,01$ ). Sin embargo, otras zonas como la corteza no presentaron cambios (SAL  $0,9533 \pm 0,07057$   $n=9$  vs CNO  $0,9549 \pm 0,09411$   $n=9$ ;  $p=0,97$ ). Este efecto aparece representado tanto en el análisis de los VOIs como en la comparación de las imágenes PET con SPM (Fig. 4.5).



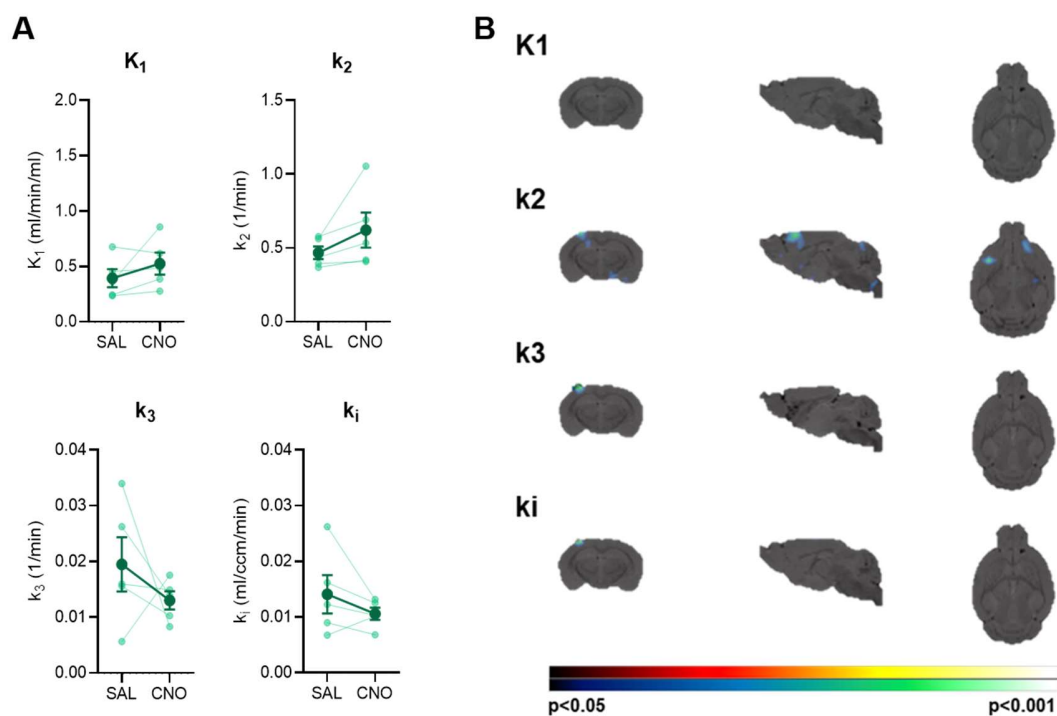
**Figura 4.5. Estudios estáticos tras la activación de astrocitos en el ratón C57BL/6J.** A. Las gráficas muestran la cuantificación en varias estructuras cerebrales, donde el CNO provoca un aumento significativo de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en hipocampo (SAL  $0,9558 \pm 0,02655$   $n=9$  vs CNO  $0,9848 \pm 0,03387$   $n=9$ ,  $p=0,008$ ), tálamo (SAL  $1,022 \pm 0,03421$   $n=9$  vs CNO  $1,064 \pm 0,03900$   $n=9$ ,  $p=0,006$ ) y mesencéfalo (SAL  $1,002 \pm 0,03744$   $n=9$  vs CNO  $1,040 \pm 0,03928$   $n=9$ ,  $p=0,01$ ). Prueba T de Student para medidas repetidas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . B. Representación de la media de imágenes por tratamiento (filas superiores) y su correspondiente comparación estadística (fila inferior) con SPM.

Estos resultados sugieren que la activación quimiogénica de los astrocitos en el hipocampo incrementa la captación del radiotrazador lo que se asocia con un aumento en el metabolismo cerebral. Esto, además, provoca que otras áreas extrahipocampales respondan de la misma manera. Por otro lado, se demostró a través del PET que el CNO es idóneo para la activación de los astrocitos en ratones, en contraposición a la clozapina.

#### 4.1.2. El aumento del metabolismo provocado por la activación de los astrocitos está mediado por el calcio intracelular a través de $\text{Ip3r2}$

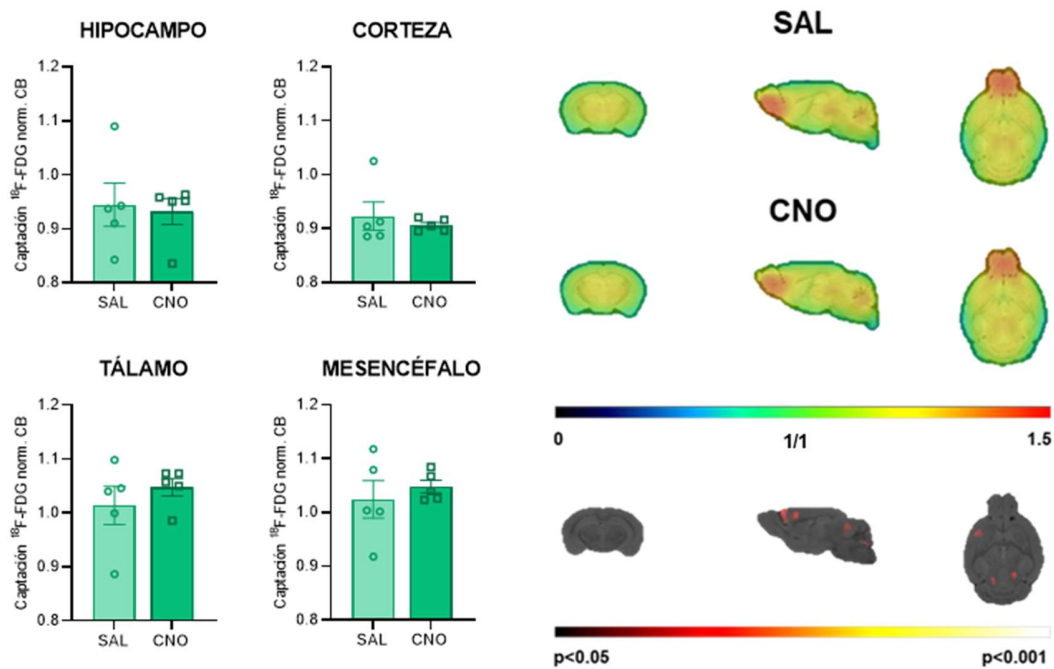
Sólida evidencia experimental sostiene la importancia de los receptores de tipo 2 para  $\text{Ip3}$  como mediadores de la movilización de calcio intracelular a través de proteínas G (Corkrum et al., 2020; Martín-Fernández et al., 2017). Para determinar su implicación en los cambios

metabólicos descritos, se utilizaron ratones modificados genéticamente deficientes (*knock out*) en este receptor ( $Ip3r2^{-/-}$ ;  $n=5$  (Li *et al.*, 2005). En los estudios dinámicos no se apreciaron cambios en ninguna de las constantes del modelo 2TC. Esto indica que la activación de los astrocitos en estos ratones no modifica el paso de la glucosa por el primer compartimento (de los vasos sanguíneos al tejido) ni del segundo (la fosforilación de la  $^{18}F$ -FDG en las células). Por lo tanto, este ratón no responde a la activación de los DREADDs en los astrocitos, en lo que se refiere a la modificación de la cinética de la glucosa cerebral (Fig. 4.6).



**Figura 4.6. Representación de las constantes de la cinética de la glucosa en el ratón  $Ip3r2^{-/-}$  tras la activación de astrocitos.** **A.** Las gráficas muestran que la activación de astrocitos con CNO no provocó cambios en ninguna constante. Prueba T de Student para medidas repetidas. **B.** Comparación de las imágenes PET de cada constante, confirmando que no hay diferencias significativas tras la administración del tratamiento.

Para descartar que la anestesia estuviera enmascarando algún efecto de la activación de los astrocitos, se realizaron estudios estáticos en los que la incorporación de la  $^{18}F$ -FDG se realizó con el animal despierto. De forma similar, los resultados demostraron que no existía ningún efecto tras la administración de CNO (Fig. 4.7).



**Figura 4.7. Estudios estáticos tras la activación de astrocitos en el ratón *Ip3r2*<sup>-/-</sup>.** **A.** A la izquierda, las gráficas muestran la cuantificación en varias estructuras cerebrales, donde el CNO no produce cambios en la captación de glucosa en ninguna de ellas. Prueba T de Student para medidas repetidas. **B.** Representación de la media de imágenes por tratamiento (filas superiores) y su correspondiente comparación estadística (fila inferior), que muestra que los grupos que comportan de forma similar.

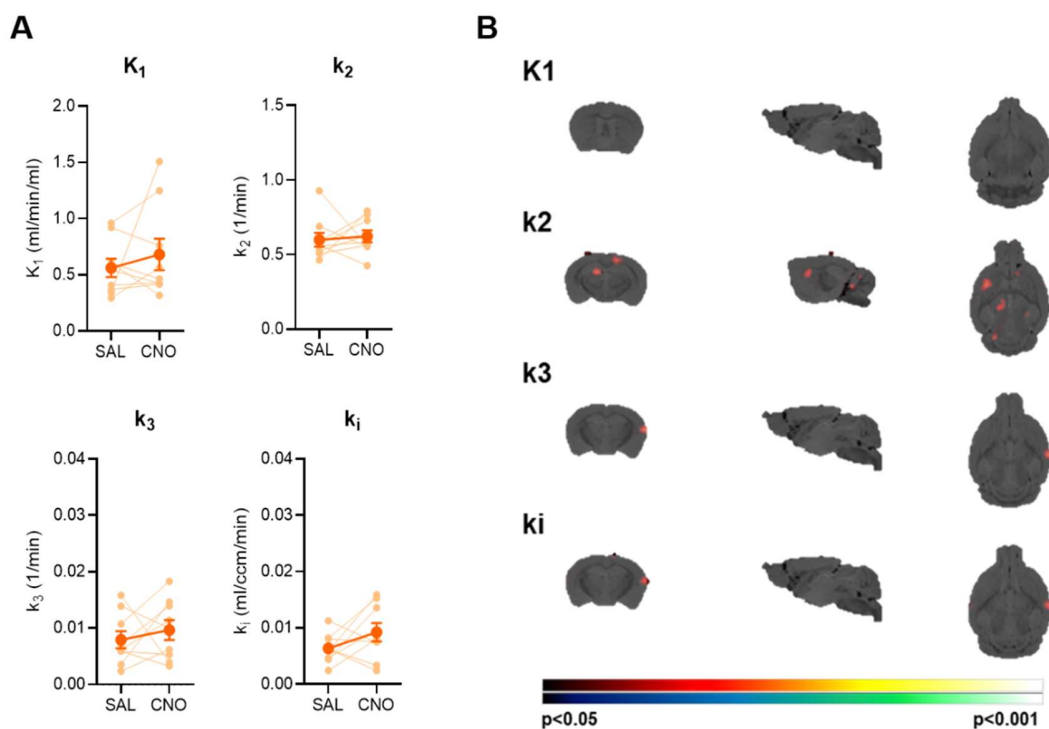
En conjunto, estos datos indican que existe una relación entre la movilización de calcio intracelular mediado por *Ip3r2* y el aumento del metabolismo de la glucosa cerebral tras la activación de los astrocitos a través de DREADDs.

### 4.1.3. El efecto metabólico provocado por la activación de los astrocitos es independiente del transportador GLUT1

Los experimentos anteriores mostraron que la activación quimiogénica de los astrocitos producía un aumento del consumo de glucosa cerebral, y que esto requiere de la movilización de calcio mediada por *Ip3r2*. Sin embargo, mediante PET no se puede discriminar qué tipo celular está captando el radiotrazador (astrocitos, neuronas u otras células). Para investigar si los astrocitos son los responsables de la incorporación de <sup>18</sup>F-FDG tras su activación

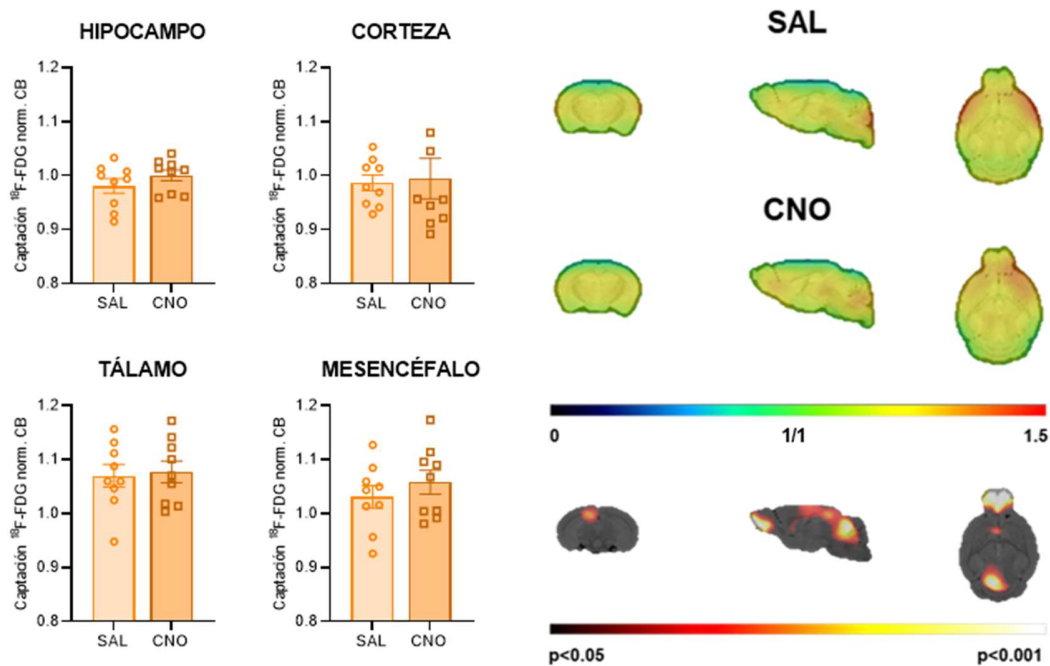
a través de DREADDs, utilizamos un ratón modificado genéticamente que carece del transportador de glucosa 1 ( $\text{GLUT1}^{\Delta\text{GFAP}}$ ) únicamente en los astrocitos del hipocampo ( $n = 9$ ).

Los resultados de los estudios dinámicos no mostraron ningún cambio en la cinética de la incorporación de la  $^{18}\text{F}$ -FDG, ya que en el análisis del modelo de 2TC no se observaron cambios en ninguna constante de intercambio de glucosa, incluida  $k_i$ . A través del análisis de SPM tampoco se encontraron diferencias entre las imágenes de las constantes tras el tratamiento (Fig. 4.8).



**Figura 4.8. Representación de las constantes de la cinética de la glucosa en los ratones  $\text{GLUT1}^{\Delta\text{GFAP}}$  tras la activación de astrocitos.** **A.** A la izquierda, las gráficas muestran que la activación de astrocitos con CNO no provocó cambios en ninguna constante. Prueba T de Student para medidas repetidas. **B.** A la derecha se representan la comparación de las imágenes PET de cada constante, confirmando que no hay diferencias significativas tras la administración del tratamiento.

Del mismo modo, los estudios estáticos no mostraron cambios significativos tras la inyección de CNO, ni en el hipocampo ni en otras áreas. Sin embargo, la comparación de imágenes con SPM reveló diferencias significativas en zonas concretas de la corteza y también en el cerebelo (Fig. 4.9).



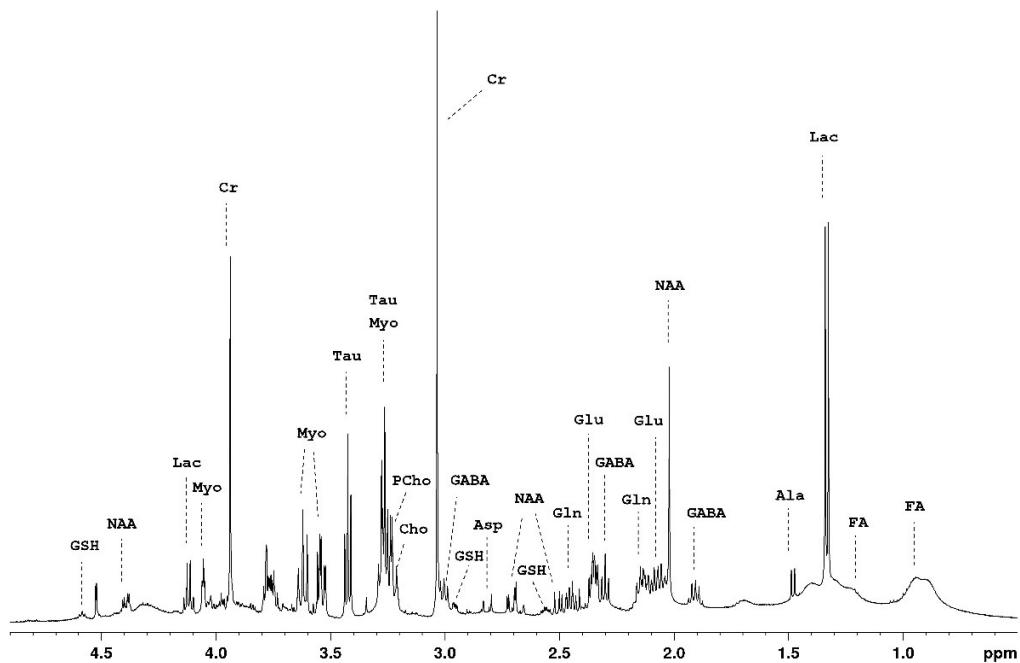
**Figura 4.9. Estudios estáticos tras la activación de astrocitos en el ratón GLUT1<sup>ΔGFAP</sup>.** **A.** A la izquierda, las gráficas muestran la cuantificación en varias estructuras cerebrales, donde el CNO no produce cambios en la captación de glucosa en ninguna de ellas. Prueba T de Student para medidas repetidas. **B.** A la derecha, una representación de la media de imágenes por tratamiento y su correspondiente comparación estadística, que muestra un aumento significativo del consumo de <sup>18</sup>F-FDG cuando los astrocitos se activan. Sin embargo, las zonas con mayor captación corresponden a la corteza cerebral y cerebelo, donde no hay DREADDs que puedan responder al CNO.

El que éstas áreas no fueran significativas en el análisis de los VOIs seguramente se debe a que, al ser una zona más concreta y restringida del VOI total, no tiene la suficiente potencia estadística como para modificar la cuantificación del área total. La diferencia que hemos encontrado entre un método de análisis y el otro no es sino una muestra de los beneficios que conlleva un análisis exhaustivo de las imágenes afrontando la perspectiva de varias metodologías.

Estos resultados sugieren que la activación de un grupo de astrocitos en una región puede modificar la captación de glucosa en otras áreas cerebrales, aun cuando en la propia zona de activación no hay efecto. Además, en estos animales observamos resultados diferentes cuando la incorporación del radiotrazador se realizaba sin anestesia, por lo que podemos inferir que los cambios metabólicos detectados en áreas específicas dependen de la activación cerebral general.

#### 4.1.4. La activación de los astrocitos modifica el perfil metabólico en el hipocampo

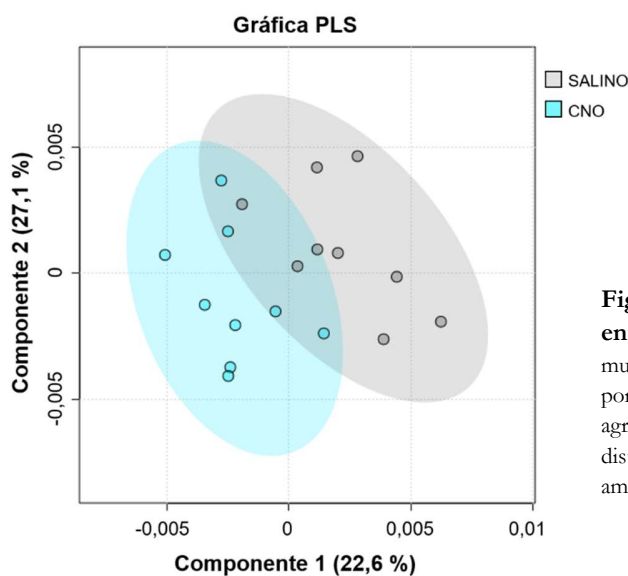
Para profundizar en los cambios moleculares que subyacen al incremento del metabolismo inducido por la activación de los astrocitos en el hipocampo, utilizamos la técnica HR-MAS. Esta técnica permite el análisis directo de pequeñas cantidades de tejido para definir el perfil bioquímico de regiones localizadas del cerebro. Para ello, utilizamos animales inyectados con DREADDs a los que se les administró salino o CNO 25 minutos previos al sacrificio tras lo cual se diseccionó el hipocampo para el estudio. Se determinaron los niveles de GABA, glutamato, glutamina, glutatión, mioinositol, taurina, aspartato, N-acetil-aspartato, lactato y ácidos grasos (Fig. 4.10).



**Figura 4.10. Representación del espectro para tejido cerebral.** En el espectro se disponen los niveles de concentración de diferentes metabolitos y su localización. Ala (alanina), Asp (aspartato), Cho (colina), Cr (creatinina), FA (ácidos grasos), GABA, Gln (glutamina), Glu (glutamato), GSH (Glutatión), Lac (lactato), Myo (mioinositol), NAA (N-acetil aspartato), PCho (fosfocolina) y Tau (taurina).

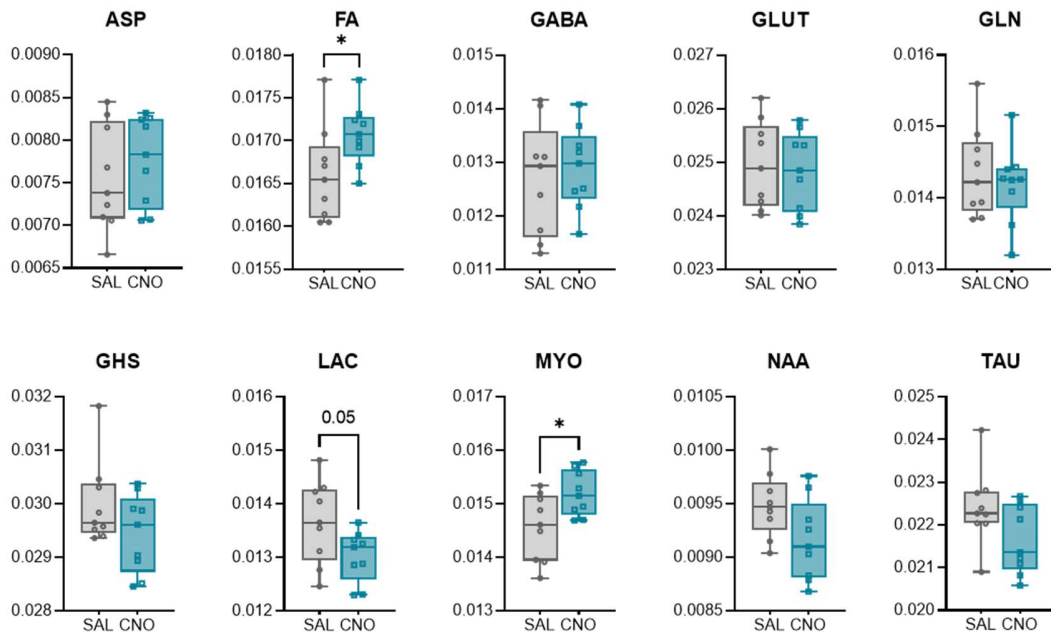
Los datos de HR-MAS se analizaron mediante una regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), un método estadístico que se utiliza para encontrar las relaciones fundamentales entre dos matrices. Este análisis sirvió para discriminar las diferencias entre el tratamiento con

SAL y CNO. El gráfico de puntuación de PLS explica el 49,7% de la varianza total de CNO, agrupándose en las puntuaciones PLS negativas, y SAL en las puntuaciones PLS positivas. Por lo tanto, gráficamente se pueden distinguir dos distribuciones dentro de los grupos de experimentación, lo que señala que existe diferencia en el perfil metabólico entre los tratamientos (Fig. 4.11).



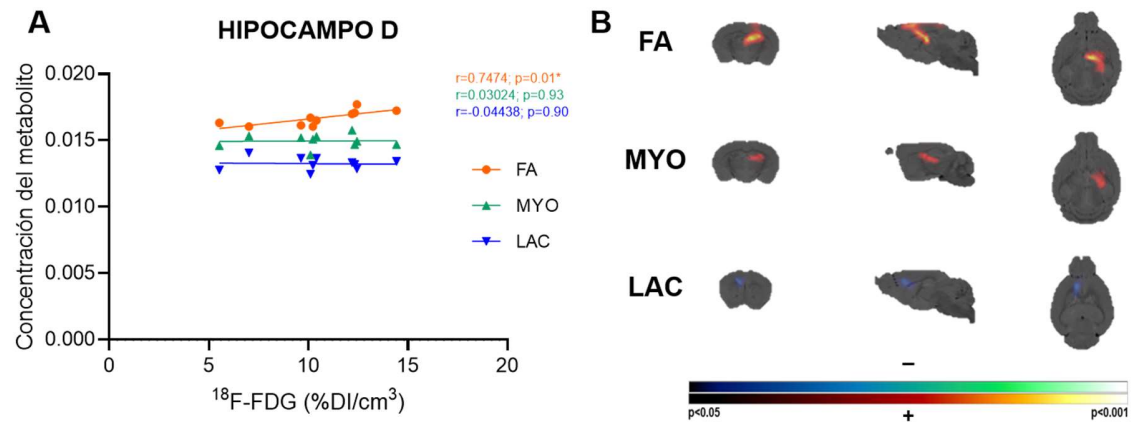
**Figura 4.11. Gráfica PLS de comparación entre tratamiento salino y CNO.** La gráfica muestra la dispersión de los diferentes individuos por tratamiento, donde se aprecia una clara agrupación del grupo salino (gris) y CNO (azul) que distingue diferencias en el perfil metabólico de ambos grupos.

Por otro lado, se realizó un análisis cuantitativo de metabolitos para ambos tratamientos. Los resultados mostraron la existencia de diferencias estadísticas significativas en la cuantificación de los niveles de los ácidos grasos (FA SAL  $0,01660 \pm 0,0005484$   $n=5$  vs CNO  $0,01707 \pm 0,0003535$   $n=5$ ;  $p=0,04$ ) y el mioinositol (MYO SAL  $0,01456 \pm 0,0006231$   $n=5$  vs CNO  $0,01519 \pm 0,0004184$   $n=5$ ;  $p=0,02$ ), que aumentaron tras la inyección de CNO. Además, se encontró una diferencia casi significativa en los niveles de lactato, que se disminuyeron tras la inyección de CNO (SAL  $0,01366 \pm 0,0002573$   $n=5$  vs CNO  $0,01302 \pm 0,0001584$   $n=5$ ;  $p=0,05$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en resto de los metabolitos (Fig. 4.12).



**Figura 4.12. Cuantificación de la concentración de metabolitos tras la activación de los astrocitos.** Las gráficas muestran la cuantificación de los principales metabolitos observados, donde sólo se encontraron diferencias significativas en los ácidos grasos (FA: SAL  $0,01660 \pm 0,0005484$   $n=5$  vs CNO  $0,01707 \pm 0,0003535$   $n=5$ ;  $p=0,04$ ) y el mioinositol (MYO: SAL  $0,01456 \pm 0,0006231$   $n=5$  vs CNO  $0,01519 \pm 0,0004184$   $n=5$ ;  $p=0,02$ ) cuyos niveles de concentración se vieron aumentados tras la inyección de CNO, en comparación con el grupo salino. Por otro lado, el lactato disminuyó casi significativamente (LAC: SAL  $0,01366 \pm 0,0002573$   $n=5$  vs CNO  $0,01302 \pm 0,0001584$   $n=5$ ;  $p=0,05$ ). Prueba T de Student. \* $p < 0,05$ .

Posteriormente, se realizaron estudios de correlación entre las cantidades de los metabolitos significativos y las imágenes PET a través de SPM. Se encontró una correlación positiva entre los niveles de ácidos grasos y la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en el hipocampo, que fue luego confirmada al realizar una regresión lineal simple entre la cuantificación de los metabolitos y el VOI de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en el PET ( $r=0,7474$ ;  $n=10$ ;  $p=0,01$ ). En cuanto al mioinositol, el SPM mostró una correlación positiva en parte del hipocampo dorsal que no se reflejó en la regresión lineal con el hipocampo ( $r=0,03024$ ;  $n=10$ ;  $p=0,93$ ), seguramente debido a que la zona que aparece significativa en SPM sólo ocupa una pequeña parte de la región del VOI. Por otro lado, el lactato tampoco mostró correlación con la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG ( $r=0,04438$ ;  $n=10$ ;  $p=0,9$ , Fig. 4.13). Esto sugiere que existe algún tipo de relación entre los ácidos grasos y el metabolismo cerebral, ya que, a mayor concentración de estos metabolitos, mayor será la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en el hipocampo.



**Figura 4.13. Correlación de los niveles de metabolitos con los datos PET.** **A.** Gráfica de la regresión lineal entre los datos adquiridos del VOI del hipocampo y los niveles de metabolitos, donde sólo aparece una correlación positiva entre los ácidos grasos y el metabolismo cerebral. **B.** Imagen de la correlación de la imagen PET con las concentraciones de los metabolitos.

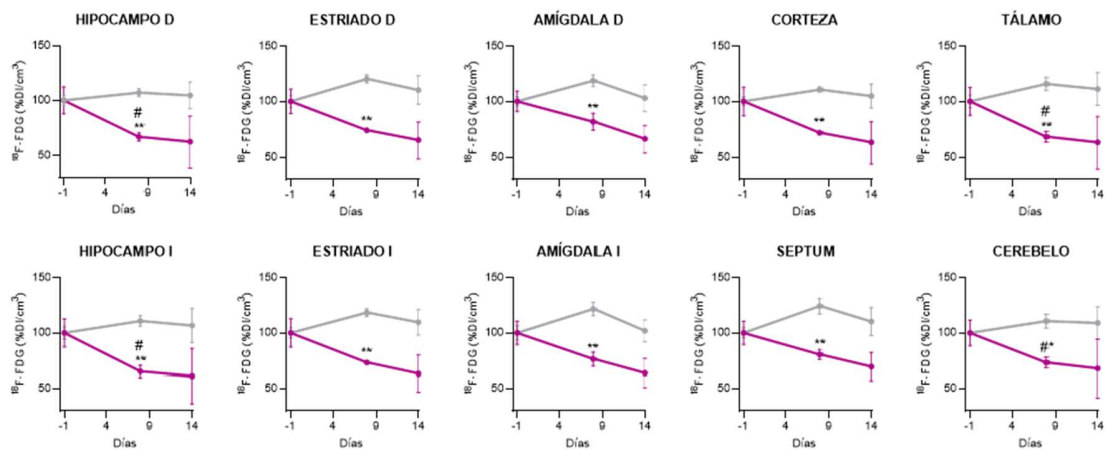
En conjunto, estos resultados indican que la activación de los astrocitos es capaz de modificar el perfil metabólico del hipocampo. Además, el aumento de mioinositol y de ácidos grasos ha correlacionado positivamente con los datos de la imagen PET del hipocampo, y el lactato una correlación negativa, lo que sugiere una relación entre estos metabolitos y el aumento de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG.

## 4.2. Efectos metabólicos durante epileptogénesis promovida por el *Status Epilepticus*

Evidencias clínicas han demostrado que un alto porcentaje de los pacientes epilépticos tienen antecedentes de haber sufrido un SE (*Sloviter, 2008*). Por otra parte, existe una clara correlación entre cambios metabólicos y la actividad crítica e intercrítica (*Duncan, 2009*). Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue estudiar los cambios metabólicos que subyacen a la epileptogénesis tras la inducción de un SE. Para ello, elegimos modelo de epilepsia por inyección de KA iHPC, ya que presenta un periodo de epileptogénesis definido en el que experimentan CE desde el día 5-7 tras la inyección de KA (*Gonder et al., 2003; Gröticke et al., 2008; Riban, et al., 2002*).

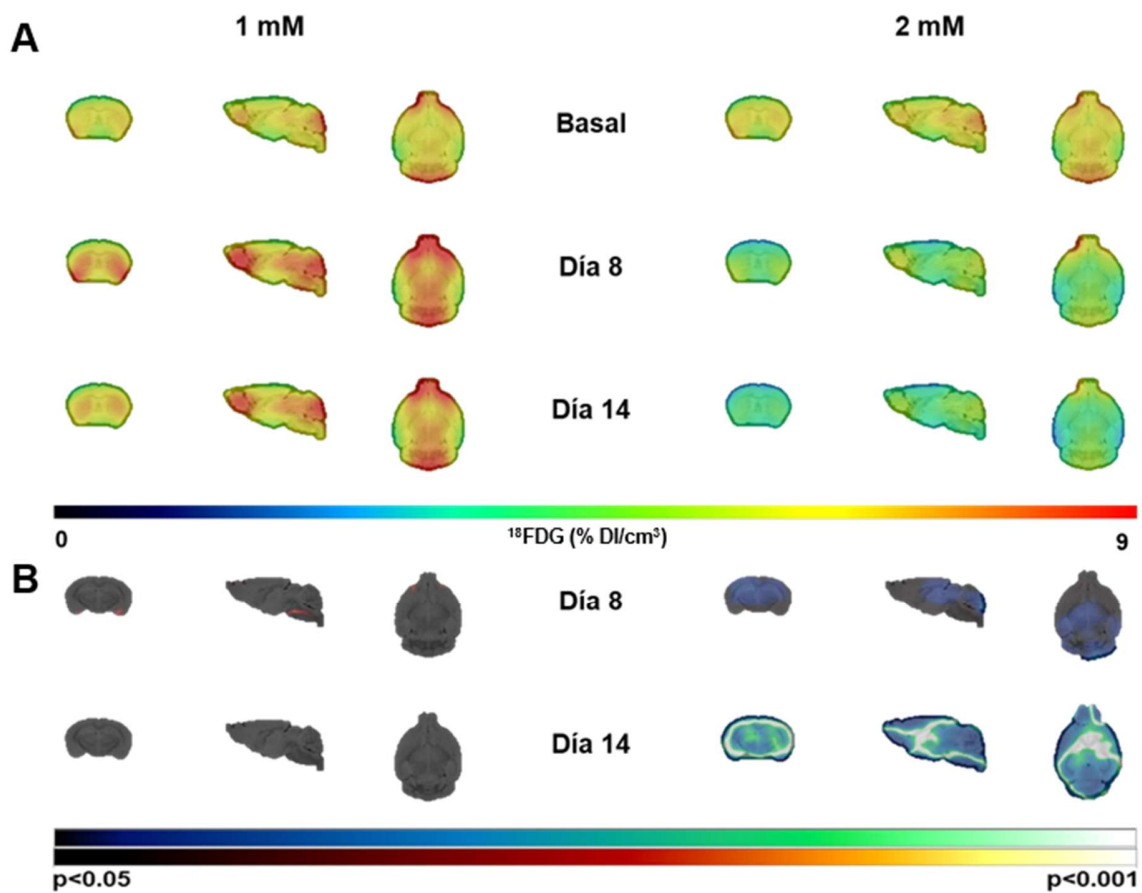
### 4.2.1. La actividad epileptiforme tras el SE se correlaciona con un hipometabolismo cerebral

Para valorar el efecto de la inyección de KA iHPC se utilizaron dos concentraciones de KA diferentes: una de 2 mM y otra de 1 mM. Todos los animales alcanzaron el SE. El grupo con 2 mM mostró una disminución significativa respecto al grupo con 1 mM en el día 8 (2 mM  $66,4 \pm 3,724\%$  n=3; 1 mM  $107,118 \pm 3,416\%$  n=3; p=0,007) y una disminución no significativa el día 14 (2 mM  $61,99 \pm 23,38\%$  n=2; 1 mM  $104,571 \pm 12,061\%$  n=3; p=0,08, Fig. 4.14).



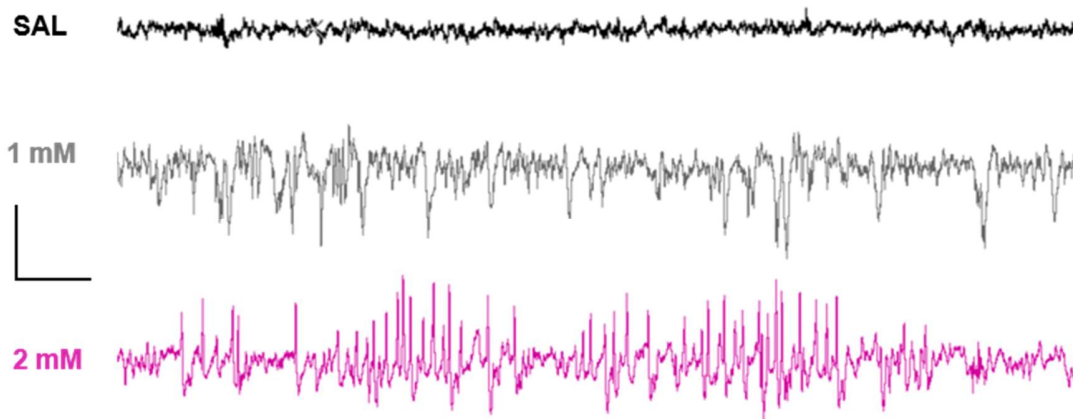
**Figura 4.14. Cuantificación de la imagen  $^{18}\text{F}$ -FDG PET en las concentraciones de 2 mM y 1 mM de KA a los 8 y 14 días.** La concentración de 2 mM (magenta) muestra un claro hipometabolismo respecto a su medida basal (-1, 100 %) y la de 1 mM (gris) en el día 8 (2 mM  $66,4 \pm 3,724\%$  n=3; 1 mM  $107,118 \pm 3,416\%$  n=3; p=0,007) y día 14 (2 mM  $61,99 \pm 23,38\%$  n=2; 1 mM  $104,571 \pm 12,061\%$  n=3; p=0,08), con una generalización a áreas extrahipocampales. ANOVA de dos vías de medidas repetidas, post-hoc Bonferroni. \*p<0,05 \*\*p<0,01 vs 1mM; #p<0,05 vs basal.

La inyección de 2 mM de KA (Bielefeld *et al.*, 2017; Canet *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2018) provocó una disminución significativa del metabolismo cerebral respecto a su medida basal en el hipocampo en el día 8 (-33,6%;  $p=0,02$ ) y día 14 (-38,1%;  $p=0,06$ ) que fue generalizada, observándose en varias regiones extrahipocampales. La concentración de 1 mM generó un SE, pero no se evidenciaron cambios en el patrón metabólico (día 8 7,1%  $p=0,98$ ; día 14 4,5%  $p>0,99$ . Fig. 4.14). La figura 4.15 muestra las medias de las imágenes PET por tratamiento (A) y su comparación con la medida basal (B).



**Figura 4.15. Estudios PET de las diferentes concentraciones de KA para el modelo de epilepsia. A.** Media de las imágenes PET por día y tratamiento. **B.** Comparación de las imágenes PET con la medida salino, donde se realzan las diferencias estadísticas entre las imágenes, comprobando la disminución (azul) del metabolismo).

En ambos casos se observó una señal de EEG anormal caracterizada por una actividad paroxística, mientras que el animal no mostraba ningún signo comportamental de crisis convulsiva (Fig. 4.16). En conjunto, estos resultados indican que la inyección de KA iHPC (2 mM) provoca un claro hipometabolismo tras la ventana de epileptogénesis (8 días) que se mantiene en el tiempo (14 días) y se correlaciona con un EEG anormal.

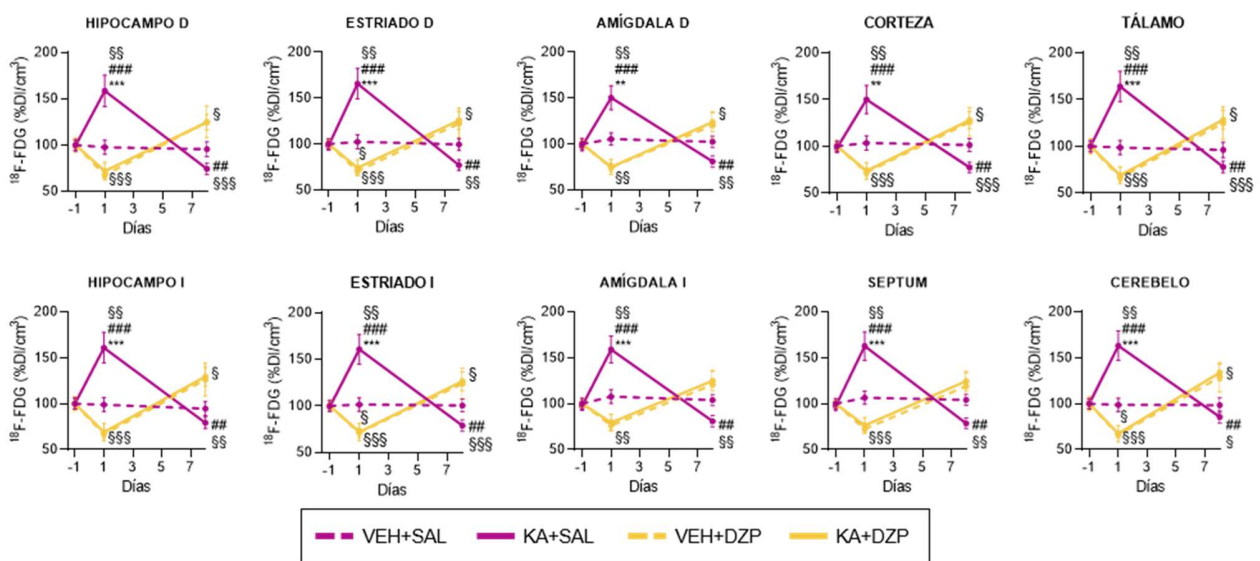


**Figura 4.16. Estudio EEG de diferentes concentraciones de KA para el modelo de epilepsia.** Las señales de EEG a los 7 días tras inyección de solución salina (negro), KA 1 mM (gris) y 2 mM (magenta) muestran una actividad anormal epiléptica, que se ve potenciada con la concentración 2 mM. Barra de escala 1V/2 min.

#### 4.2.2. La supresión farmacológica del SE modifica el patrón metabólico inducido por KA

El SE es una urgencia médica que requiere de una intervención inmediata si la crisis dura más de 5 minutos o durante este periodo de tiempo ocurren crisis repetitivas sin recuperación de la conciencia (Fisher, et al., 2014; Trinka, et al., 2015). Teniendo en cuenta este antecedente clínico, nos preguntamos si la supresión farmacológica del SE modifica el patrón metabólico inducido por KA. Para ello, se interrumpió el SE con una dosis de DZP (10 mg/kg, i.p.), una hora después del comienzo de los signos conductuales ya que éste fármaco ha demostrado su eficacia a la hora de detener las crisis en otros modelos animales de epilepsia (Töllner, et al., 2016; Wang, et al., 2019). Utilizamos cuatro grupos experimentales, dos con epilepsia (KA+DZP; KA+SAL) y dos controles (VEH+DZP; VEH+SAL), inyectados con DZP o salino. Se realizaron tres estudios PET: uno basal, previo a la inyección de KA, y otros dos al día 1 y 8 post

SE. Los resultados mostraron en el grupo KA+SAL un aumento en la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG al día 1 ( $159,7\pm 17,2\%$ ;  $p=0,007$ ), y una disminución en el día 8 ( $74,7\pm 6,1\%$ ,  $p<0,001$ ). Por el contrario, el grupo epiléptico tratado con DZP presentaba un patrón metabólico diferente, con una disminución no significativa en el día 1 ( $71,71\pm 10,2\%$ ;  $p=0,08$ ) y un aumento significativo de la captación en el día 8 ( $124,4\pm 8,2\%$ ;  $p=0,04$ ). Por otro lado, no existieron diferencias en el grupo VEH+SAL en comparación con su basal, aunque sí se observó una disminución significativa del metabolismo de la glucosa en el día 1 del grupo VEH+DZP ( $67,46\pm 4,1\%$   $n=7$ ;  $p<0,001$ ) y un aumento en el día 8 ( $124,98\pm 17,2\%$   $n=7$ ;  $p=0,26$ ). Las diferencias significativas ( $p<0,001$ ) en el día 1 se encontraron comparando el grupo KA+SAL ( $159,66\pm 17,2\%$   $n=15$ ) con VEH+SAL ( $97,42\pm 7,5\%$   $n=9$ ), VEH+DZP ( $67,46\pm 4,1\%$   $n=7$ ) y KA+DZP ( $64,94\pm 9,6\%$   $n=9$ ). En el día 8 las principales diferencias se encontraron entre KA+SAL ( $74,7\pm 6,1\%$   $n=15$ ), VEH+DZP ( $124,98\pm 17,2\%$   $n=7$   $p=0,005$ ) y KA+DZP ( $113,71\pm 8,2\%$   $n=9$   $p=0,002$ ) (Fig. 4.17). La figura 4.18 muestra el promedio de las imágenes PET en los tres puntos temporales (A) y la comparación estadística respecto al basal (B).



**Figura 4.17.** Cuantificación de la imagen  $^{18}\text{F}$ -FDG PET en el modelo de KA al día 1 y 8 tras la administración de DZP.

Las gráficas muestran en el modelo de epilepsia (KA+SAL) un aumento del metabolismo el día 1 ( $159,7\pm 17,2\%$   $n=15$ ;  $p=0,007$ ) y una disminución al día 8 ( $74,7\pm 6,1\%$   $n=15$ ;  $p<0,001$ ) que no se observa tras limitar el SE con DZP (KA+DZP día 1  $64,94\pm 9,6\%$   $n=9$  vs día 8  $113,71\pm 8,2\%$   $p=0,002$ ). ANOVA de dos vías de medidas repetidas, post-hoc Bonferroni. \* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,001$  SAL (VEH vs KA); # $p<0,05$  ## $p<0,01$  ### $p<0,001$  grupo KA (SAL vs DZP) § $p<0,05$  §§ $p<0,01$  §§§ $p<0,001$  vs medida basal.

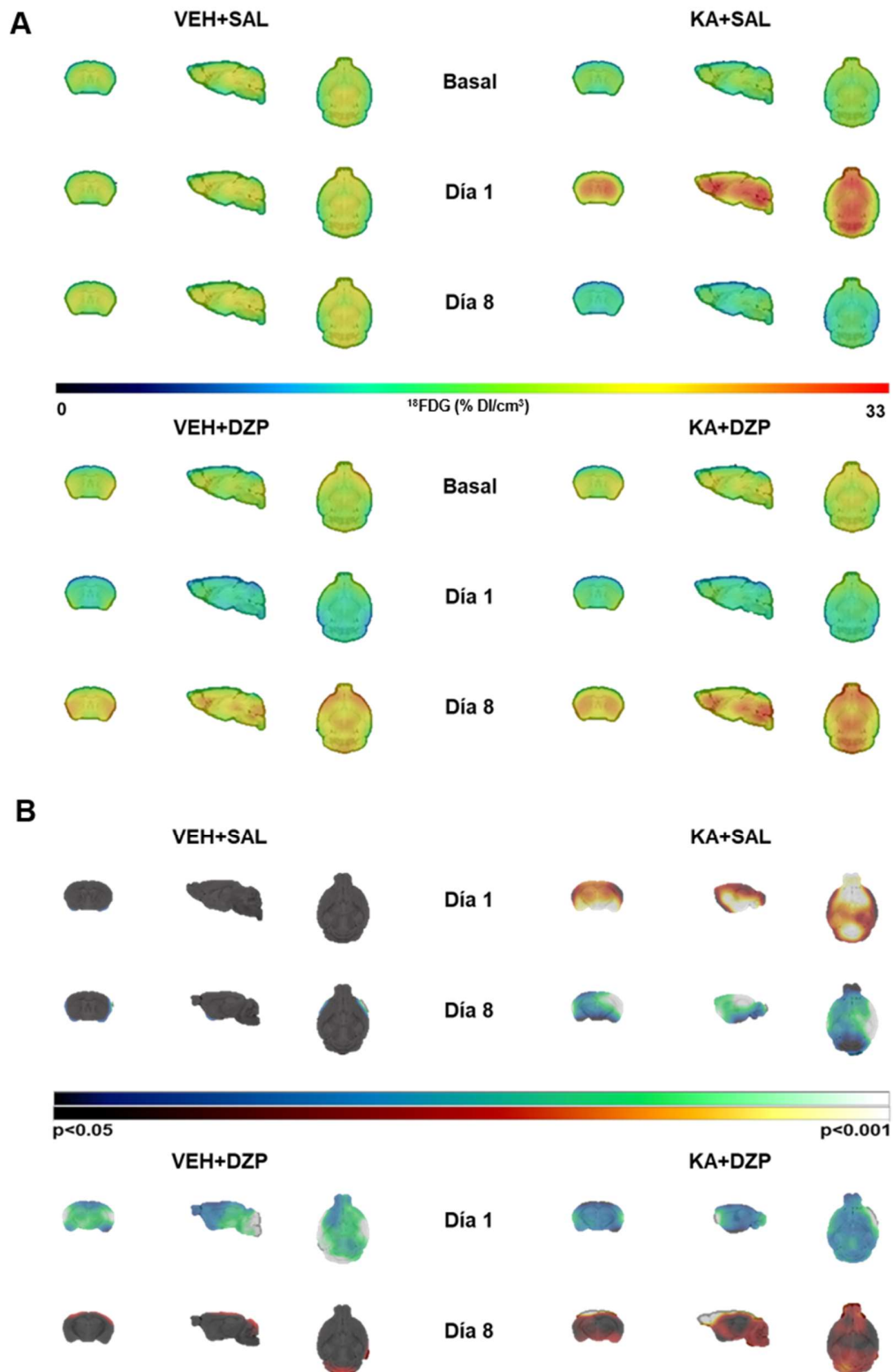
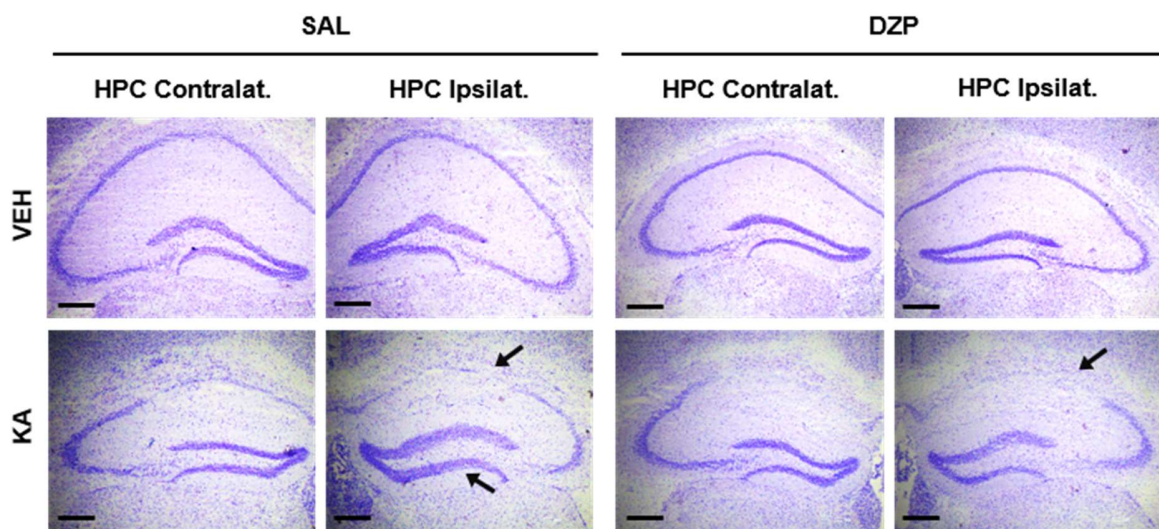


Figura 4.18. Estudios PET tras extinguir el SE con DZP en el modelo de KA. **A.** Media de las imágenes PET por día y tratamiento. **B.** Comparación de las imágenes PET con la medida basal, donde se realzan las diferencias estadísticas entre las imágenes, comprobando el aumento (rojo) o disminución (azul) del metabolismo.

### 4.2.3. El DZP no previene la muerte neuronal en el modelo de epilepsia

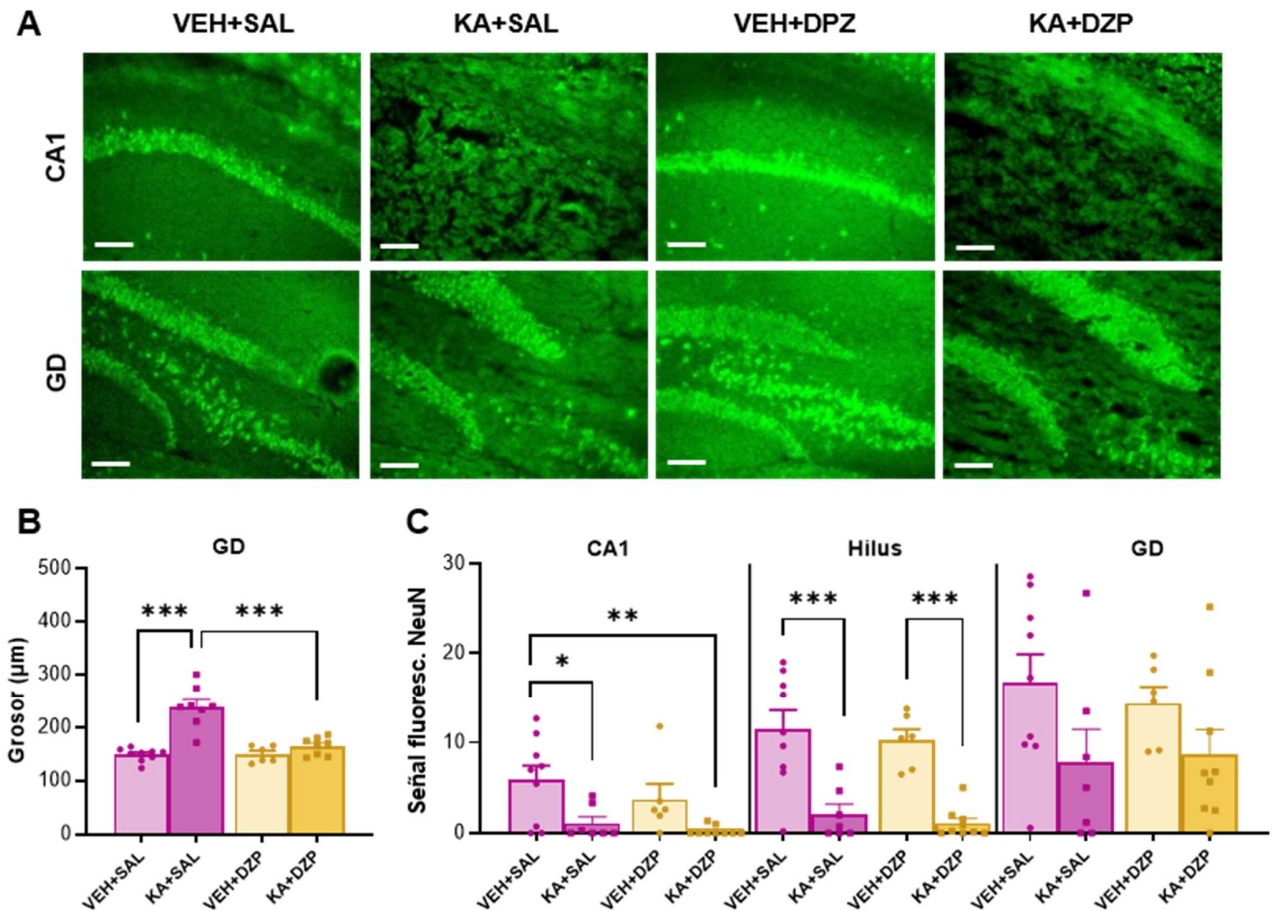
Para establecer si la interrupción del SE modifica el daño neuronal, la neurodegeneración y la neuroinflamación que normalmente se produce en este modelo, realizamos estudios histológicos y técnicas de inmunohistoquímica. La tinción de Nissl mostró una pérdida de la estructura de CA1 bilateral, tanto en el grupo epiléptico control como el tratado con DZP (Fig. 4.19).



**Figura 4.19.** Valoración de la desestructuración de los hipocampos en el modelo de epilepsia tras tratamiento con DZP. Imágenes de tinción de Nissl en el hipocampo ipsilateral y contralateral. Se observa neurodegeneración en CA1 de ambos hipocampos y un engrosamiento del GD. Barra de escala = 300  $\mu\text{m}$ .

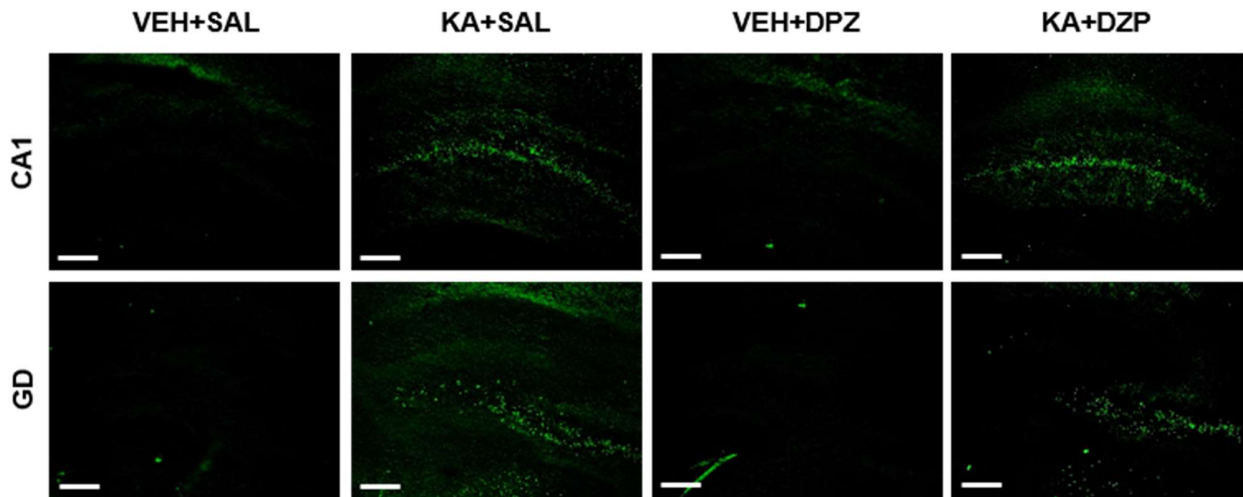
Sin embargo, cuando medimos el engrosamiento del GD en todos los grupos, las diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) se encontraron entre el grupo KA+SAL ( $238,63 \pm 13,6 \mu\text{m}$ ,  $n=8$ ) y los otros grupos (VEH+SAL  $148,94 \pm 4 \mu\text{m}$ ,  $n=9$ ; VEH+DZP  $149,83 \pm 6,26 \mu\text{m}$ ,  $n=6$ ; KA+DZP  $238,63 \pm 13,6 \mu\text{m}$ ,  $n=8$ ; Fig. 4.20). Para valorar la muerte neuronal, realizamos una inmunofluorescencia contra NeuN y analizamos las regiones CA1, hilus y GD del área hipocámpal. La cuantificación de la intensidad de este marcador neuronal mostró una disminución más acusada en el grupo epiléptico sin tratamiento con respecto a su control en CA1 (VEH+SAL  $5,89 \pm 1,58$   $n=9$ ; KA+SAL  $1,11 \pm 0,68$   $n=7$ ;  $p=0,04$ ) e hilus (VEH+SAL  $11,54 \pm 2,07$   $n=9$ ; KA+SAL  $2,1 \pm 1,08$   $n=7$ ;  $p < 0,001$ ). Además, se observó una pérdida neuronal significativa en KA+DZP respecto al VEH+SAL en CA1 (VEH+SAL  $5,89 \pm 1,58$   $n=9$  vs

KA+DZP  $0,26 \pm 0,17$   $n=9$ ;  $p=0,006$ ) Aunque también se redujo la cantidad de neuronas maduras en el grupo epiléptico tratado con DZP, las diferencias significativas respecto a su control se encontraron únicamente en el hilus (VEH+DZP  $10,25 \pm 1,21$   $n=6$  vs KA+DPZ  $1,09 \pm 0,55$   $n=9$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. 4.20).



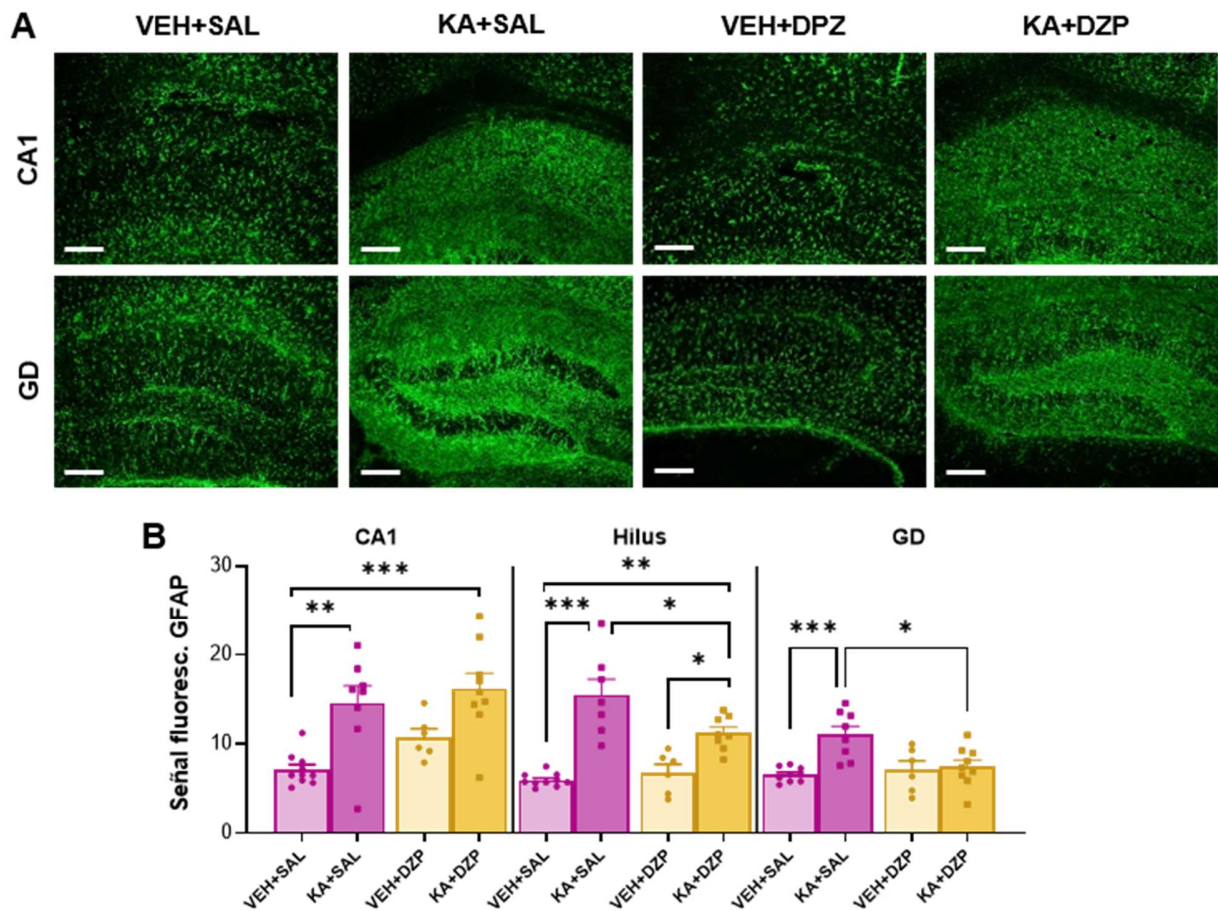
**Figura 4.20. Muerte neuronal en el modelo epiléptico tras el tratamiento con DZP.** A. Imágenes de inmunofluorescencia contra NeuN en CA1 y GD. Barra de escala = 100 µm. B. Gráfica de las medidas del GD donde se aprecia un mayor grosor en el grupo KA+SAL respecto a los otros grupos (KA+SAL  $238,63 \pm 13,6$  µm,  $n=8$  vs VEH+SAL  $148,94 \pm 4$  µm,  $n=9$ ; VEH+DZP  $149,83 \pm 6,26$  µm,  $n=6$ ; KA+DZP  $238,63 \pm 13,6$  µm,  $n=8$ ;  $p<0,001$ ). ANOVA de 2 vías posthoc Bonferroni.  $***p<0,001$ . C. Cuantificación de la fluorescencia de NeuN en CA1, Hilus y GD. Se observa una pérdida neuronal importante respecto al VEH+SAL en CA1 (VEH+SAL  $5,89 \pm 1,58$   $n=9$ ; KA+SAL  $1,11 \pm 0,68$   $n=7$ ;  $p=0,04$ ; KA+DZP  $0,26 \pm 0,17$   $n=9$ ;  $p=0,006$ ). En el hilus ambos grupos presentan una disminución significativa respecto su control (VEH+SAL  $11,54 \pm 2,07$   $n=9$  vs KA+SAL  $2,1 \pm 1,08$   $n=7$ ;  $p<0,001$ ; VEH+DZP  $10,25 \pm 1,21$   $n=6$  vs KA+DPZ  $1,09 \pm 0,55$   $n=9$ ,  $p<0,001$ ). ANOVA de 2 vías, posthoc Bonferroni.  $*p<0,05$   $**p<0,01$   $***p<0,001$ .

Conjuntamente, valoramos cualitativamente la neurodegeneración a través de una tinción con FJC, donde se observó el marcaje principalmente en las áreas CA1 y en el hilus de los grupos con epilepsia, en correspondencia con las áreas con mayor disminución de neuronas (Fig. 4.21).



**Figura 4.21. Neurodegeneración en el modelo epiléptico tras el tratamiento con DZP.** Imágenes de la tinción con FJC para la valoración cualitativa de la neurodegeneración, donde se aprecia principalmente en los grupos con epilepsia sin distinción del tratamiento. Barra de escala = 200  $\mu$ m.

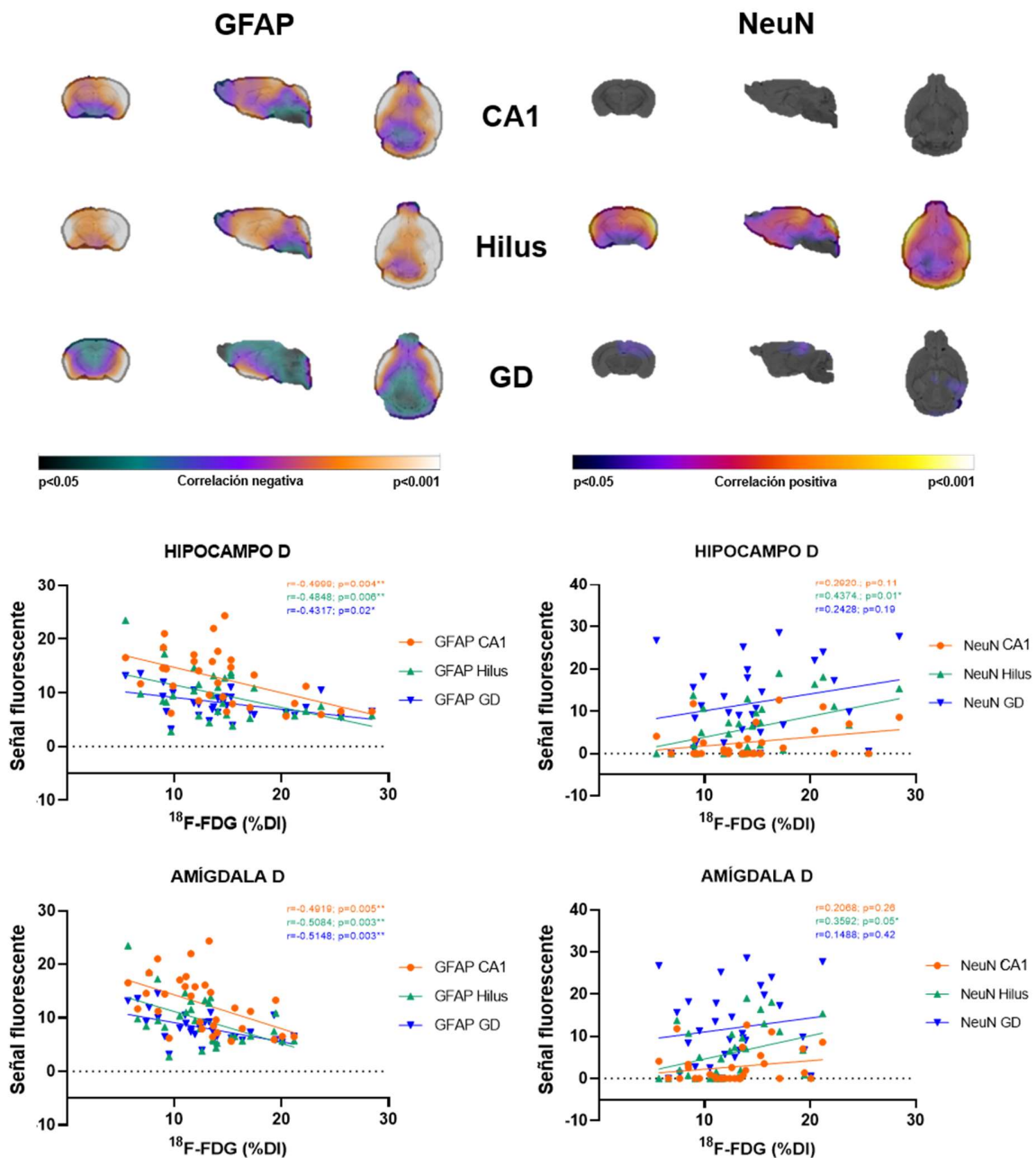
Además, exploramos la neuroinflamación mediada por astrocitos con la inmunofluorescencia contra GFAP, que mostró un aumento significativo entre el grupo epiléptico sin tratamiento y su control en CA1 (VEH+SAL  $7,129 \pm 0,561$   $n=10$  vs KA+SAL  $14,56 \pm 1,951$   $n=8$   $p=0,004$ ), hilus (VEH+SAL  $5,957 \pm 0,23$   $n=10$  vs KA+SAL  $15,517 \pm 1,756$   $n=7$ ;  $p<0,001$ ) y el GD (VEH+SAL  $6,553 \pm 0,275$   $n=9$  vs KA+SAL  $11,048 \pm 0,946$   $n=8$ ;  $p<0,001$ ). El grupo epiléptico tratado con DZP sólo mostró diferencias respecto a su control en el hilus (VEH+DZP  $6,801 \pm 0,935$   $n=6$  vs KA+DZP  $n=8$   $11,221 \pm 0,668$   $p=0,03$ ), pero no en CA1 (VEH+DZP  $10,742 \pm 0,963$   $n=6$  vs KA+DZP  $16,188 \pm 1,733$   $n=9$   $p=0,1$ ) o GD (VEH+DZP  $7,101 \pm 1,002$   $n=6$  vs KA+DPZ  $7,474 \pm 0,746$   $n=9$ ,  $p>0,99$ ). Entre los grupos KA+SAL y KA+DZP no se encontraron diferencias en CA1 ( $p>0,99$ ), pero sí en el hilus ( $p=0,02$ ) y GD ( $p=0,01$ ; Fig. 4.22).



**Figura 4.22. Astroglial activation in the epileptic model after DZP treatment. A.** Immunofluorescence images for GFAP in CA1 and GD. Scale bar = 200  $\mu$ m. **B.** Quantification of GFAP fluorescence signal in CA1, hilus and GD. Significant gliosis is observed in epileptic groups in CA1 (VEH+SAL  $7,129 \pm 0,561$   $n=10$  vs KA+SAL  $14,56 \pm 1,951$   $n=8$   $p=0,004$ ; VEH+DZP  $10,742 \pm 0,963$   $n=6$  vs KA+DZP  $16,188 \pm 1,733$   $n=9$   $p=0,1$ ) and hilus (VEH+SAL  $5,957 \pm 0,23$   $n=10$  vs KA+SAL  $15,517 \pm 1,756$   $n=7$   $p<0,001$ ; VEH+DZP  $6,801 \pm 0,935$   $n=6$  vs KA+DZP  $n=8$   $11,221 \pm 0,668$   $p=0,03$ ). No significant differences were found in the dentate gyrus of CA1 after DZP treatment, but in hilus ( $p=0,02$ ) and GD ( $p=0,01$ ). ANOVA with 2-way, posthoc Bonferroni. \* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,001$ .

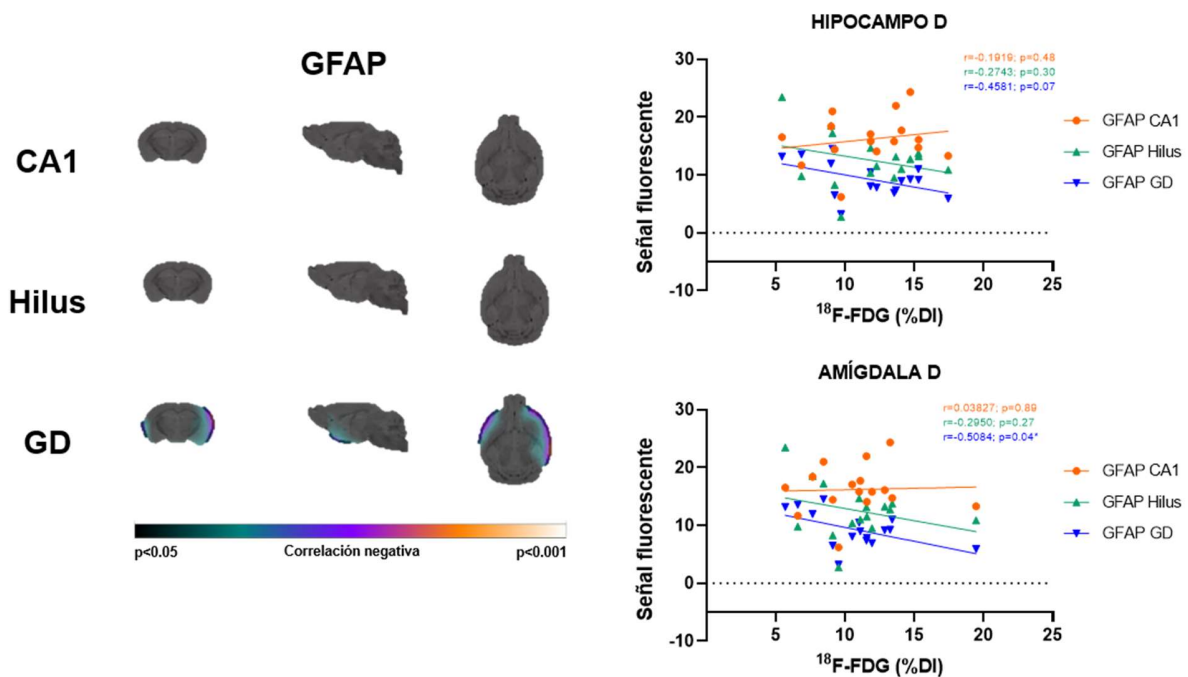
The next step was to search for correlations between the quantification of immunohistochemistry and PET imaging. First, we included in the correlation analysis all experimental groups, with the aim of observing the changes produced both by KA and by DZP. The results showed that at 8 days there was a negative correlation between the intensity of GFAP in GD ( $r=-0,4317$   $n=31$ ;  $p=0,02$ ), CA1 ( $r=-0,4999$   $n=31$ ;  $p=0,004$ ) and hilus ( $r=-0,4848$   $n=31$ ;  $p=0,006$ ), both in the SPM image and in the linear regression for both hippocampus and other brain areas, such as the temporal cortex and the amygdala. This would imply that a higher degree of astrocytic reactivity corresponds to a lower

metabolismo cerebral, siendo más intenso en el hemisferio ipsilateral a la inyección. Por otro lado, se observó una correlación positiva con la intensidad de NeuN en el hilus ( $r=0,4374$   $n=31$ ;  $p=0,01$ ) y el metabolismo, por lo que una mayor cantidad de neuronas en esta zona se corresponde con mayores niveles de metabolismo en el PET (Fig. 4.23).



**Figura 4.23. Correlaciones entre la imagen PET y la cuantificación inmunohistoquímica.** En la parte superior se encuentran las imágenes de SPM mostrando las áreas de correlación negativa (GFAP) y positiva (NeuN). Abajo, las gráficas muestran la regresión lineal entre la cuantificación del PET de ambos hipocampos y la cuantificación de la intensidad de la inmunofluorescencia. Las correlaciones fueron más pronunciadas en el hipocampo ipsilateral a la inyección.

Seguidamente, realizamos el mismo análisis, esta vez incluyendo sólo los grupos epilépticos para valorar el efecto del DZP en el modelo. En el día 8 se encontró una correlación negativa entre la intensidad de GFAP del GD y el metabolismo del PET en la amígdala ipsilateral ( $r=0,5084$   $n=13$ ;  $p=0,04$ ) (Fig. 4.24).



**Figura 4.24. Correlación de la imagen PET e inmunofluorescencia entre los grupos con epilepsia tras el tratamiento con DZP.** A la izquierda, representación de SPM de correlación entre la imagen PET y la intensidad de GFAP en el GD, donde se aprecia la correlación negativa en la corteza y amígdala ipsilateral a la inyección. A la derecha, la gráfica de la regresión lineal entre la captación de  $^{18}\text{F-FDG}$  de la amígdala ipsilateral y la inmunofluorescencia muestra una correlación negativa, coincidiendo con la imagen de SPM. No hubo correlación entre NeuN y la captación de  $^{18}\text{F-FDG}$ .

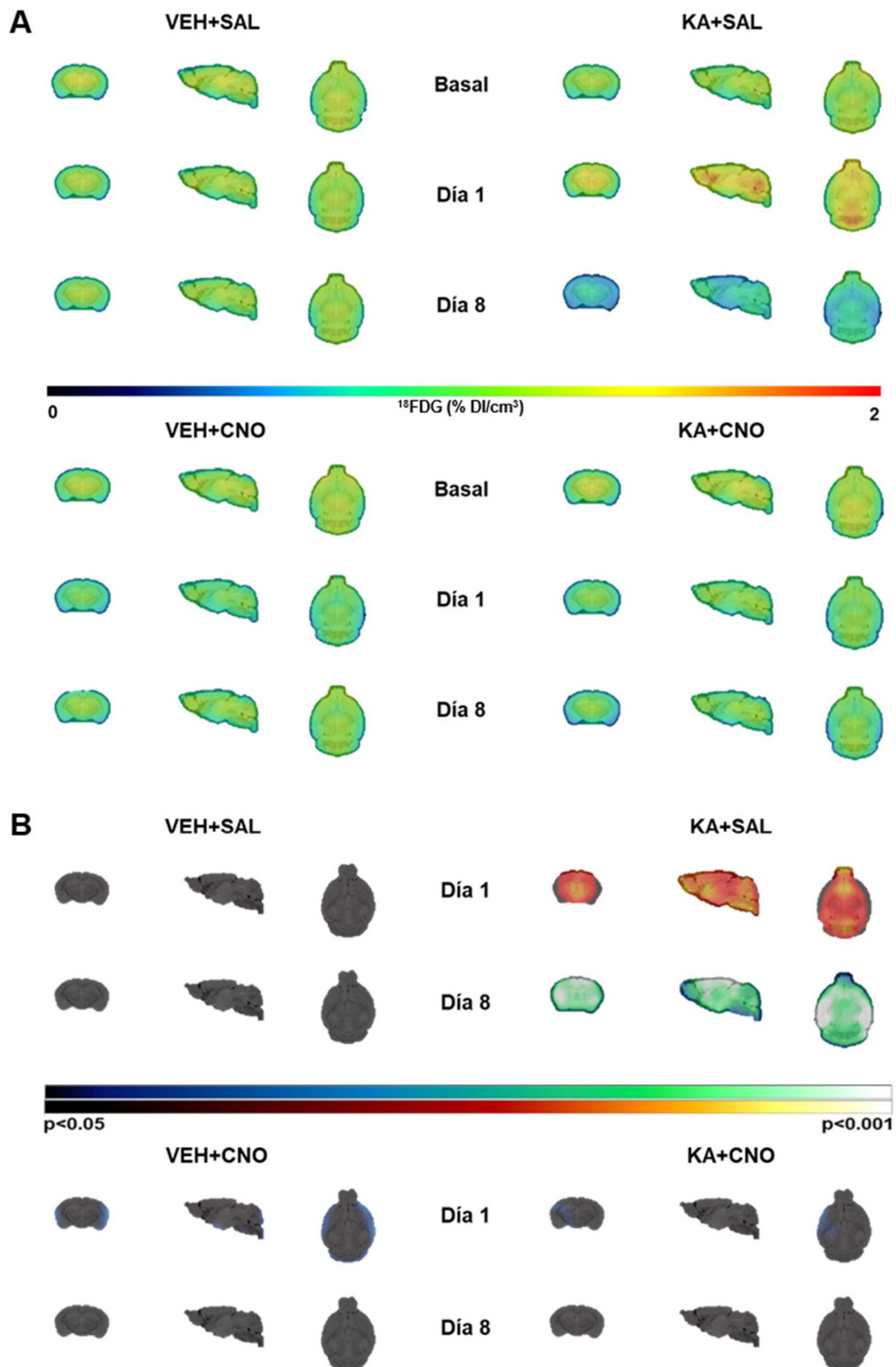
Analizados en su conjunto, podemos concluir que la supresión farmacológica del SE modifica el patrón metabólico el que se correlaciona con las modificaciones estructurales del hipocampo inducidas por la inyección iHPC de KA.

### 4.3. Reversión del cambio metabólico durante la epileptogénesis tras la activación de los astrocitos

Los datos experimentales mostrados hasta el momento indican que la activación de los astrocitos aumenta la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG por un mecanismo mediado por calcio a través de receptores  $\text{Ip}_3$ , en la que intervienen, además, los transportadores GLUT1 astrocitario. Por otra parte, la generación de una actividad epileptiforme por la inyección de KA iHPC mostró un aumento en la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG el día 1 post inyección y un hipometabolismo a los 8 días asociado con la consolidación de la epilepsia. Dada la posible influencia de los astrocitos en el hipometabolismo que aparece tras la epileptogénesis, utilizamos tanto quimiogenética como optogenética para activar éstas células tras el SE.

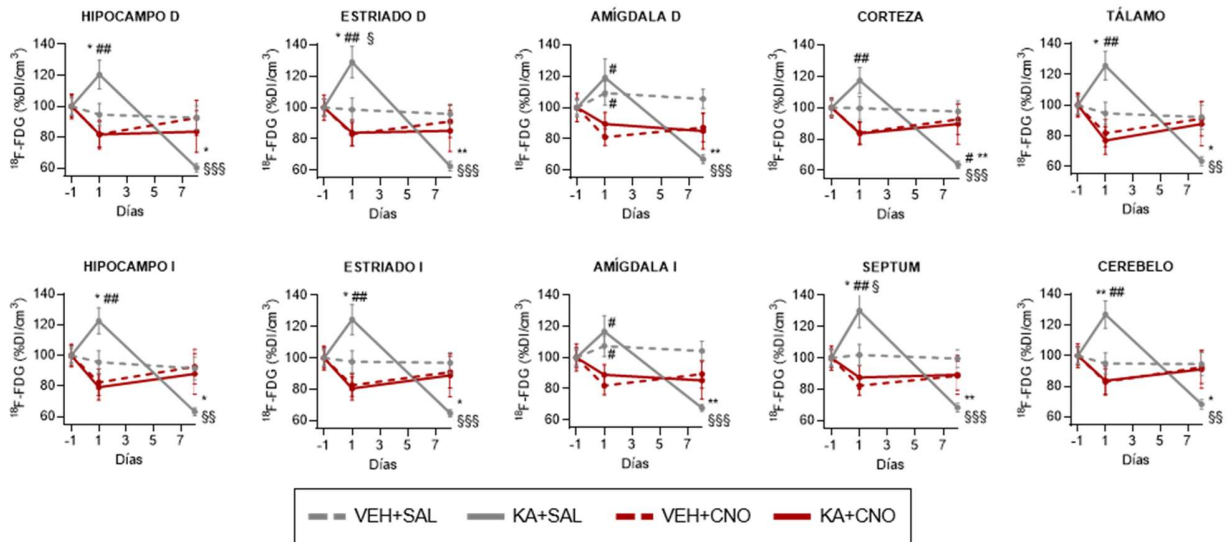
#### 4.3.1. La activación quimiogenética de los astrocitos revierte el patrón metabólico tras el SE

Se activaron los astrocitos administrando CNO desde el día 1 al 7 post SE coincidiendo con la ventana de epileptogénesis establecida previamente. El primer día de tratamiento el CNO se administró una dosis de 3 mg/kg i.p., tras la inducción de SE, para continuar con una dosis de 1 mg/kg entre los días 2 al 7. Al igual que en los experimentos anteriores, se realizaron tres estudios PET que incluían un estudio basal previo a la inyección KA iHPC, uno al día siguiente (en el cual se administró la dosis de CNO 10 minutos antes de la  $^{18}\text{F}$ -FDG) y otro al día 8 cuando el tratamiento ya había concluido. Los datos a continuación se normalizaron en porcentajes respecto a la medida basal. La imagen PET mostró cambios significativos en el grupo KA+SAL que no se contemplaron en el grupo tratado (KA+CNO), tal y como representa la figura 4.25. En consonancia con los experimentos previos, la cuantificación en el KA+SAL respecto a su control VEH+SAL mostró un hipermetabolismo el día 1 (VEH+SAL  $94,611 \pm 7,251\%$  n=9 vs KA+SAL  $120,427 \pm 9,152\%$  n=7;  $p=0,13$ ) y un hipometabolismo el día 8 (VEH+SAL  $92,563 \pm 7,712\%$  n=9 vs KA+SAL  $60,255 \pm 2,723\%$  n=7;  $p=0,03$ ). Cuando realizamos el tratamiento con CNO, el grupo con epilepsia mostró un patrón similar a su respectivo control, disminuyendo levemente la captación de glucosa el día 1 (VEH+CNO  $81,902 \pm 8,253\%$  n=7 vs KA+CNO  $81,828 \pm 9,337\%$  n=6;  $p>0,99$ ) y normalizándose otra vez el día 8 (VEH+CNO  $92,459 \pm 11,341\%$  n=7 vs KA+CNO  $83,611 \pm 13,43\%$  n=6;  $p<0,99$ ) (Fig. 4.26).



**Figura 4.25. Estudios PET tras la activación de astrocitos con quimiogenética en el modelo de KA.** **A.** Media de las imágenes PET por día y tratamiento. **B.** Comparación de las imágenes PET con la medida basal, donde se realizan las diferencias estadísticas entre las imágenes, comprobando el aumento (rojo) o disminución (azul) del metabolismo.

Estos resultados demuestran que la activación crónica de los astrocitos con quimiogenética revierten los cambios metabólicos inducidos por KA y previenen el hipometabolismo observado tras el SE.

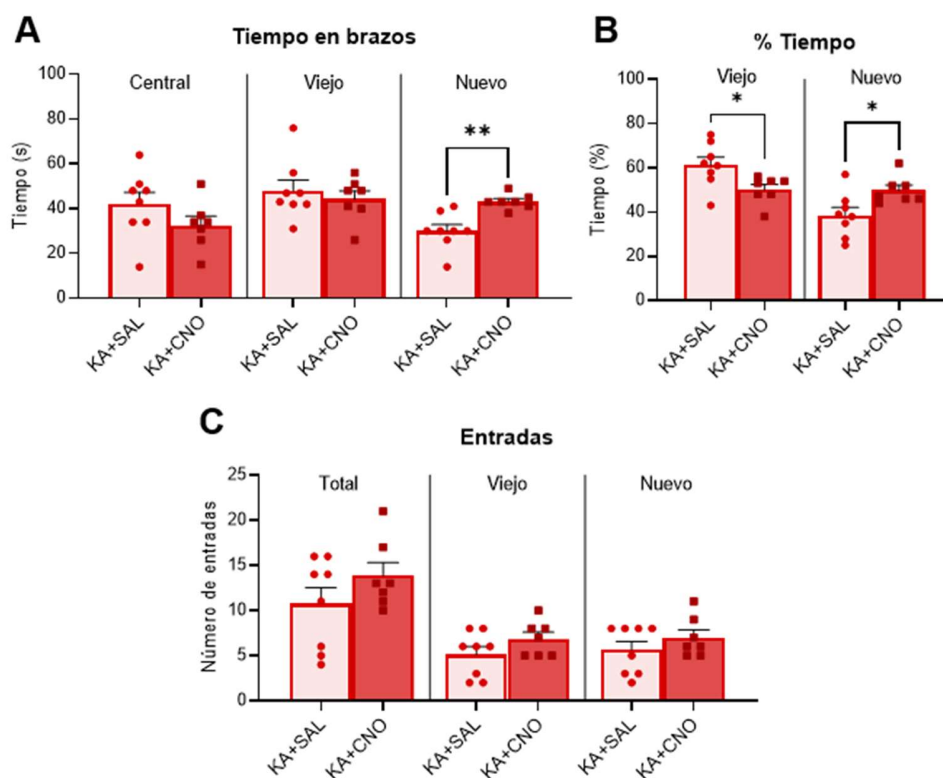


**Figura 4.26. Cuantificación de la imagen  $^{18}\text{F}$ -FDG PET en el modelo de KA al día 1 y 8 tras la activación de los astrocitos con quimiogenética.** Las gráficas muestran diferencias significativas en el modelo de epilepsia sin tratamiento al día 1 (VEH+SAL  $94,611 \pm 7,251\%$   $n=9$  vs KA+SAL  $120,427 \pm 9,152\%$   $n=7$ ;  $p=0,13$ ) y al día 8 (VEH+SAL  $60,255 \pm 2,723\%$   $n=7$ ;  $p=0,03$ ). Sin embargo, estas diferencias no se encontraron en el grupo tratado (Día 1: VEH+CNO  $81,902 \pm 8,253\%$   $n=7$  vs KA+CNO  $81,828 \pm 9,337\%$   $n=6$ ;  $p>0,99$ ; Día 8: VEH+CNO  $92,459 \pm 11,341\%$   $n=7$  vs KA+CNO  $83,611 \pm 13,43\%$   $n=6$ ;  $p<0,99$ ). ANOVA de dos vías de medidas repetidas, post-hoc Bonferroni. \* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,001$  SAL (VEH vs KA); # $p<0,05$  ## $p<0,01$  ### $p<0,001$  grupo KA (SAL vs CNO) § $p<0,05$  §§ $p<0,01$  §§§ $p<0,001$  vs medida basal.

### 4.3.2. La activación quimiogenética de los astrocitos reduce el deterioro en la memoria espacial asociados al KA

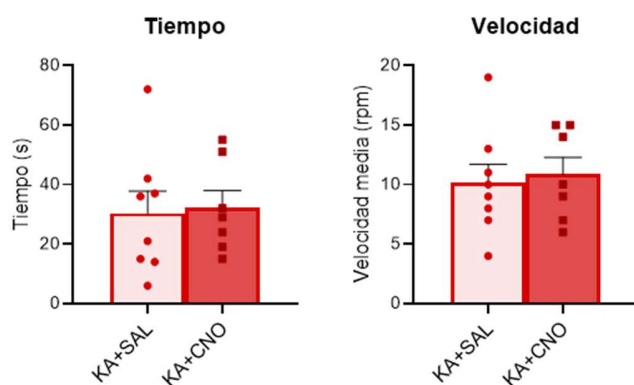
Dado que el hipocampo se ve comprometido en el modelo utilizado, se valoró la funcionalidad de esta estructura mediante una prueba comportamental con un laberinto en T, que permite valorar la conducta natural de estos animales en explorar objetos o lugares novedosos (*d'Isa, et al., 2021*). En este caso, un animal con la memoria conservada sabría orientarse en el espacio y reconocer el brazo en el que ha estado con anterioridad, pasando rápidamente a explorar el brazo nuevo. Los resultados muestran que los animales tratados con CNO pasaron más tiempo explorando el brazo nuevo ( $43,14 \pm 1,28$   $n=7$ ) respecto a los tratados con solución salina ( $30 \pm 2,909$   $n=8$ ;  $p=0,002$ ), lo que implica que la funcionalidad del hipocampo está conservada. Cuando estimamos el porcentaje que pasaron en cada brazo en relación al

tiempo total en los brazos laterales, se observó que el grupo KA+CNO permanecía menos tiempo en el brazo viejo (SAL  $61,38 \pm 3,54$  s  $n=8$  vs CNO  $50,14 \pm 2,334$  s  $n=7$ ;  $p=0,02$ ) y más en el nuevo (SAL  $38,63 \pm 3,54$  s  $n=8$  vs CNO  $49,86 \pm 2,334$  s  $n=7$ ;  $p=0,02$ ). Aunque no hubo diferencias en el número de entradas a cada brazo (Viejo: SAL  $5,63 \pm 0,94$  s  $n=8$  vs CNO  $7 \pm 4,9$  s  $n=7$   $p=0,3$ ; Nuevo SAL  $5,13 \pm 0,88$  s  $n=8$  vs CNO  $6,86 \pm 0,74$  s  $n=7$   $p=0,16$ ), el grupo con tratamiento tuvo más hiperactividad en el movimiento y más entradas a cada brazo en total (SAL  $10,75 \pm 1,78$  s  $n=8$ ; CNO  $13,86 \pm 1,455$  s  $n=7$ ;  $p=0,21$ ; Fig. 4.27).



**Figura. 4.27. Análisis del comportamiento en el laberinto en T.** **A.** La cuantificación del tiempo pasado en cada brazo muestra que los ratones con tratamiento pasaron más tiempo en el brazo nuevo (SAL  $30 \pm 2,909$   $n=8$  vs CNO  $43,14 \pm 1,28$   $n=7$ ;  $p=0,002$ ). Prueba T de Student.  $**p<0,01$ . **B.** El cálculo del tiempo en cada brazo en base al porcentaje en tiempo total en los brazos de elección mostró que el grupo KA+SAL pasó más tiempo en el brazo viejo (SAL  $61,38 \pm 3,54$   $n=8$  vs CNO  $50,14 \pm 2,334$   $n=7$ ;  $p=0,02$ ) y menos en el nuevo (SAL  $38,63 \pm 3,54$   $n=8$  vs CNO  $49,86 \pm 2,334$   $n=7$ ;  $p=0,02$ ). Prueba T de Student.  $*p<0,05$ . **C.** La cuantificación del número de entradas a cada brazo no reveló diferencias entre los grupos en el brazo viejo (SAL  $5,63 \pm 0,94$   $n=8$  vs CNO  $7 \pm 4,9$   $n=7$   $p=0,3$ ) o en el nuevo (SAL  $5,13 \pm 0,88$   $n=8$  vs CNO  $6,86 \pm 0,74$   $n=7$   $p=0,16$ ). Prueba T de Student.

Teniendo en cuenta que el CNO es un metabolito de la CZP y que rápidamente se metaboliza en CZP en el organismo (Mannich *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022), evaluamos la coordinación motora de ambos grupos con la prueba de Rotarod para descartar que un tratamiento crónico con CNO produjese un enlentecimiento motor al actuar sobre el sistema dopaminérgico (MacLaren *et al.*, 2016). En este test no se encontraron diferencias entre los grupos, ni en el tiempo que se mantenían en movimiento antes de caerse (SAL  $30,38 \pm 7,48$  n=8 vs CNO  $32,14 \pm 5,82$  n=7;  $p=0,86$ ), ni en la velocidad media a la que finalmente caían (SAL  $10,13 \pm 1,59$  n=8 vs CNO  $10,86 \pm 1,44$  n=7;  $p=0,74$ ; Fig. 4.28). De esta forma, descartamos que un tratamiento crónico con CNO pueda afectar el sistema motor *per se*.



**Figura 4.28. Análisis de la prueba Rotarod.**

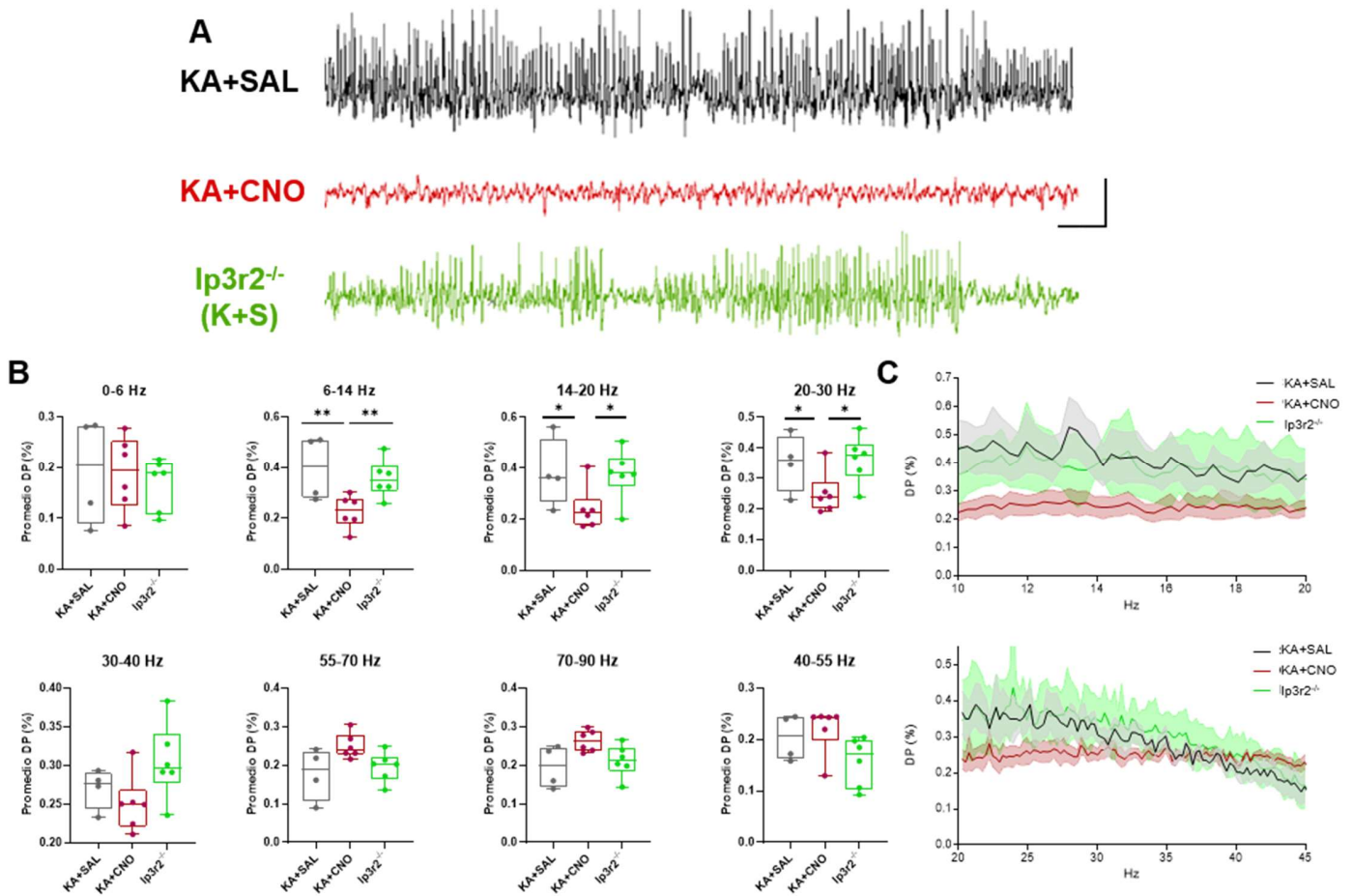
A la izquierda, el tiempo que pasaron sobre el rodillo no mostró diferencias entre los grupos (SAL  $30,38 \pm 7,48$  n=8 vs CNO  $32,14 \pm 5,82$  n=7;  $p=0,86$ ). A la derecha, la velocidad media en la cual finalizaron la prueba, que tampoco reflejó diferencia entre tratamientos (SAL  $10,13 \pm 1,59$  n=8 vs CNO  $10,86 \pm 1,44$  n=7;  $p=0,74$ ). Prueba T de Student.

### 4.3.3. La activación de los astrocitos modifica el EEG movilizando calcio a través de Ip3r2

Datos experimentales previos presentados en este trabajo indican que la movilización de calcio astrocitario a través de Ip3r2 es fundamental para que la activación de los astrocitos provoque cambios metabólicos, ya que estos cambios no se observan en los ratones  $Ip3r2^{-/-}$ . Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue determinar el papel del calcio astrocitario en los cambios electroencefalográficos característico del modelo de epilepsia empleado.

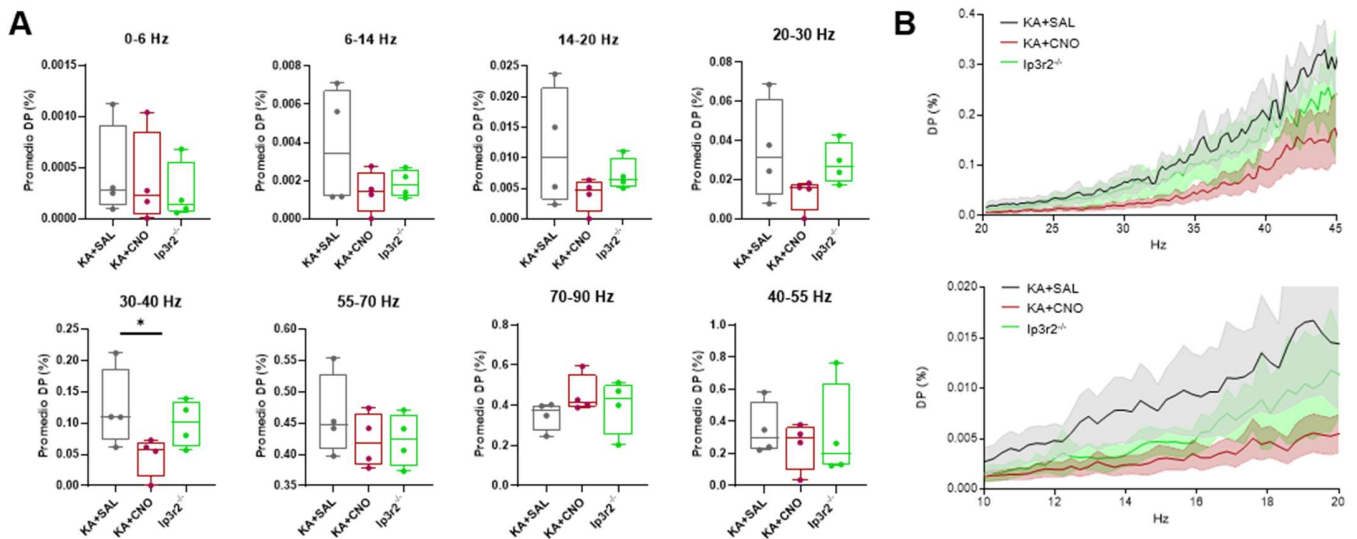
En estos experimentos, se indujo el modelo de epilepsia y se analizó la señal EEG de los grupos con tratamiento SAL y CNO, y de un grupo de animales  $Ip3r2^{-/-}$  que no tenían DREADDs, pero que recibieron un tratamiento de salino durante el período de epileptogénesis tras la inyección de KA. Se registró el EEG el día 7, 30 minutos antes y 30 minutos después de

la inyección con salino o CNO. Se comparó la señal post respecto al pre tratamiento y se realizó un análisis espectral de DP. Los resultados muestran que el grupo CNO tuvo una disminución en la DP en las frecuencias comprendidas entre 6 y 30 Hz (CNO  $0,24\pm 0,028$  n=6), respecto al SAL ( $0,377\pm 0,055$  n=4; p=0,05) y el  $Ip3r2^{-/-}$  ( $0,366\pm 0,033$  n=6; p=0,05). No hubo diferencias entre SAL y  $Ip3r2^{-/-}$  (p=0,86; Fig. 4.29).



**Figura 4.29. Análisis de señal EEG tras tratamiento con quimiogenética en el día 7 post KA.** **A.** Muestra representativa de señales EEG del grupo salino (negro), CNO (rojo) e  $Ip3r2^{-/-}$  (verde). Escala 0,5 V/2 s **B.** Promedios de densidad de potencia de diferentes bandas de frecuencia. Las diferencias más representativas respecto al CNO se encuentran en las frecuencias entre 6-14 Hz (CNO  $0,2262\pm 0,02$  n=6 vs SAL  $0,3973\pm 0,06$  n=4 p=0,001; vs  $Ip3$   $0,3572\pm 0,03$  n=6 p=0,006), 14-20 Hz (CNO  $0,2409\pm 0,15$  n=6 vs SAL  $0,3811\pm 0,07$  n=4 p=0,03; vs  $Ip3$   $0,3765\pm 0,04$  n=6 p=0,02), 20-30 Hz (CNO  $0,2520\pm 0,18$  n=6 vs SAL  $0,3515\pm 0,48$  n=4 p=0,04; vs  $Ip3$   $0,3641\pm 0,28$  n=6 p=0,01) y 30-40 Hz (CNO  $0,251\pm 0,02$  n=6 vs SAL  $0,27\pm 0,01$  n=4 p=0,42; vs  $Ip3$   $0,305\pm 0,02$  n=6 p=0,038). **C.** Representación de la señal en porcentaje de densidad de potencia. ANOVA de 1 vía, post hoc Tukey. \*p<0,05 \*\*p<0,01.

Para determinar cuánto tiempo se mantenía esta diferencia, entre los días 24 y 28 post SE se realizaron registros de EEG continuos. Sin embargo, el patrón de EEG del modelo de KA fue muy variable, observándose diferencias electrográficas en ratones que pertenecían al mismo grupo. De esta forma, procedimos a analizar el registro del día 28 normalizado a la señal basal del día 7, observándose una tendencia en la disminución de la densidad de potencia en las bandas de frecuencias de 14 a 30 Hz, aunque estos valores no fueron significativos. No obstante, se apreciaron diferencias significativas del grupo KA+CNO ( $0,048\pm 0,016$  n=4) respecto al KA+SAL ( $0,123\pm 0,032$  n=4;  $p=0,03$ ) en la franja de 30 a 40 Hz, pero no en  $Ip3r2^{-/-}$  ( $0,099\pm 0,019$ ;  $p=0,18$ ) (Fig. 4.30).

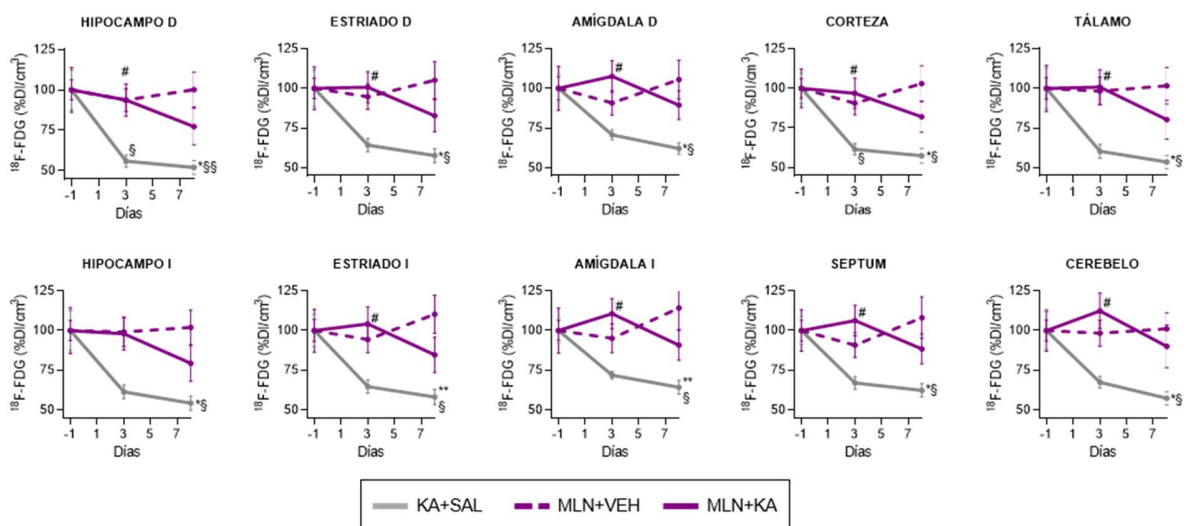


**Figura 4.30. Análisis de señal EEG tras tratamiento con quimiogenética en el día 29 post KA.** **A.** Promedios de densidad de potencia de diferentes bandas de frecuencia, que muestra una única diferencia significativa en las frecuencias de 30 a 40 Hz entre SAL y CNO (SAL  $0,123\pm 0,032$  n=4; vs  $0,048\pm 0,016$  n=4  $p=0,03$ ). **B.** Representación de la señal en porcentaje de densidad de potencia. ANOVA de 1 vía, post-hoc Tukey. \* $p<0,05$ .

#### 4.3.4. La activación optogenética de los astrocitos revierte el patrón metabólico en el modelo de epilepsia por KA

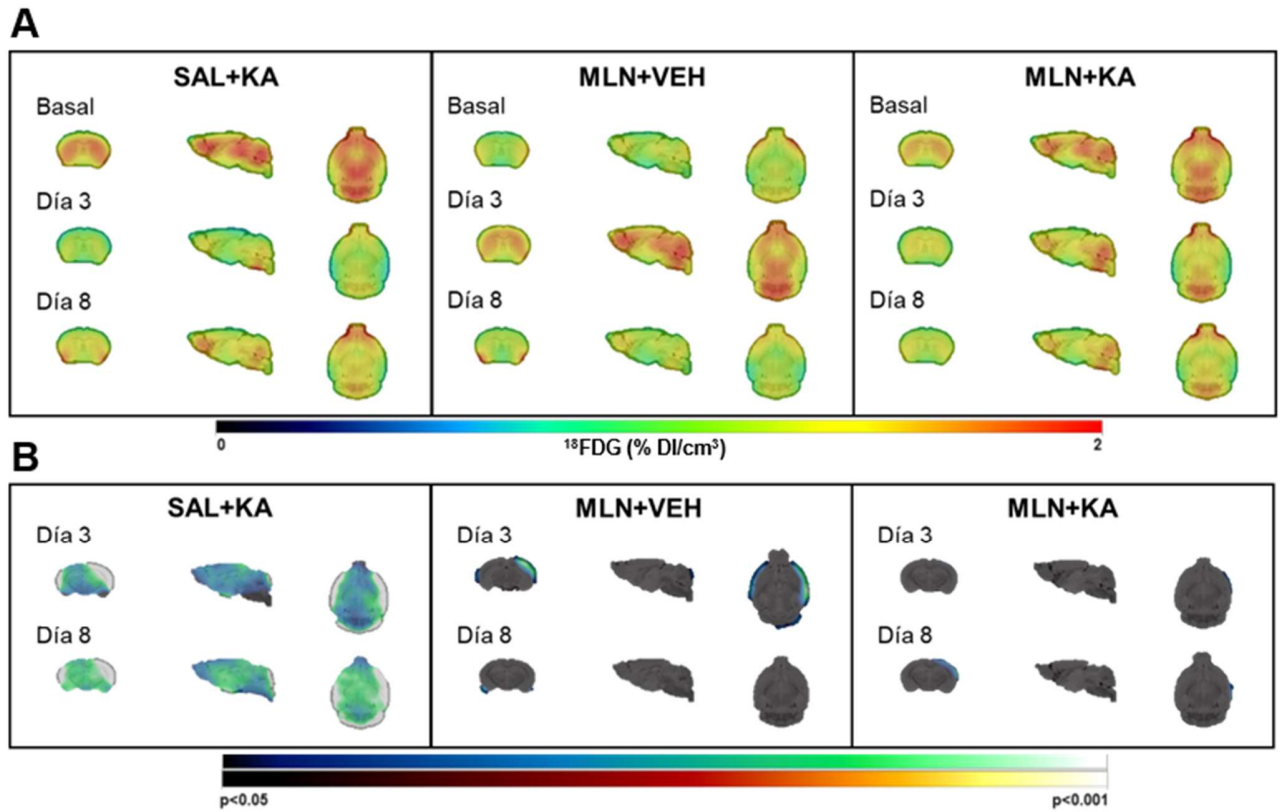
Para reforzar el hallazgo que la activación de los astrocitos revierte el patrón metabólico a los 7 días de inducido un SE, se manipuló la actividad de los astrocitos con técnica de optogenética. En estos estudios se utilizó MLN, una opsina acoplada a proteínas Gq que eleva la concentración de calcio intracelular a través de  $Ip3$  (Panda *et al.*, 2005) y ha demostrado ser una herramienta eficaz para el control preciso de la actividad astrocitaria (Mederos, *et al.*, 2019).

En este caso utilizamos tres grupos experimentales. El primero fue un grupo control al que se le inyectó salino en lugar de MLN y se les implantó la cánula para descartar el efecto que provocaba la luz *per se* (grupo SAL+KA, n=5). Los otros dos grupos fueron inyectados con MLN 3 semanas antes de la inyección de KA e implantación de la cánula, distinguiéndose en el control (MLN+VEH, n=5) y epiléptico (MLN+KA, n=8). Los animales contaron con un PET basal, uno a los 3 días y otro a los 8 días post SE. Los resultados mostraron que el grupo epiléptico sin tratamiento presentaba menos captación de glucosa al día 3 ( $55,967 \pm 3,686\%$  n=5;  $p=0,02$ ), y este hipometabolismo se acentuaba a los 8 días ( $52,117 \pm 4,278\%$  n=5;  $p=0,009$ ), en consonancia con los resultados previos del modelo, sin que la activación por luz produjera cambios significativos. El grupo MLN+VEH no mostró diferencias respecto al basal tras el tratamiento con estimulación optogenética (día 3  $93,77 \pm 6,995\%$  n=5  $p>0,99$ ; día 8  $100,217 \pm 10,795\%$  n=5  $p=>0,99$ ), por lo que la activación de los astrocitos con este método no produce cambios en el metabolismo. Esto concuerda con los resultados del grupo VEH+CNO en el tratamiento con quimiogénica. Las diferencias las encontramos principalmente en el grupo MLN+KA respecto al grupo SAL+KA, ya que se revirtió el hipometabolismo del día 3 ( $93,775 \pm 9,912\%$  n=8;  $p>0,99$ ) y del día 8, no significativa ( $77,33 \pm 11,257\%$  n=8;  $p=0,52$ ), comportándose de forma similar al grupo MLN+VEH. De hecho, las diferencias entre grupos se encontraron entre SAL+KA y MLN+KA el día 3 ( $p=0,05$ ) y MLN+VEH el día 8 ( $p=0,02$ ; Fig. 4.31).



**Figura 4.31. Cuantificación de la imagen  $^{18}\text{F}$ -FDG PET en el modelo de KA al día 1 y 8 tras la activación de los astrocitos con optogenética.** Las gráficas muestran diferencias significativas en el modelo de epilepsia sin tratamiento al día 3  $55,967 \pm 3,686\%$  n=5;  $p=0,02$ ) y día 8 ( $52,117 \pm 4,278\%$  n=5;  $p=0,009$ ). La activación de los astrocitos revirtió el hipometabolismo del modelo (día 3:  $93,775 \pm 9,912\%$  n=8  $p>0,99$ ; día 8  $77,33 \pm 11,257\%$  n=8  $p=0,52$ ). ANOVA de una vía de medidas repetidas, post-hoc Bonferroni. \* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$  vs MLN+VEH. # $p<0,05$  vs SAL+KA. § $p<0,05$  §§ $p<0,01$  vs medida basal.

Este efecto se puede observar en la Figura 4.32, que representa las medias de las imágenes PET (A) y su comparación con el basal a través de SPM (B).



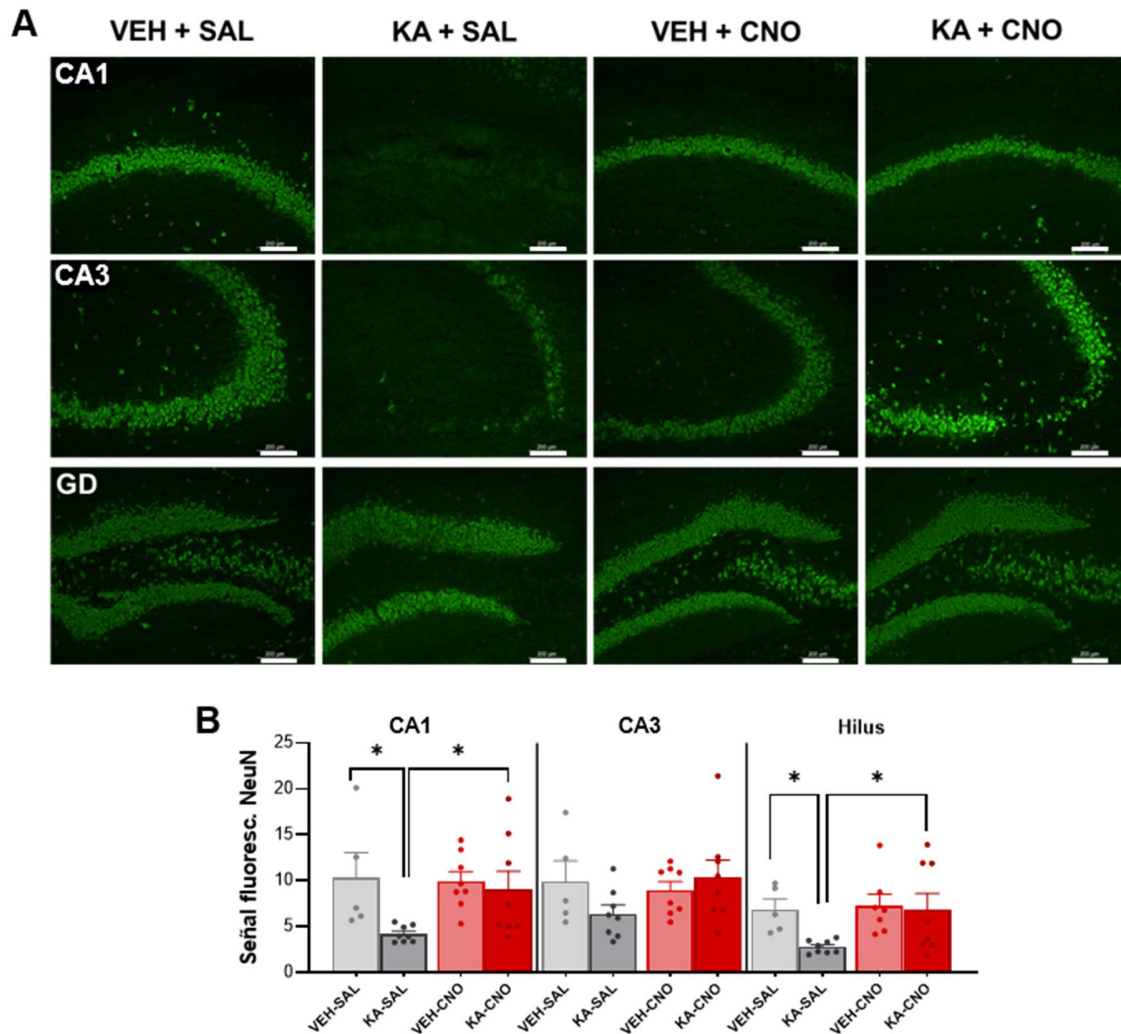
**Figura 4.32.** Efectos de la estimulación optogenética en el metabolismo cerebral. **A.** Imágenes PET promedio de los grupos experimentales en sus tres puntos temporales. **B.** Imágenes de la comparación de los puntos temporales respecto a la medida basal con SPM.

## 4.4. Efecto neuroprotector de la activación de los astrocitos en la epileptogénesis

Los resultados recopilados hasta el momento muestran que la activación de los astrocitos durante el periodo de epileptogénesis es capaz de revertir los cambios metabólicos asociados a la inyección de KA iHPC. Además, los registros de las señales de EEG mostraron una disminución de la excitabilidad tras el tratamiento con CNO a los 7 días. Esto sugiere que los astrocitos tienen un importante papel a la hora de regular los cambios celulares que ocurren en la epileptogénesis y que se asocian a las fluctuaciones del consumo de glucosa cerebral. Por otro lado, la valoración del paradigma cognitivo mostró que la activación crónica de los astrocitos preserva la memoria espacial, que se ve dañada en el modelo de epilepsia. Por ello, el último paso fue comprobar la integridad del hipocampo, realizando estudios histológicos en los experimentos presentados en el apartado 4.3.

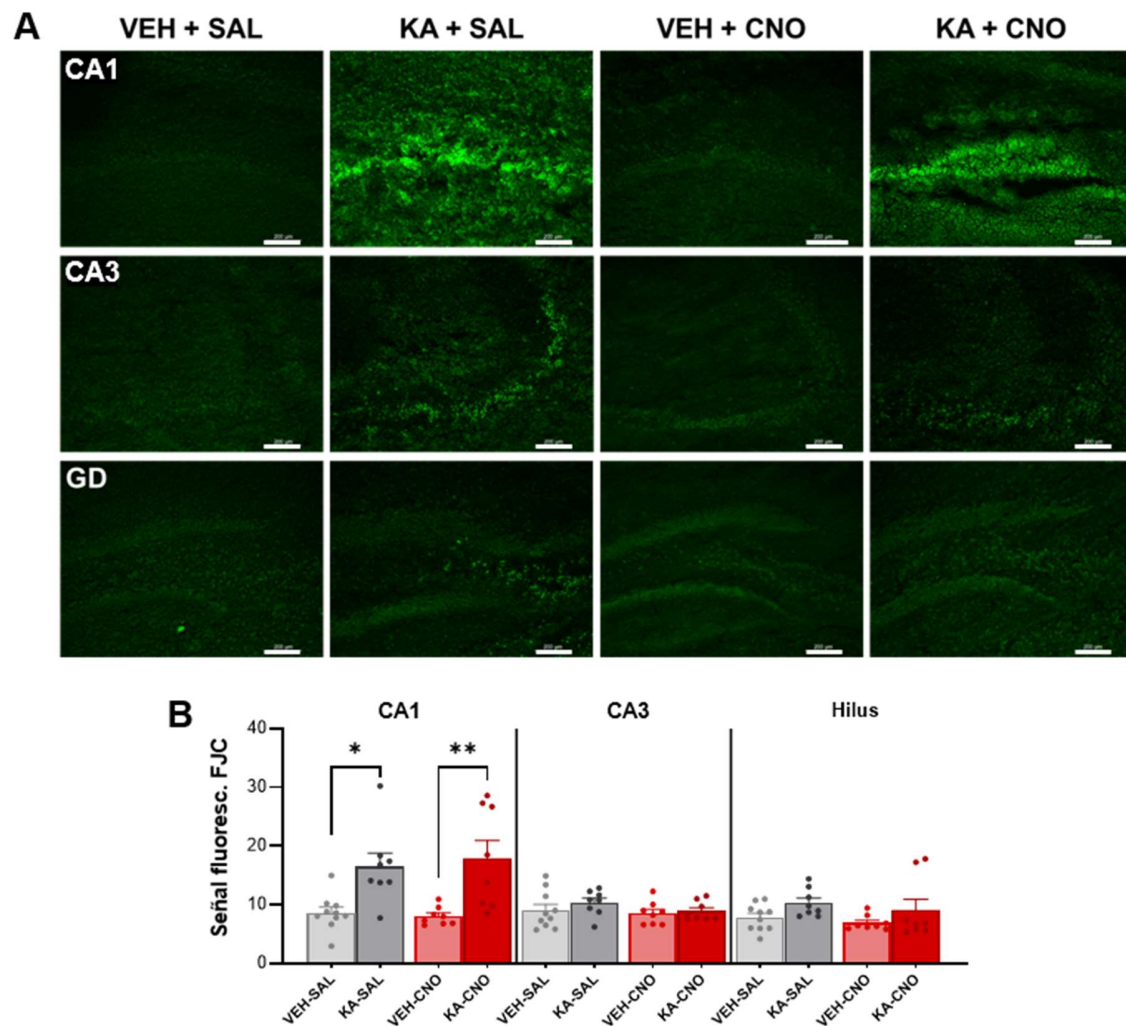
### 4.4.1. La activación de los astrocitos con quimiogenética protege de la pérdida neuronal inducida por KA a los 9 días

Los animales fueron sacrificados el día 9 para analizar los efectos del tratamiento de la activación crónica de los astrocitos en la pérdida neuronal y la astrogliosis. En la inmunohistoquímica contra NeuN, observamos pérdida neuronal en CA1 (VEH+SAL  $10,321 \pm 2,741$  n=5 vs KA+SAL  $4,211 \pm 0,318$  n=8; p=0,02) e hilus (VEH+SAL  $6,87 \pm 1,11$  n=5 vs KA+SAL  $2,79 \pm 0,246$  n=8; p=0,04) respecto a su control. Sin embargo, el tratamiento con CNO disminuyó la pérdida neuronal, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos VEH+CNO (CA1  $9,93 \pm 1,069$ ; hilus  $7,29 \pm 1,24$ ; n=8) y KA+CNO (CA1  $9,058 \pm 1,976$  p=0,68; hilus  $6,87 \pm 1,72$  n=8 p=0,81) en estas áreas. Entre KA+SAL y KA+CNO se encontraron diferencias significativas en CA1 (KA+SAL  $4,211 \pm 0,318$  n=8 vs KA+CNO  $9,058 \pm 1,976$  n=8; p=0,03) y el hilus (KA+SAL  $2,79 \pm 0,246$  n=8 vs KA+CNO  $6,87 \pm 1,72$  n=8; p=0,02; Fig. 4.33).



**Figura 4.33. Inmunofluorescencia de NeuN tras el tratamiento con quimiogenética.** **A.** Imágenes de secciones hipocámpales con inmunofluorescencia contra NeuN en CA1, CA3 GD. Barra de escala = 200  $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia contra NeuN. Las diferencias significativas se dieron para el grupo KA+SAL que tuvo mayor pérdida neuronal respecto al VEH+SAL (CA1: VEH+SAL  $10,321 \pm 2,741$   $n=5$  vs KA+SAL  $4,211 \pm 0,318$   $n=8$   $p=0,02$ ; Hilus: VEH+SAL  $6,87 \pm 1,11$   $n=5$  vs KA+SAL  $2,79 \pm 0,246$   $n=8$   $p=0,04$ ) y KA+CNO (CA1: KA+SAL  $4,211 \pm 0,318$   $n=8$  vs KA+CNO  $9,058 \pm 1,976$   $n=8$   $p=0,03$ ; Hilus: KA+SAL  $2,79 \pm 0,246$   $n=8$  vs KA+CNO  $6,87 \pm 1,72$   $n=8$   $p=0,02$ ). ANOVA de 2 vías Uncorrected Fisher's LSD. \* $p < 0,05$ .

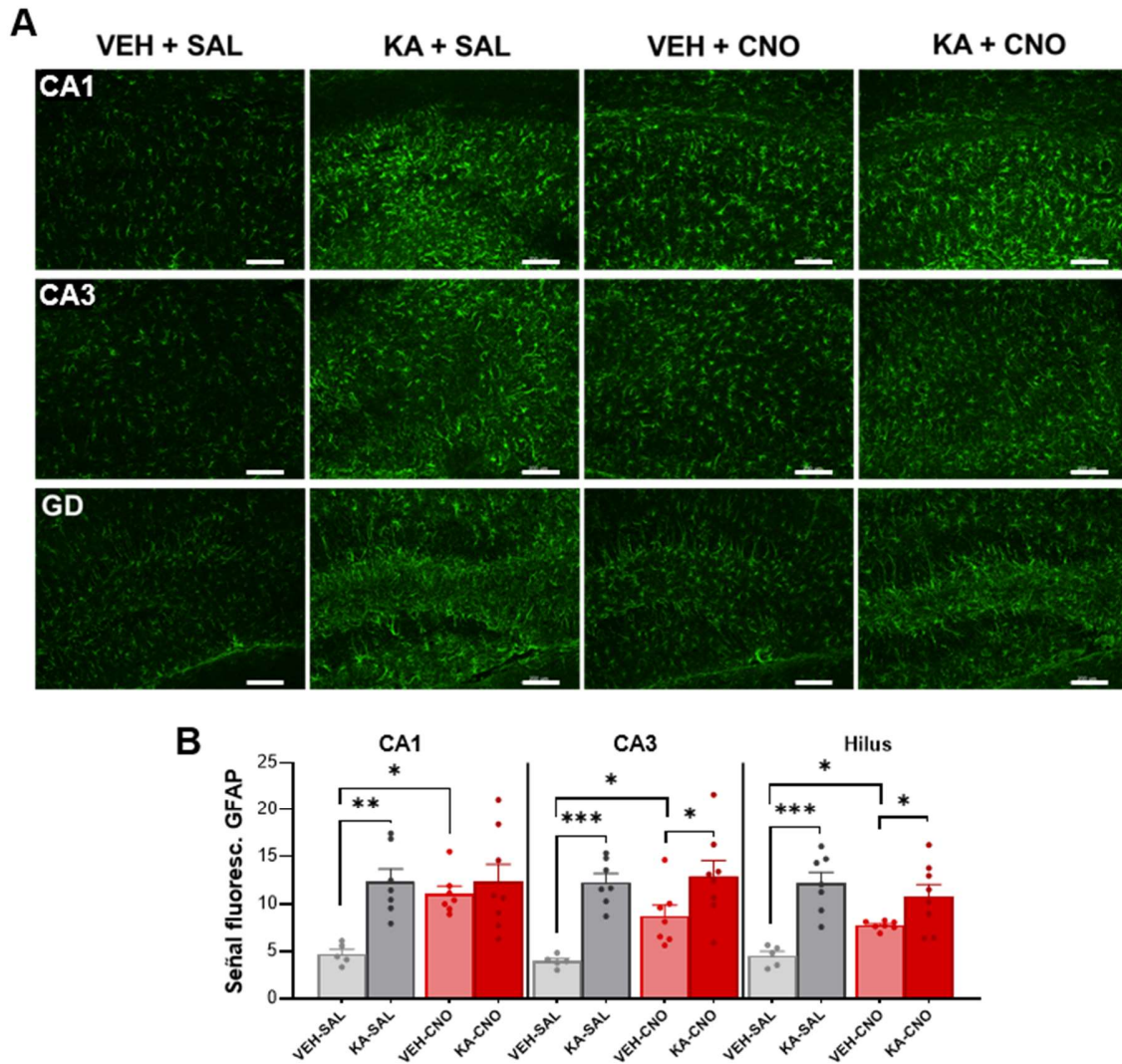
Por otro lado, se valoró el grado de neurodegeneración a través de la tinción de FJC y encontramos un efecto similar entre el grupo tratado (VEH+CNO  $8,043 \pm 0,546$   $n=8$  vs KA+CNO  $17,945 \pm 3,019$   $n=8$ ;  $p=0,005$ ) comparado con el grupo sin tratamiento (VEH+SAL  $8,62 \pm 0,95$   $n=10$  vs KA+SAL  $16,55 \pm 2,276$   $n=8$ ;  $p=0,02$ ) sólo en la región CA1 (Fig. 4.34). Junto con los resultados de NeuN, podemos inferir que los procesos de neurodegeneración que aparecen en el grupo tratados con CNO se han desarrollado de forma tardía o están limitados, puesto que la pérdida neuronal fue inferior en este grupo en comparación al grupo no tratado.



**Figura 4.34. Tinción de FJC tras el tratamiento con quimiogenética. A.** Secciones de diferentes regiones hipocámpales tras la tinción de FJC. Barra de escala = 200  $\mu$ m. **B.** La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de FJC fue significativa en la región CA1, donde ambos grupos epilépticos tuvieron un marcaje significativamente superior a su respectivo grupo control VEH+SAL  $8,62 \pm 0,95$   $n=10$  vs KA+SAL  $16,55 \pm 2,276$   $n=8$   $p=0,02$ ; VEH+CNO  $8,043 \pm 0,546$   $n=8$  vs KA+CNO  $17,945 \pm 3,019$   $n=8$   $p=0,005$ ). ANOVA de 2 vías, post-hoc Tukey. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ .

Finalmente, exploramos el grado de astrogliosis con técnicas de inmunohistoquímica contra el marcador astrocítico GFAP. En este caso, encontramos una expresión elevada del marcador en ambos grupos epilépticos (KA+SAL  $12,308 \pm 1,361$   $n=7$   $p=0,008$ ; KA+CNO  $12,336 \pm 1,85$   $n=8$   $p=0,006$ ). Sin embargo, también hubo una alta expresión de GFAP en el grupo VEH+CNO ( $11,041 \pm 0,834$   $n=7$ ) respecto al VEH+SAL ( $4,724 \pm 0,449$   $n=5$ ;  $p=0,03$ ) en todas las regiones del hipocampo. Por otro lado, la astrogliosis fue mayor en el grupo KA+CNO respecto al VEH+CNO en CA3 (VEH+CNO  $8,7 \pm 1,175$   $n=7$  vs KA+CNO  $12,912 \pm 1,639$   $n=8$ ;

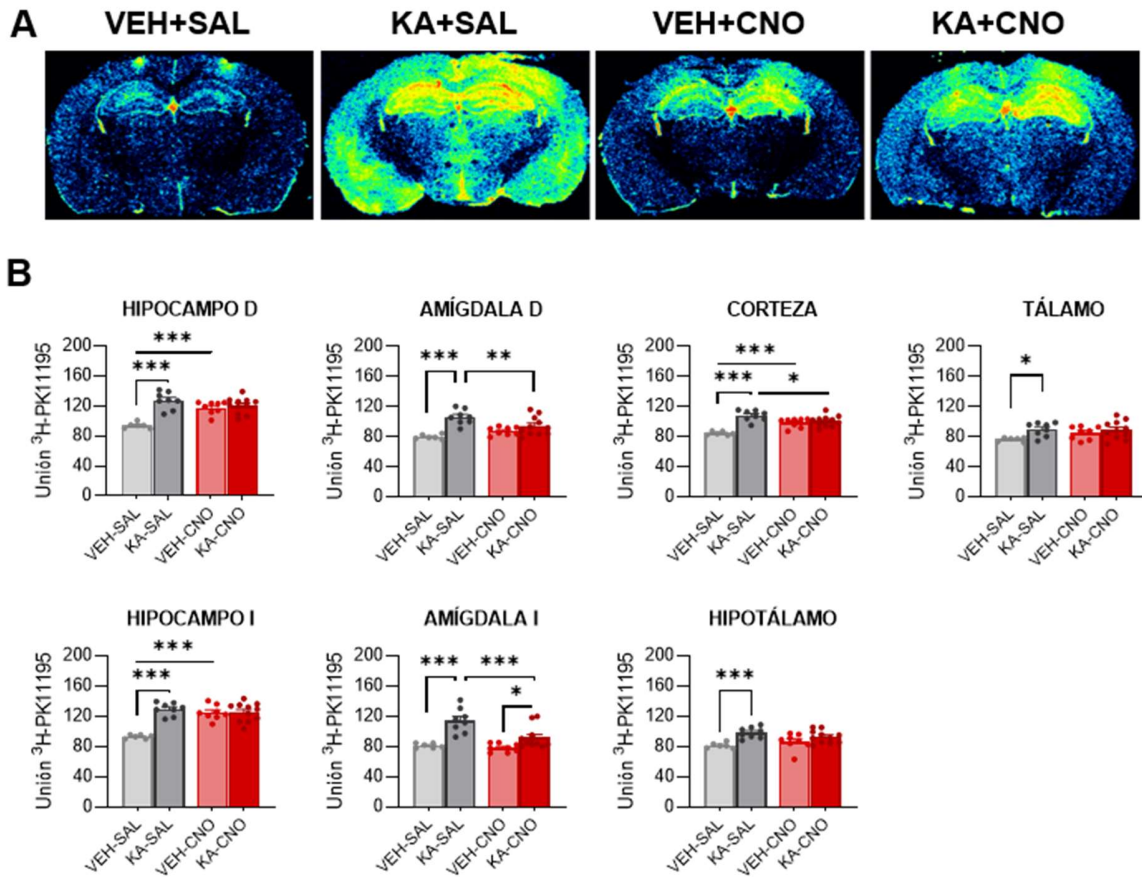
$p=0,02$ ) e hilus (VEH+CNO  $7,744\pm0,173$   $n=7$  vs KA+CNO  $10,807\pm1,239$   $n=8$ ;  $p=0,02$ ), pero igual en CA1, zona de inyección de los DREADDs (VEH+CNO  $11,041\pm0,834$   $n=7$  vs KA+CNO  $12,336\pm1,85$   $n=8$ ;  $p=0,09$ ; Fig. 4.35).



**Figura 4.35. Inmunofluorescencia contra GFAP tras el tratamiento con quimiogénica.** **A.** Secciones del hipocampo tras la inmunofluorescencia contra GFAP. La morfología y dispersión de los astrocitos presenta diferencias cuando la astrogliosis se debe a la epilepsia (KA+SAL) o al tratamiento de activación de astrocitos (VEH+CNO o KA+CNO). Barra de escala = 200  $\mu\text{m}$ . **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia GFAP. Respecto al control VEH+SAL ( $4,724\pm0,449$   $n=5$ ) se encontraron diferencias significativas en ambos grupos epilépticos (KA+SAL  $12,308\pm1,361$   $n=7$   $p=0,008$ ; KA+CNO  $12,336\pm1,85$   $n=8$   $p=0,006$ ) como en el grupo control tratado con quimiogénica VEH+CNO ( $11,041\pm0,834$   $n=7$ ;  $p=0,03$ ). ANOVA de 2 vías, post-hoc Tukey. \* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ .

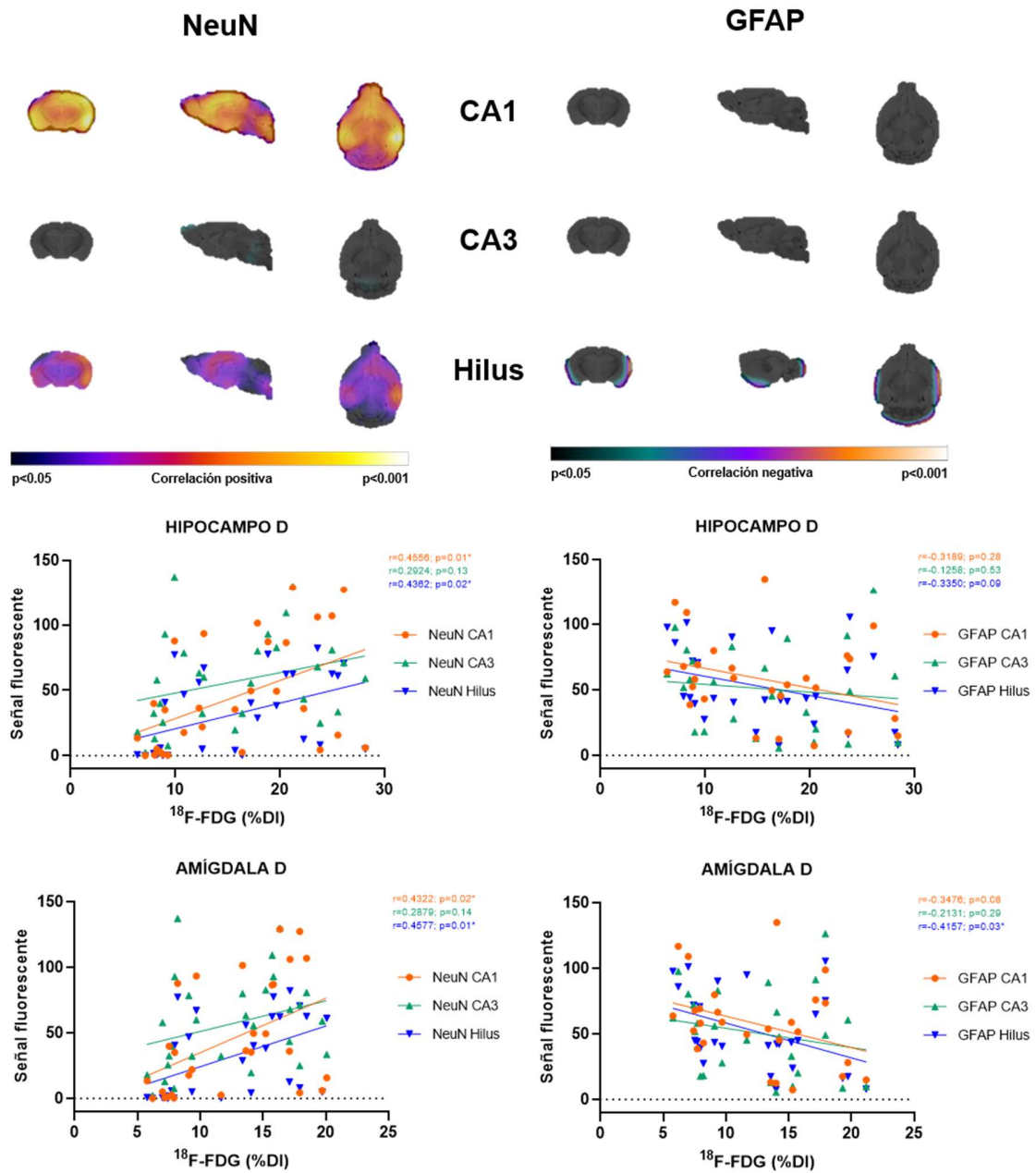
Si observamos la morfología de los astrocitos en la Figura 4.35 podemos ver dos patrones diferentes: en el grupo KA+SAL los astrocitos tienen los procesos más marcados y se expresan por toda la región, mientras que en los grupos KA+CNO y VEH+CNO, aunque la señal sea más intensa, los astrocitos están más dispersos. Nuestra hipótesis sugiere que el tratamiento crónico con CNO provoca una activación de los astrocitos, pero se diferencia cualitativamente de una astrogliosis producida por el modelo de epilepsia. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos de HR-MAS tras la inyección de CNO, en los que se vieron altos niveles de mioinositol, lo que se asocia con procesos inflamatorios derivados de astrogliosis.

Además, empleando técnicas de autorradiografía que permite exponer los cortes de tejido cerebral al radiotrazador  $^3\text{H}$ -PK11195 para marcar la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) localizada en las células gliales, pudimos caracterizar y cuantificar la magnitud de la neuroinflamación. La autorradiografía reveló un marcaje extendido por diferentes áreas cerebrales en el grupo KA+SAL ( $127,475 \pm 4,043$   $n=8$ ), que fue significativo respecto a su grupo control (VEH+SAL  $94,088 \pm 1,587$   $n=6$ ,  $p < 0,001$ ). Los grupos VEH+CNO ( $117,836 \pm 2,956$   $n=8$ ) y KA+CNO ( $120,638 \pm 3,304$   $n=11$ ) sólo mostraron niveles elevados respecto al control VEH+SAL en ambos hipocampos ( $p < 0,001$ ), pero no hubo diferencias entre ellos ( $p = 0,92$ ), al igual que ocurría en la inmunohistoquímica contra GFAP. Esto refuerza la idea de que la activación de los astrocitos con DREADDs provoca una activación de células neuroinflamatorias. Curiosamente, los grupos tratados tenían la neuroinflamación restringida al área hipocámpal, ya que no se encontraron diferencias significativas en otras regiones respecto al VEH+SAL. Esto indicaría que la activación de los astrocitos previene que los procesos neuroinflamatorios se expandan a otras áreas cerebrales, como ocurre en el grupo KA+SAL (Fig. 4.36).



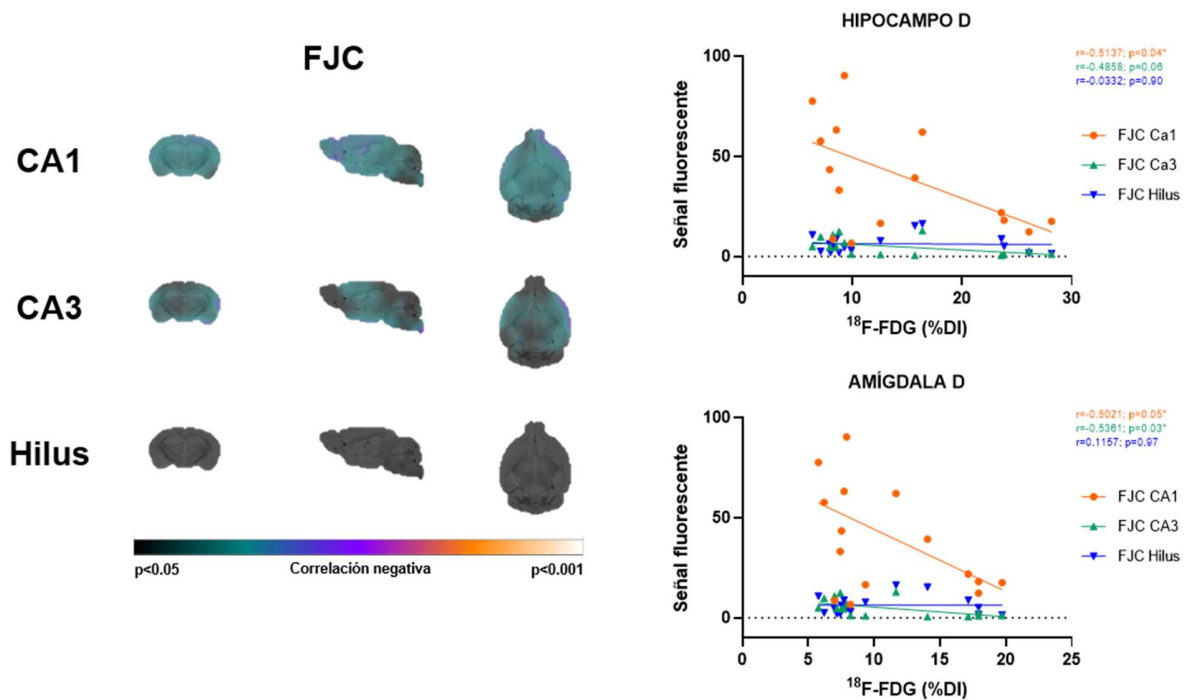
**Figura 4.36. Autorradiografía contra TSPO (neuroinflamación) tras 7 días de tratamiento con quimiogénica. A.** Muestra de la captación del radiotrazador en corte coronal del hipocampo dorsal. **B.** La cuantificación de la captación del radiotrazador muestra diferencias significativas entre el grupo VEH+SAL y el grupo KA+SAL (VEH+SAL  $94,088 \pm 1,587$   $n=6$  vs KA SAL  $127,475 \pm 4,043$   $n=8$ ;  $p < 0,001$ ). Los grupos tratados con CNO apenas muestran diferencias (VEH+CNO  $117,836 \pm 2,956$   $n=8$  vs KA+CNO  $120,638 \pm 3,304$   $n=11$   $p=0,92$ ). ANOVA de 2 vías, post-hoc Tukey. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

Finalmente, comprobamos las correlaciones entre los estudios histológicos y la imagen PET. Cuando estudiamos la correlación en todos los grupos, se encontraron correlaciones positivas de NeuN en CA1 e hilus con la imagen PET en SPM, y se confirmó en regresión lineal en los ROIs del hipocampo (CA1  $n=34$   $r=0,4556$ ,  $p=0,01$ ; hilus  $r=0,4362$ ,  $p=0,02$ ) y la amígdala ipsilateral (CA1  $n=34$   $r=0,4322$ ,  $p=0,02$ ; hilus  $r=0,4577$ ,  $p=0,01$ ). Por otro lado, apareció una correlación negativa entre la astrogliosis en el hilus y el PET, únicamente en la amígdala ipsilateral ( $n=34$   $r=0,4157$   $p=0,03$ ; Fig. 4.37). Esto replica los resultados de los animales a los que se indujo un SE y fueron tratados con DZP, en los que una mayor astrogliosis se asoció con menor captación de glucosa en la amígdala ipsilateral en el PET del día 8.



**Figura 4.37. Correlaciones entre el metabolismo cerebral y la inmunofluorescencia tras el tratamiento con quimiogenética.** Arriba, imágenes de SPM representando las regiones con correlaciones significativas en NeuN (positivas) y GFAP (negativas). Abajo, cálculo de la regresión lineal entre el ROI de captación del PET y la cuantificación en inmunofluorescencia.

Cuando analizamos sólo las correlaciones entre los grupos con epilepsia, para valorar el efecto del tratamiento, se observó una correlación negativa entre la neurodegeneración y el metabolismo en CA1 ( $n=16$   $r=-0,5137$   $p=0,04$ ) en hipocampo también en y CA3 ( $n=16$   $r=-0,5361$   $p=0,03$ ) en la amígdala (Fig. 4.38).

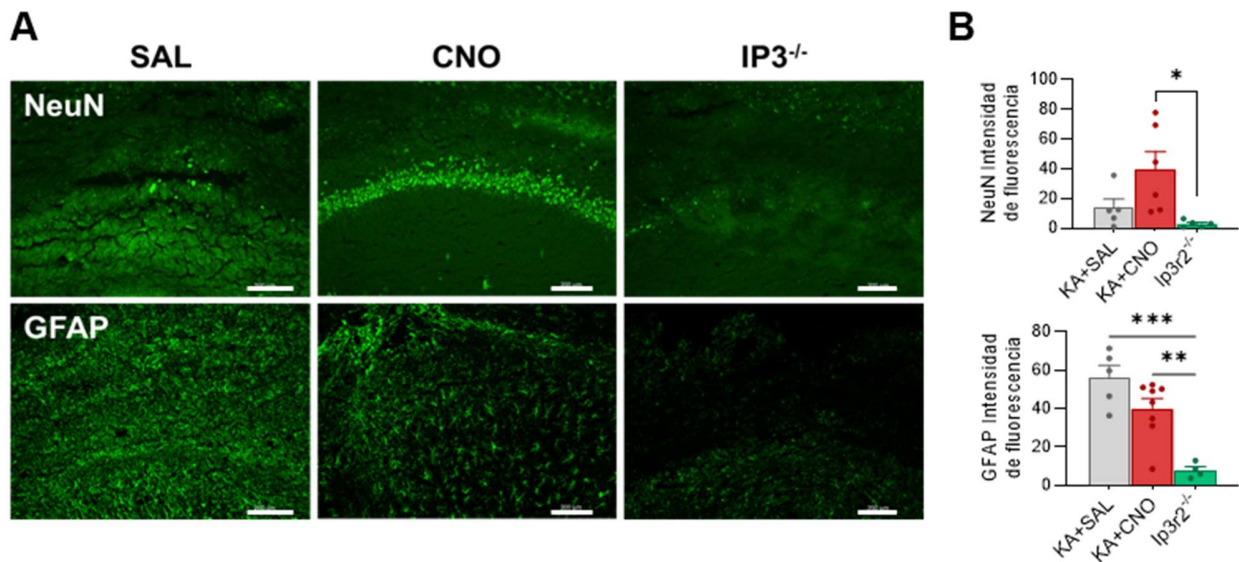


**Figura 4.38. Correlación de la imagen PET e inmunofluorescencia entre los grupos con epilepsia tras la activación de astrocitos con quimiogenética.** A la izquierda, representación de SPM de correlación entre la imagen PET y la intensidad de FJC en CA1 y CA3. A la derecha, la gráfica de la regresión lineal entre la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG del hipocampo y amígdala ipsilateral y la inmunofluorescencia, coincidiendo con la imagen de SPM.

Analizados en su conjunto, estos datos indican que una activación crónica de los astrocitos en la ventana epileptógena puede revertir los cambios metabólicos asociados al modelo de epilepsia, disminuyendo la muerte neuronal de la región hipocampal, aunque existieran procesos de neurodegeneración en CA1. Por otro lado, la activación crónica de los astrocitos es capaz de provocar un aumento de la astrogliosis en el hipocampo, y neuroinflamación incluso fuera del foco epiléptico. Por lo tanto, es factible que la astrogliosis y la neuroinflamación presentes en el grupo KA+CNO derive de la propia activación de los astrocitos y no de la epilepsia *per se*.

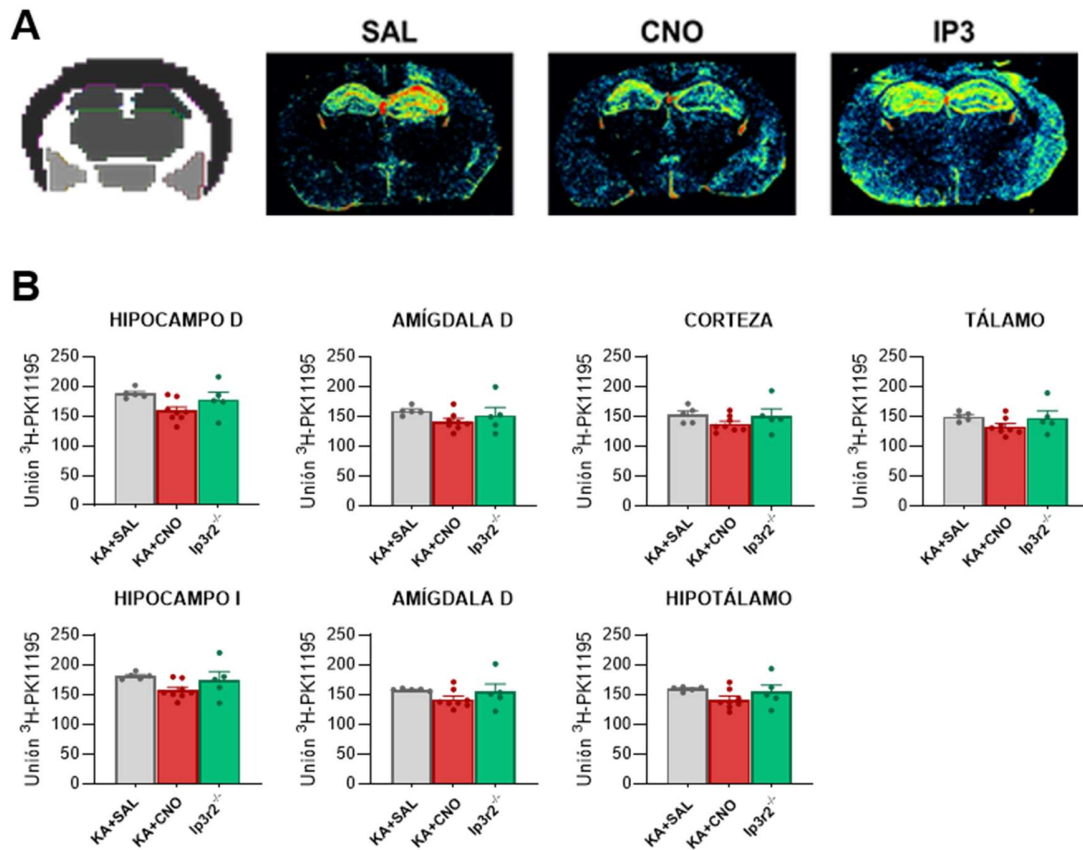
#### 4.4.2. La activación de los astrocitos con quimiogenética protege de la pérdida neuronal inducida por KA a los 29 días

En línea con los datos presentados, se realizaron estudios inmunohistoquímicos en animales  $Ip3r2^{-/-}$  en los que se generó SE inyectando KA iHPC y se sacrificaron el día 29. La intensidad de NeuN fue mayor en el grupo KA+CNO ( $39,8 \pm 11,9$   $n=6$ ) respecto al grupo KA+SAL ( $13,8 \pm 5,85$   $n=5$ ;  $p=0,11$ ) y significativamente mayor respecto al grupo  $Ip3r2^{-/-}$  ( $3,12 \pm 1,02$   $n=5$ ;  $p=0,02$ ) en CA1. Esto indica que el papel protector contra la pérdida neuronal que ejerce la activación de los astrocitos durante la epileptogénesis se mantiene en el tiempo y que la movilización de calcio a través de receptores  $Ip3r2$  es fundamental. En cuanto a la astrogliosis, el ratón  $Ip3r2^{-/-}$  ( $7,86 \pm 1,97$   $n=4$ ) tuvo una disminución significativa ( $p < 0,01$ ) respecto a los otros grupos (SAL  $56 \pm 6,44$   $n=5$   $p < 0,001$ ; CNO  $40,1 \pm 5,29$   $n=8$   $p=0,004$ , Fig. 4.39). El grupo KA+SAL presentaba la astrogliosis propia del modelo y la distribución de los astrocitos en el grupo KA+CNO fue bastante similar a la encontrada en los cerebros del día 9, por lo que no descartamos que la astrogliosis que provoca la activación de los astrocitos tenga efectos permanentes.



**Figura 4.39. Inmunofluorescencia contra NeuN y GFAP tras el tratamiento con quimiogenética al día 29 post SE. A.** Secciones del hipocampo tras la inmunofluorescencia contra NeuN y GFAP. Barra de escala = 200  $\mu$ m. **B.** La cuantificación de la intensidad de fluorescencia NeuN mostró mayor supervivencia neuronal en el día 29 post SE tras el tratamiento con CNO (KA+CNO  $39,8 \pm 11,9$   $n=6$  vs KA+SAL  $13,8 \pm 5,85$   $n=5$ ;  $p=0,11$ ; vs  $Ip3$   $3,12 \pm 1,02$   $n=5$ ;  $p=0,02$ ). La cuantificación de GFAP reveló menor intensidad en el ratón  $Ip3r2^{-/-}$  ( $7,86 \pm 1,97$   $n=4$ ) respecto a los otros grupos (KA+SAL y KA+CNO SAL  $56 \pm 6,44$   $n=5$   $p < 0,001$ ; CNO  $40,1 \pm 5,29$   $n=8$   $p=0,004$ ). ANOVA de 1 vía, post-hoc Tukey. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

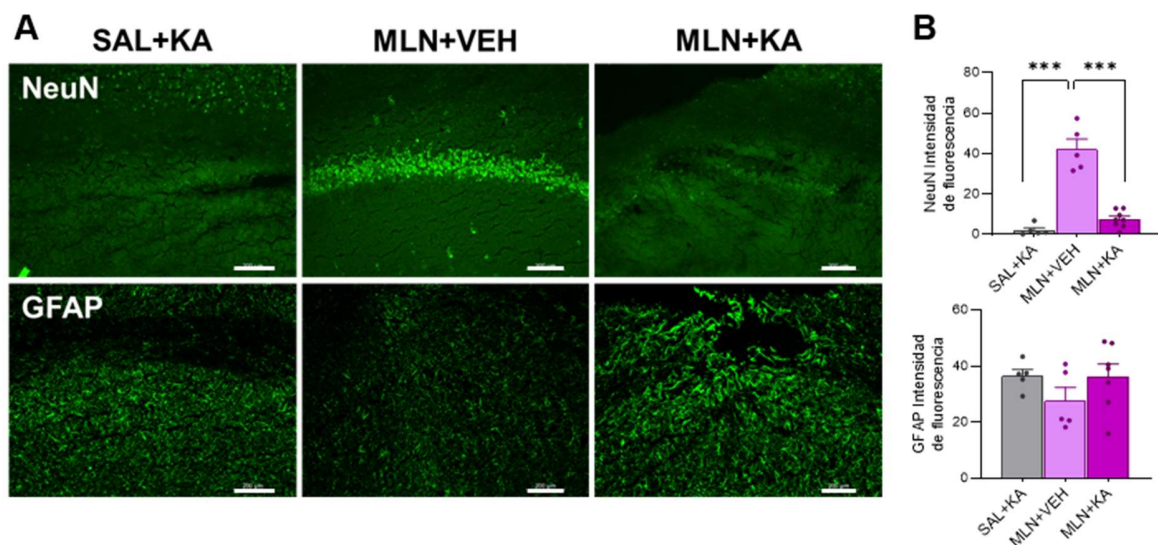
Conjuntamente, realizamos un estudio de la neuroinflamación a través de la autorradiografía y comprobamos que todos los grupos contaban con niveles similares de captación de  $^3\text{H}$ -PK11195 (KA+SAL  $188 \pm 3,74$   $n=5$ ; vs KA+CNO  $159 \pm 6,46$   $n=8$   $p=0,06$ ; vs  $\text{Ip}3\text{r}2^{-/-}$   $178 \pm 12,5$   $n=5$   $p=0,43$ ). Esto indica que los niveles de neuroinflamación a los 29 días fueron relativamente similares tras el tratamiento con CNO (Fig. 4.40).



**Figura 4.40. Autorradiografía de  $^3\text{H}$ -PK11195 el día 29 post SE. A.** VOIs analizadas y muestra de la captación del radiotrazador en corte coronal del hipocampo dorsal. **B.** La cuantificación de la captación del radiotrazador no mostró diferencias significativas entre los grupos. ANOVA de 1 vía, post-hoc Tukey.

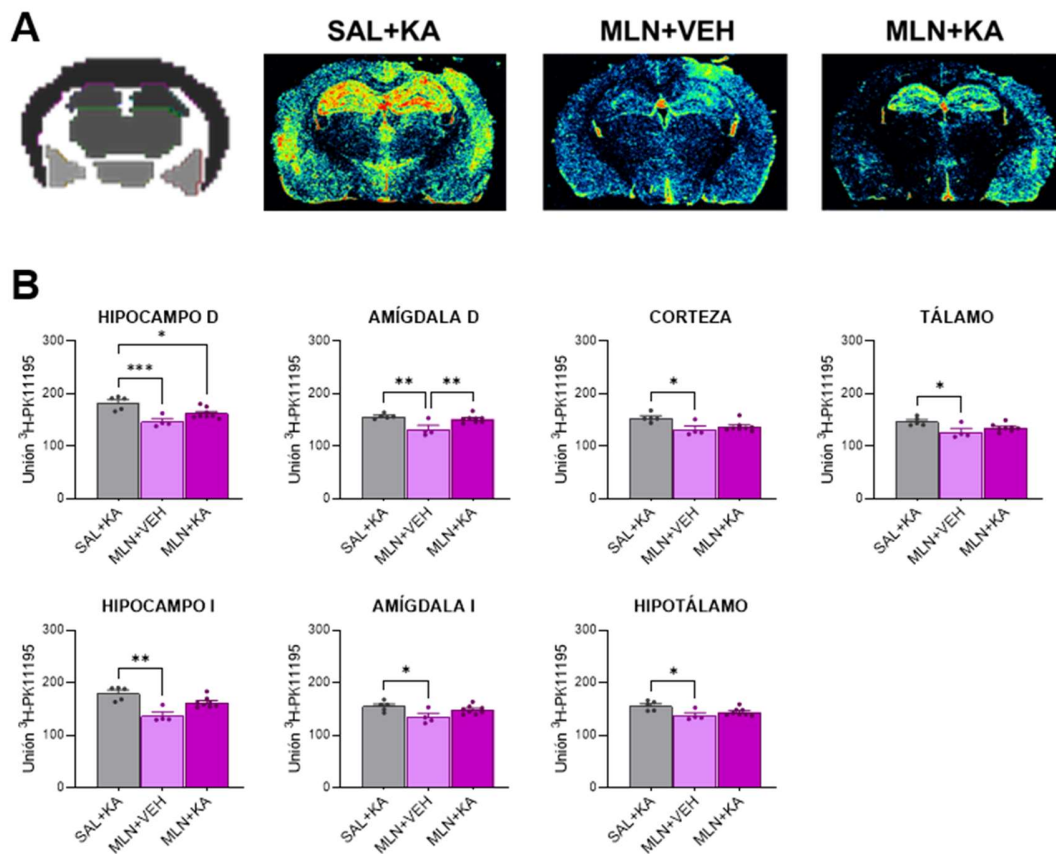
#### 4.4.3. La activación de los astrocitos con optogenética protege de la pérdida neuronal inducida por KA a los 9 días

Por último, repetimos estos estudios en animales inyectados con MLN y encontramos que la estimulación optogenética en animales tratados con KA no consiguió prevenir la pérdida neuronal, a diferencia de los experimentos con quimiogénica. El grupo no epiléptico, MLN+VEH ( $42,2 \pm 4,94$   $n=5$ ), presentó una intensidad de NeuN que fue significativamente mayor en comparación con los dos grupos epilépticos (SAL+KA  $2,17 \pm 1,19$   $n=5$   $p<0,001$ ; MLN+KA  $7,55 \pm 1,48$   $n=8$ ;  $p<0,001$ ). Del mismo modo, la astrogliosis estuvo presente en todos los grupos (SAL+KA  $36,6 \pm 2,27$   $n=5$   $p=0,36$ ; MLN+KA  $36,3 \pm 4,43$   $n=7$   $p=0,33$ ) siendo menor en el grupo MLN+VEH ( $27,7 \pm 4,76$   $n=5$ ). Sin embargo, atendiendo a la morfología de los astrocitos para diferenciar la astrogliosis derivada de la epilepsia de la causada por la activación del astrocito, como ya habíamos hecho en experimentos anteriores, la disposición e intensidad del marcaje del grupo MLN+KA fue similar al grupo SAL+KA (Fig. 4.41).



**Figura 4.41. Inmunofluorescencia tras el tratamiento de optogenética al día 7 post SE.** A. Secciones de inmunofluorescencia contra NeuN y GFAP. Barra de escala = 200  $\mu$ m. B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo sin epilepsia y los epilépticos en NeuN (MLN+VEH  $42,2 \pm 4,94$   $n=5$ ; vs SAL+KA  $2,17 \pm 1,19$   $n=5$   $p<0,001$ ; vs MLN+KA  $7,55 \pm 1,48$   $n=8$ ;  $p<0,001$ ), pero no hubo diferencias significativas en GFAP (MLN+VEH  $27,7 \pm 4,76$   $n=5$ ; vs SAL+KA  $36,6 \pm 2,27$   $n=5$   $p=0,36$ ; vs MLN+KA  $36,3 \pm 4,43$   $n=7$   $p=0,33$ ). ANOVA de 1 vía, posthoc Tukey. \*\*\* $p<0,001$ .

Cuando exploramos la neuroinflamación de este modelo con autorradiografías de  $^3\text{H}$ -PK11195, los grupos SAL+KA ( $183\pm 5,83$   $n=5$ ) y MLN+KA ( $162\pm 3,62$   $n=8$ ) se diferenciaron sólo en el hipocampo ipsilateral ( $p=0,02$ ). En el resto de estructuras, los animales con MLN+KA presentaron niveles de neuroinflamación elevados que no fueron significativamente diferentes de los otros grupos, a excepción de la amígdala ipsilateral ( $152\pm 2,63$   $n=8$ ) donde fue mayor ( $p=0,008$ ) que el grupo MLN+VEH ( $133\pm 7,72$   $n=4$ ). Sin embargo, el grupo SAL+KA tuvo una unión significativamente mayor en todas las estructuras respecto al grupo no epiléptico tratado con optogenética (SAL KA  $183\pm 5,83$   $n=5$  vs MLN+VEH  $147\pm 5,42$   $n=4$ ;  $p<0,001$ ; Fig. 4.42).



**Figura 4.42. Autorradiografía de  $^3\text{H}$ -PK11195 tras el tratamiento con optogenética.** **A.** VOIs analizadas y muestra representativa de la captación del radiotrazador en corte coronal del hipocampo dorsal. **B.** La cuantificación de la captación del radiotrazador mostró diferencias significativas entre los grupos MLN+VEH y SAL+KA ( $147\pm 5,42$   $n=4$  vs  $183\pm 5,83$   $n=5$   $p<0,001$ ) en varias regiones cerebrales, mientras que las diferencias con MLN+KA se redujeron al hipocampo ( $162\pm 3,62$   $n=8$   $p=0,02$ ) y amígdala ipsilateral ( $152\pm 2,63$   $n=8$   $p=0,008$ ). ANOVA de 1 vía, post-hoc Tukey \* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,001$ .

Finalmente, realizamos las correlaciones entre la inmunohistoquímica de los experimentos de optogenética y el metabolismo cerebral. Cuando tomamos todos los grupos en la regresión lineal, no se encontraron correlaciones significativas con NeuN ( $r=0,2969$   $n=18$   $p=0,23$ ) o GFAP ( $r=-0,4675$   $n=17$   $p=0,06$ ). Tomando sólo los grupos tratados con KA se observó una correlación negativa entre GFAP y el metabolismo cerebral del hipocampo ( $r=-0,06675$   $n=12$   $p=0,02$ ) y la amígdala ipsilateral ( $r=-0,7295$   $n=23$   $p=0,007$ ; Fig. 4.43). De nuevo, se manifestó la relación entre la activación de los astrocitos y el metabolismo cerebral.

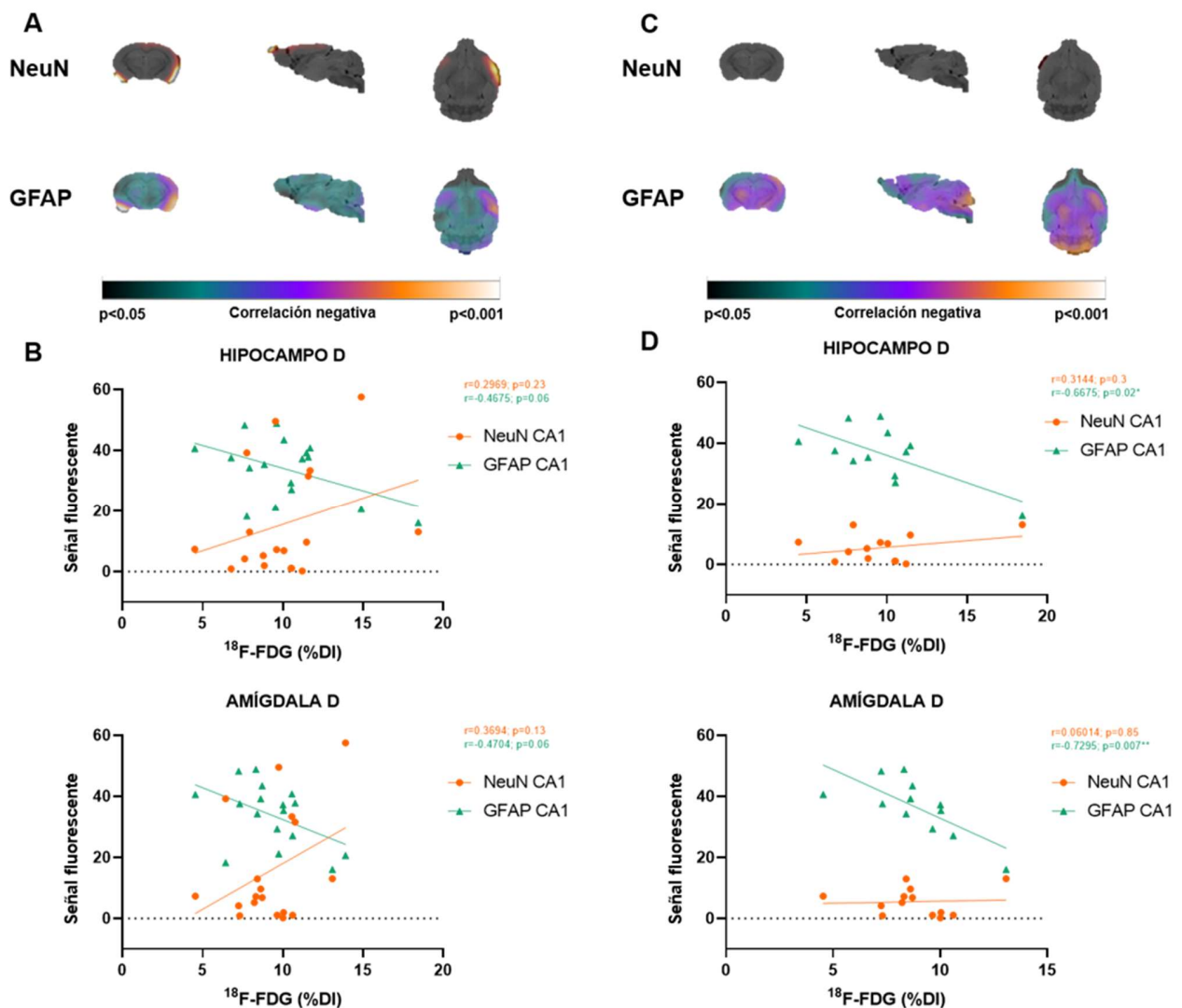
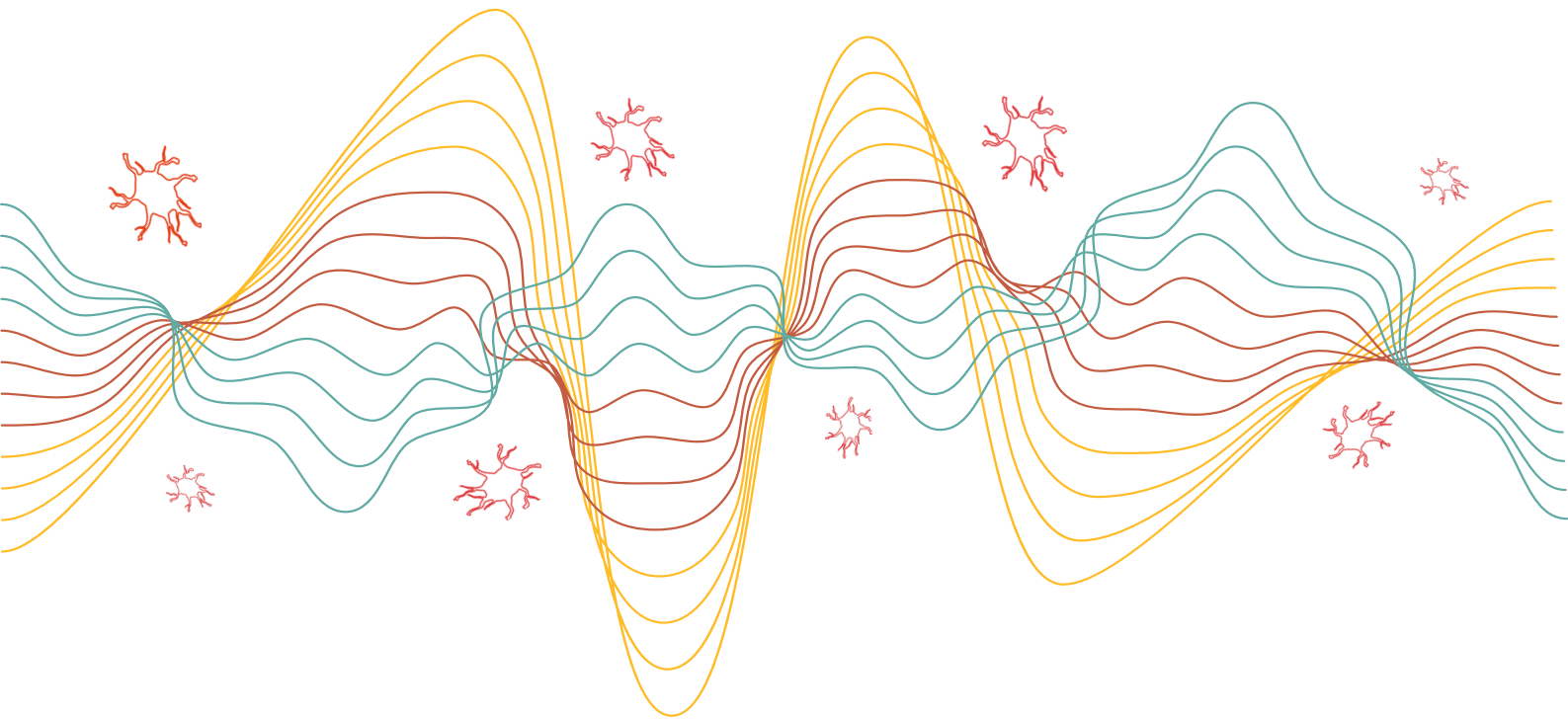


Figura 4.43. Correlaciones entre el metabolismo cerebral y la inmunofluorescencia tras el tratamiento con optogenética. A-B. Correlación de todos los grupos con SPM (A) o regresión lineal de los ROIs (B). C-D. Correlación los grupos epilépticos con SPM (C) o regresión lineal de los ROIs (D), donde se mostró una correlación negativa de GFAP con el metabolismo cerebral ( $r=-0,06675$   $n=12$   $p=0,02$ ). \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ .

Los resultados de estos experimentos relacionados con la imagen PET confirman que la activación de los astrocitos, independientemente de la técnica que se use, es suficiente para revertir el hipometabolismo asociado al SE. Además, la optogenética provoca cambios en el astrocito de forma similar a la quimiogenética, ya que podemos observar un aumento en la intensidad de GFAP en el grupo no epiléptico tratado con la estimulación de luz. Sin embargo, a diferencia de los experimentos anteriores, la estimulación optogenética unilateral no fue capaz de evitar la muerte neuronal en la zona de inyección. Cuando valoramos la neuroinflamación del grupo epiléptico tratado, observamos niveles similares a los otros dos grupos, pero en el hipocampo ipsilateral fue significativamente inferior al grupo SAL+KA y en la amígdala ipsilateral, significativamente superior al grupo MLN+VEH.

- CAPÍTULO 5 -  
**DISCUSIÓN**





# 5. DISCUSIÓN

---

## 5.1. El efecto de la activación de los astrocitos en el metabolismo cerebral

Los resultados obtenidos en el trabajo presentado demuestran que la activación de los astrocitos en el hipocampo se traduce en un incremento del metabolismo cerebral de la glucosa en esta estructura, pero también en otras zonas adyacentes. Los estudios dinámicos de imagen PET en ratones WT mostraron que la inyección de CNO durante la captación de la  $^{18}\text{F}$ -FDG modificó la incorporación del radiotrazador, tal como lo revela el incremento en la constante  $k_i$ , un indicador de la entrada total del radiotrazador a través de los compartimentos. Estos resultados fueron consistentes en distintas cepas de ratones, lo que refuerza la generalización de este fenómeno. Además, se observó un aumento de la constante  $k_3$  que modeliza la fosforilación de la  $^{18}\text{F}$ -FDG dentro de las células. Esto sugeriría que el incremento de  $k_i$  se debe a mecanismos celulares que provocan cambios metabólicos dentro de las células, y no se relaciona con cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. En base a esto, hemos considerado la constante  $k_i$  como indicador de cambios en la incorporación de  $^{18}\text{F}$ -FDG como un índice robusto para valorar la captación del radiotrazador en el modelo matemático de 2TC.

La activación de DREADDs con CNO ha sido motivo de controversia, ya que algunos estudios proponen que el CNO no atraviesa la barrera hematoencefálica y que, para hacerlo, debía metabolizarse antes a CZP (Gómez, et al., 2017; Ji et al., 2016). Estos estudios mostraron que la CZP era capaz de atravesar la BHE (Gómez, et al., 2017; Manwich, et al., 2018), pero además también tenía una mayor afinidad por los receptores DREADDs (Hu et al., 2021; Ji et al., 2016)

en comparación con el CNO. Por otro lado, se cuestionó que el CNO fuera un fármaco inerte que sólo actúa en los DREADDs (Mabler and Aston-Jones, 2018) y, por otro lado, se describieron efectos locomotores asociados al tratamiento con CNO (MacLaren, et al., 2016). Sin embargo, en su mayoría, estos estudios están realizados en ratas como animal de experimentación sin tener en consideración la diferente farmacocinética entre especies. De hecho, en ratones se ha comprobado que el CNO es capaz de atravesar la BHE y activar los DREADDs de forma eficiente (Jendryka et al., 2019). Nuestros hallazgos indican que el CNO provoca un incremento de flujo de la  $^{18}\text{F}$ -FDG en diferentes cepas de ratones, cuantificado por la constante  $k_i$ , en comparación con su control, mientras que la administración de CZP no mostró diferencias significativas, confirmando la eficacia del CNO para activar los DREADDs en nuestro modelo experimental.

Aunque la información que nos aportaron los estudios dinámicos fue muy relevante, debemos considerar que la inyección de CNO y la adquisición de la imagen requerían que los animales se encontraran bajo anestesia, ya que el animal debe encontrarse dentro del escáner poco antes de la inyección de  $^{18}\text{F}$ -FDG. Esto es importante, ya que los experimentos de quimiogenética normalmente se realizan en animales despiertos, en una condición en la que las áreas cerebrales presentan diferentes estados de activación que pueden generar diferencias en la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en el animal anestesiado. Esto, junto con el hecho de que ya de por sí la propia anestesia puede generar variabilidad en los niveles de glucosa y la captación de radiotrazador en comparación con un animal despierto (Park et al., 2017; Spangler-bickell et al., 2016; Toyama et al., 2004), decidimos comprobar el efecto del CNO con estudios estáticos, en los que el animal incorpora la  $^{18}\text{F}$ -FDG despierto y se realiza el estudio de imagen 45 minutos después de la inyección del radiotrazador. Los estudios estáticos confirmaron el aumento de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en los hipocampos tras la inyección de CNO, pero, además, mostraron que este hipermetabolismo ocurría en otras áreas cerebrales como el tálamo y el mesencéfalo. Dado que los estudios *post mortem* ratificaron que los virus estaban localizados únicamente en los astrocitos del hipocampo, es factible que la activación de una subpoblación de astrocitos pudiera modificar el metabolismo de otras regiones del cerebro, provocando cambios a través de redes neuronales específicas.

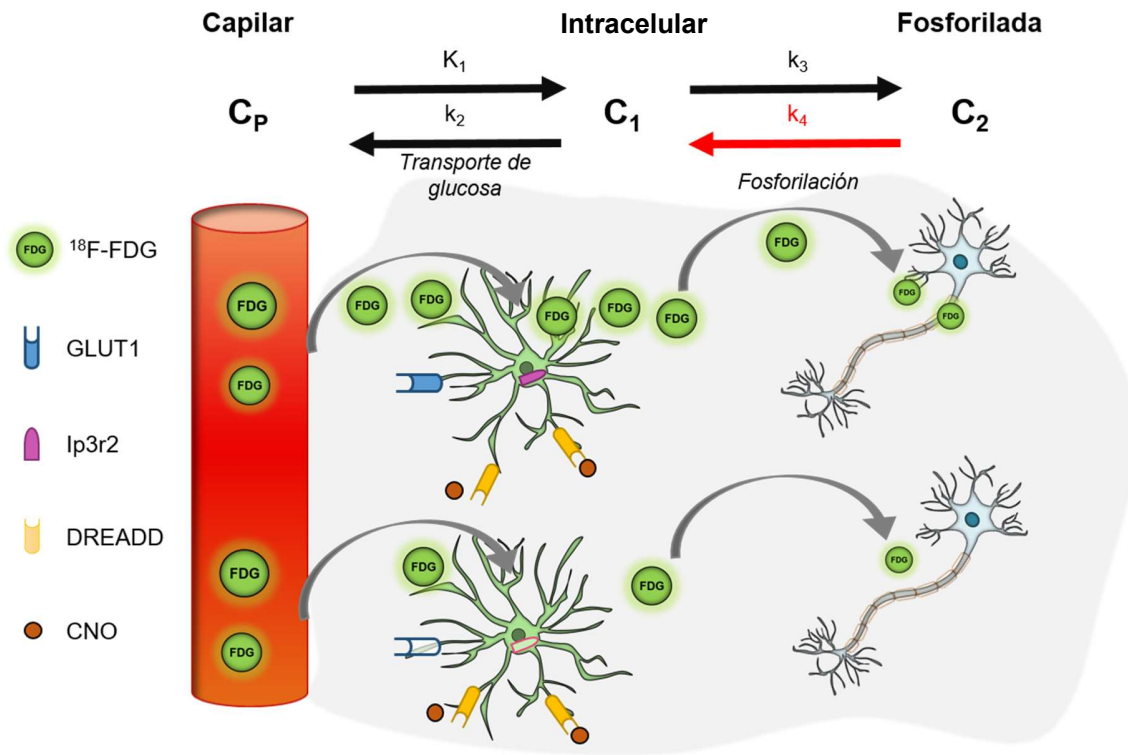
Sólidas evidencias experimentales demuestran que los astrocitos participan en la transmisión sináptica respondiendo a los neurotransmisores liberados desde las terminales presinápticas (Araque, et al., 1999; Araque, et al., 2001; Haydon and Carmignoto, 2006; Navarrete, et al., 2013). Esto incrementa el calcio intracelular en los astrocitos provocando la liberación de gliotransmisores que actúan en las membranas neuronales activando receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato y adenosina (A1 y A2a) modificando la respuesta neuronal (Jabs, et al., 2008). Además, se sabe que la activación de los astrocitos a través de DREADDs *ex vivo* provoca un aumento de la señalización de calcio (Durkee et al., 2019), por lo que estudiamos su papel en los efectos metabólicos que observamos en el PET tras la activación de los DREADDs. Para ello, utilizamos el ratón  $Ip3r2^{-/-}$  (Li, et al., 2005) el que se ha modificado genéticamente para no expresar el receptor  $Ip3$  asociado a proteína G que media en la liberación de calcio en el retículo endoplasmático (Corkrum, et al., 2020; Martin-Fernandez, et al., 2017; Petracic, et al., 2008). Los estudios dinámicos en este ratón no mostraron cambios en la cinética de la  $^{18}F$ -FDG y tampoco se encontraron diferencias en la captación de  $^{18}F$ -FDG tras la administración de CNO en los estudios estáticos en el hipocampo u otras estructuras. Estos resultados sugieren que los efectos metabólicos provocados por la activación de DREADDs en astrocitos dependen de la movilización de calcio mediada por  $Ip3r2$ .

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la quimiogenética replica la activación de diferentes tipos de GPCRs endógenos y los DREADDs pueden expresarse en el soma y los procesos de los astrocitos (Chai et al., 2017; Corkrum et al., 2019). Esto puede causar una gran variabilidad de respuestas si consideramos que pueden activar diferentes tipos de señales de calcio e, incluso, afectar a otras poblaciones de astrocitos (Shen, et al., 2021). De hecho, una de las mayores limitaciones de la  $^{18}F$ -FDG PET es que su especificidad y resolución espacial impiden que pueda indicar el tipo celular implicado en la captación del radiotrazador, es decir, no podemos asegurar que la  $^{18}F$ -FDG es captada mayormente por astrocitos o por neuronas. Por ello, no podríamos asegurar que el efecto metabólico que provoca el aumento de la señal de calcio tras la activación de los DREADDs se limite a los propios astrocitos o a su efecto sobre otros tipos celulares. Una hipótesis podría ser que el aumento de la captación de  $^{18}F$ -FDG se debe a mecanismos compensatorios para suplir su propio consumo de glucosa, siendo los propios astrocitos los que consumen la  $^{18}F$ -FDG y no las neuronas (Li, et al., 2023).

Para corroborar esta hipótesis, utilizamos ratones en los que se suprimió específicamente el GLUT1 en los astrocitos del hipocampo. Es importante recalcar que este modelo no implicaba la supresión de este transportador en los astrocitos localizados en la barrera hematoencefálica. Los resultados obtenidos en los estudios dinámicos en este ratón no mostraron cambios en el metabolismo tras la activación de los DREADDs. Esto nos inclinaría a pensar que, efectivamente, el aumento de la cinética de la  $^{18}\text{F}$ -FDG se debe a que los astrocitos están captando el radiotrazador a través de GLUT1. Sin embargo, los estudios estáticos evidenciaron un aumento de la captación de la  $^{18}\text{F}$ -FDG tras la activación de los astrocitos, no en el hipocampo, sino en otras zonas cerebrales (corteza, cerebelo y bulbo olfatorio) que no fue significativo en los VOIs, pero que aparecen en la comparación paramétrica de SPM. Por lo tanto, observamos resultados diferentes cuando la incorporación del radiotrazador se realiza sin anestesia, lo que nos sugiere que los cambios metabólicos observados en áreas específicas dependen de la activación cerebral general. En este contexto, no podemos ignorar que las neuronas poseen otro tipo de transportadores de glucosa, como GLUT3 y que según un estudio reciente (Li et al., 2023) tienen la habilidad de captar glucosa por ellas mismas si es necesario, e incluso la metabolizan mediante glicólisis. En este estudio de Li et al. (2023), utilizaron un ratón *knock out* para GLUT3 en neuronas y comprobaron, utilizando estudios  $^{18}\text{F}$ -FDG PET, que no hubo cambios en el metabolismo cerebral, concluyendo que el mantenimiento del metabolismo cerebral en estos ratones se realizaba a través de los astrocitos, reforzando los resultados presentados en este trabajo (Fig. 5.1).

Con el objetivo de investigar los posibles mecanismos moleculares que subyacen a los cambios metabólicos provocados por la activación de los astrocitos, utilizamos HR-MAS que nos ha permitido valorar los cambios en el perfil metabólico observados en el hipocampo, aunque no podemos discernir si estos cambios se relacionan con astrocitos o neuronas. Los resultados mostraron un aumento de mioinositol tras la inyección de CNO. El mioinositol se expresa mayormente en los procesos astrocitarios (Brand et al., 1993) y su expresión en niveles altos se interpretan como una señal de astrogliosis (Mader et al., 2008; Sastre-Garriga et al., 2005). Por otra parte, se observaron cambios en los niveles de lactato tras la administración de CNO. El aumento de los niveles de lactato suele asociarse con una respuesta energética a una situación energética exigente, como pueden ser las crisis epilépticas (Boison and Steinhauser, 2018). Sin embargo, en nuestro estudio sólo hemos observado el efecto del tratamiento con CNO que

produce una disminución no significativa de lactato. Se requerirán futuras aproximaciones experimentales para establecer la importancia de estos datos en el contexto de la quimioactivación de los astrocitos. Un hallazgo interesante fue encontrar un incremento en los niveles de ácidos grasos tras la activación astrocitaria que se correlacionó positivamente con el aumento en la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG observada en el PET. Los ácidos grasos en el cerebro se relacionan con la mielinización e interfieren en la acción periférica de la insulina (Naffaa et al., 2022; Neschen et al., 2020). Además, de ser una fuente de energía alternativa a la glucosa (Puchalska and Cranford, 2017), son incorporados por los astrocitos cuando sus niveles son tóxicos para las neuronas (Ioannou et al., 2019). El aumento en la concentración extracelular de ácidos grasos a causa de un déficit de metabolización mitocondrial en los astrocitos puede provocar neuroinflamación, neurodegeneración (Mi et al., 2023) y alterar la eficacia en la endocitosis y exocitosis de vesículas sinápticas, afectando colateralmente a la neurotransmisión (Barber and Raben, 2019). Los astrocitos, además de captar ácidos grasos, son capaces de metabolizarlos, generando glutamina que luego es utilizada por las neuronas para la síntesis de glutamato y GABA (Andersen et al., 2021). Finalmente, dentro de los astrocitos pueden ser translocados a la matriz mitocondrial para producir cuerpos cetónicos (Romano et al., 2017). Por lo tanto, es factible que el incremento metabólico inducido por una mayor actividad astrocitaria generada por una sobre activación de los astrocitos, conlleve un aumento en la concentración de ácidos grasos, saturando el sistema de captación de los propios astrocitos (Guttenplan et al., 2021). Esto sugiere que los astrocitos en estado reactivo pueden generar también efectos neurotóxicos, además de efectos neuroprotectores. Pero, sin embargo, la amplia heterogeneidad de los astrocitos reactivos sugiere la existencia una amplia variabilidad de respuestas, alejándose de la perspectiva binaria neuroprotector-neurotóxico (Xiong et al., 2022).



**Figura 5.1.** La activación de astrocitos aumenta el consumo de  $^{18}\text{F}$ -FDG a través de la movilización de calcio mediada por Ip3r2 y el transportador de glucosa GLUT1. En la situación superior se observa la condición basal, con el aumento de la captación del radiotrazador. En la situación inferior, sin contar con el receptor Ip3r2 ni GLUT1 no se produce el aumento del consumo de  $^{18}\text{F}$ -FDG.

## 5.2. El rol de los astrocitos en la epileptogénesis

La epilepsia es un desorden neurológico que afecta aproximadamente a 65 millones de personas en el mundo. Entre sus variantes destaca la ELT que cursa con muerte neuronal, gliosis reactiva y EH, procesos asociados a la farmacoresistencia (Laxer et al., 2014; Schmidt, 2016). Hoy en día no existe tratamiento que prevenga el desarrollo de la epilepsia tras un daño epileptogénico, debido que aún no se han descubierto los mecanismos celulares implicados en los cambios estructurales y funcionales que transforman una red neuronal normal a una hiperexcitable, facilitando la aparición de CE (Engel, et al., 2013; Pitkanen et al., 2019).

Los astrocitos están implicados en los procesos neuroinflamatorios que causan las cicatrices gliales y la EH en la TLE (Al Sufiani and Ang, 2012), y en zonas cercanas al foco epiléptico pueden experimentar cambios moleculares y fisiológicos que se han relacionado con la progresión de la epileptogénesis (Sofroniew and Vinters, 2010). Además, estas células están situadas en una posición privilegiada entre los capilares sanguíneos y las neuronas, motivo por el cual son las principales responsables de la regulación de la cantidad de glucosa que entra a las células cerebrales (Marina et al., 2018). Como ya hemos dicho, la imagen  $^{18}\text{F}$ -FDG PET es una técnica que permite explorar las fluctuaciones en el metabolismo cerebral. Esta técnica se ha utilizado para localizar focos epilépticos en pacientes con ELT (Carne, et al., 2004; Duncan, 2009). En modelos animales, ha puesto de relieve el hipermetabolismo que ocurre en las primeras horas tras la inyección de pilocarpina o KA i.p. como modelos agudos (Bascuñana et al., 2020; Kornblum, et al., 2000; Mirrione, et al., 2006) o hipometabolismo en etapas tempranas post-SE (García-García, et al., 2016; Shiha et al., 2015). Dado que estudios previos demostraron el modelo epiléptico de KA iHPC en ratón presentaba CE desde el día 5 tras el SE (Lévesque and Avoli, 2013; Raedt, et al., 2009; Riban, et al., 2002), que por otro lado se asociaba con un peor pronóstico de la enfermedad, elegimos una ventana de 7 días para la caracterización del metabolismo tras la epileptogénesis.

Los datos presentados en esta tesis, indican que la inyección de KA iHPC mantiene este perfil hipometabólico hasta los 14 días post inducción del SE y consolida el uso de la técnica  $^{18}\text{F}$ -FDG PET como un posible biomarcador de epileptogénesis. Curiosamente, el uso de DZP para detener el SE, al igual que en pacientes (Calaterra and Barrow, 2014; Knudsen, 1991), modificó el perfil metabólico de estos animales comparados con aquellos en que el SE se autolimitó. En

estos casos el DZP provocó un hipometabolismo al día 1 y un hipermetabolismo al día 8 en el grupo con epilepsia. Por otro lado, la mayor diferencia entre los grupos epilépticos fue la astrogliosis en el giro dentado, por lo que el hipometabolismo pudo deberse a los mecanismos que ponen en marcha los astrocitos tras el SE. Se sabe que la activación de los astrocitos tras el SE tiene como objetivo delimitar la zona epileptogénica (*Vargas-Sánchez et al., 2018*), pero una activación constante en un largo periodo de tiempo conlleva la cronificación de la epilepsia, generando daño hipocampal y EH (*Sofroniew and Vinters, 2010*).

Teniendo en cuenta los cambios en el perfil metabólico inducidos por la activación astrocitaria, por un lado, y la inducción de actividad epileptiforme, por otro, realizamos una batería de experimentos activando los astrocitos por quimiogenética en forma crónica durante la ventana de epileptogénesis (días 1-7). El tratamiento revirtió el perfil metabólico asociado al modelo de epilepsia, rescatando el hipometabolismo el día 8 y acercándose a valores del grupo no epiléptico. Sin embargo, no se encontraron cambios en el metabolismo del grupo VEH+CNO, ni siquiera tras la dosis aguda de CNO el día 1. Estos datos son contradictorios con los observados en ratones WT (apartado 4.1.1), donde una dosis aguda provocó un aumento en la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG, en estudios dinámicos y estáticos. Esta discrepancia en los resultados pudiera deberse a que las condiciones experimentales fueron diferentes. En los experimentos de activación astrocitaria en ratones WT se realizó una única cirugía dos semanas antes del estudio PET. Sin embargo, en los experimentos con los modelos de inyección de KA iHPC se realizaron dos cirugías, y la segunda tan sólo 24 horas antes del estudio PET. Por lo tanto, no descartamos que se desarrollase un proceso inflamatorio tras la inyección intracerebral capaz de desencadenar una astrogliosis mayor. Esto podría modificar el proceso de transfección de los virus y la consiguiente activación de los DREADDs en los astrocitos, alterando el efecto metabólico observado. Sin embargo, pese a no mostrar un aumento de captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG, la activación de los astrocitos durante la epileptogénesis logró modificar tanto el aumento del metabolismo del primer día como el hipometabolismo del día 8.

Los hallazgos observados en animales epilépticos utilizando PET, se correlacionaron con cambios en la señal de EEG en animales epilépticos tratados con CNO o salinos y también en ratones *Ip3r2<sup>-/-</sup>*. Los resultados al día 7 mostraron una disminución en la DP en la banda de frecuencias comprendidas entre 6 y 30 Hz en los ratones epilépticos fueron tratados con CNO, manteniéndose, en menor medida, en el día 28. Estos datos sugieren que la activación crónica

de los astrocitos provoca cambios en la actividad EEG a largo plazo. Es bien sabido que los astrocitos intervienen en la fisiopatología de la epilepsia, modificando las subunidades de los receptores GABA, AMPA y NMDA y modulando la plasticidad sináptica (*Jabs, et al., 2008*). Sin embargo, los estudios de HR-MAS tras la activación de los astrocitos no mostraron cambios en el balance de los neurotransmisores excitadores o inhibidores, por lo que es más probable que los efectos observados estén mediados por las vías metabólicas encargadas de mantener la integridad de las neuronas tras las crisis. En este sentido, sería necesario realizar un estudio más exhaustivo de HR-MAS en el modelo de epilepsia tras el tratamiento crónico con CNO, ya que no podemos descartar que se modifiquen otros metabolitos tras la activación crónica de los astrocitos. Por otra parte, debido a los cambios que sufren los astrocitos en la epileptogénesis, el efecto de activación crónica de los astrocitos durante el desarrollo de la patología puede generar un perfil metabólico diferente. .

En línea con los experimentos descritos, se abordó, además, el estudio de la conducta de los ratones tras la inyección de KA iHPC, ya que la muerte neuronal en esta área podría alterar los procesos de memoria. Algunos estudios demostraron que los astrocitos hipocampales participan en la creación de claves espaciales durante la orientación (*Doron et al., 2022*) y que la activación de estas células en esa región era suficiente para mejorar la memoria espacial (*Adamsky et al., 2018*). Por lo tanto, realizamos una prueba en el laberinto en T, basándonos en que si la memoria estaba intacta podrían diferenciar el brazo del laberinto que conocían y pasarían a explorar el brazo nuevo. En el caso del paradigma conductual, el grupo con tratamiento ocupó más tiempo en el brazo nuevo respecto al grupo sin tratamiento que exploró más el brazo conocido. Esto indicaría que el modelo de epilepsia cursa con defectos cognitivos relacionados con la memoria y la orientación espacial, lo que se recupera al activar crónicamente los astrocitos. Además, el tratamiento crónico con CNO es confiable, ya que, aunque este fármaco se metaboliza a CZP, no provocó efectos secundarios adversos en la locomoción, como se vio en el test de rotarod.

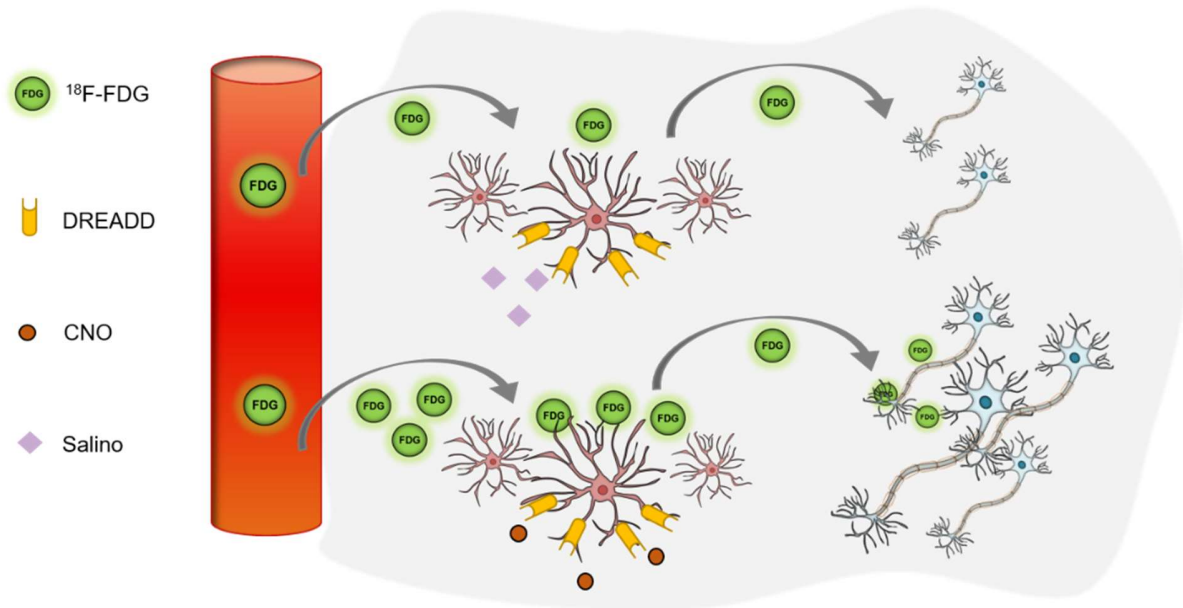
Debido a que la generación de crisis recurrentes secundarias a la inducción de un SE, como es el caso del modelo de KA utilizado en este trabajo, modifica morfológicamente el hipocampo, realizamos una serie de estudios *post mortem* para valorar la integridad de esta estructura. La activación crónica de los astrocitos durante la epileptogénesis rescató la muerte neuronal asociada a la inyección de KA y esto fue observado tanto en el día 9 como el 29, por

lo que el tratamiento es eficiente a largo plazo. Esto sugiere que el hipometabolismo no se debe a la muerte neuronal, tal y como se propone en otros artículos (*Danek et al., 2022; Jupp, et al., 2012*). Curiosamente, al estudiar los astrocitos con técnicas de inmunofluorescencia contra GFAP, observamos una mayor intensidad del marcador, no sólo en los grupos epilépticos, como era de esperar, sino, también, en el grupo control tratado con CNO. Nuestra hipótesis es que la activación quimiogénica induce modificaciones morfológicas en los astrocitos. Por otra parte, en el grupo KA+SAL, los astrocitos mostraron una morfología aberrante, con un aumento de los procesos, y un aglutinamiento en la zona de inyección y el giro dentado. Sin embargo, en los grupos KA+CNO y VEH+CNO, los astrocitos mostraban un engrosamiento general. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos de HR-MAS, en los que la activación de los astrocitos provocó un aumento de mioinositol que se relaciona con una astrogliosis debida a cambios osmóticos en astrocitos (*Chang et al., 2013; Isaacks et al., 1994*) que, por otro lado, pueden modificar la excitabilidad de las células (*Gamkrelidze et al., 2019; Kandashvili et al., 2022*).

Cuando valoramos la neuroinflamación mediante autorradiografía con  $^3\text{H}$ -PK11195, observamos que en el grupo KA+SAL se presentaba en varias estructuras cerebrales, mientras que en el grupo VEH+CNO y KA+CNO se restringía únicamente al hipocampo. Los resultados señalan, por un lado, que la activación crónica de los astrocitos provoca un aumento de los procesos neuroinflamatorios asociados con TSPO (*Nguyen, et al., 2018*), comparando el grupo VEH+CNO con el control VEH+SAL, y, por otro, que el tratamiento en el grupo epiléptico logró que la neuroinflamación no se extendiera a otras estructuras. El aumento de expresión de GFAP en la inmunohistoquímica coincide con el aumento de la unión de  $^3\text{H}$ -PK11195 en las autorradiografías, por lo que los procesos inflamatorios se relacionan con la activación de los astrocitos. Esto no quiere decir que la neuroinflamación esté mediada exclusivamente por los astrocitos, porque se sabe que la microglía también participa en este proceso. Pero, sin duda, la causa principal de la neuroinflamación es la activación de astrocitos que nosotros mismos hemos provocado con la quimiogénica, como se aprecia en el grupo VEH+CNO. En conjunto, los resultados muestran que la activación de los astrocitos a través de DREADDs puede generar un mecanismo celular favorable que restringe la neuroinflamación y la consecuente pérdida neuronal. Esto además se asocia a la recuperación del hipometabolismo cerebral indicativo de mal pronóstico de la patología (Fig. 5.2).

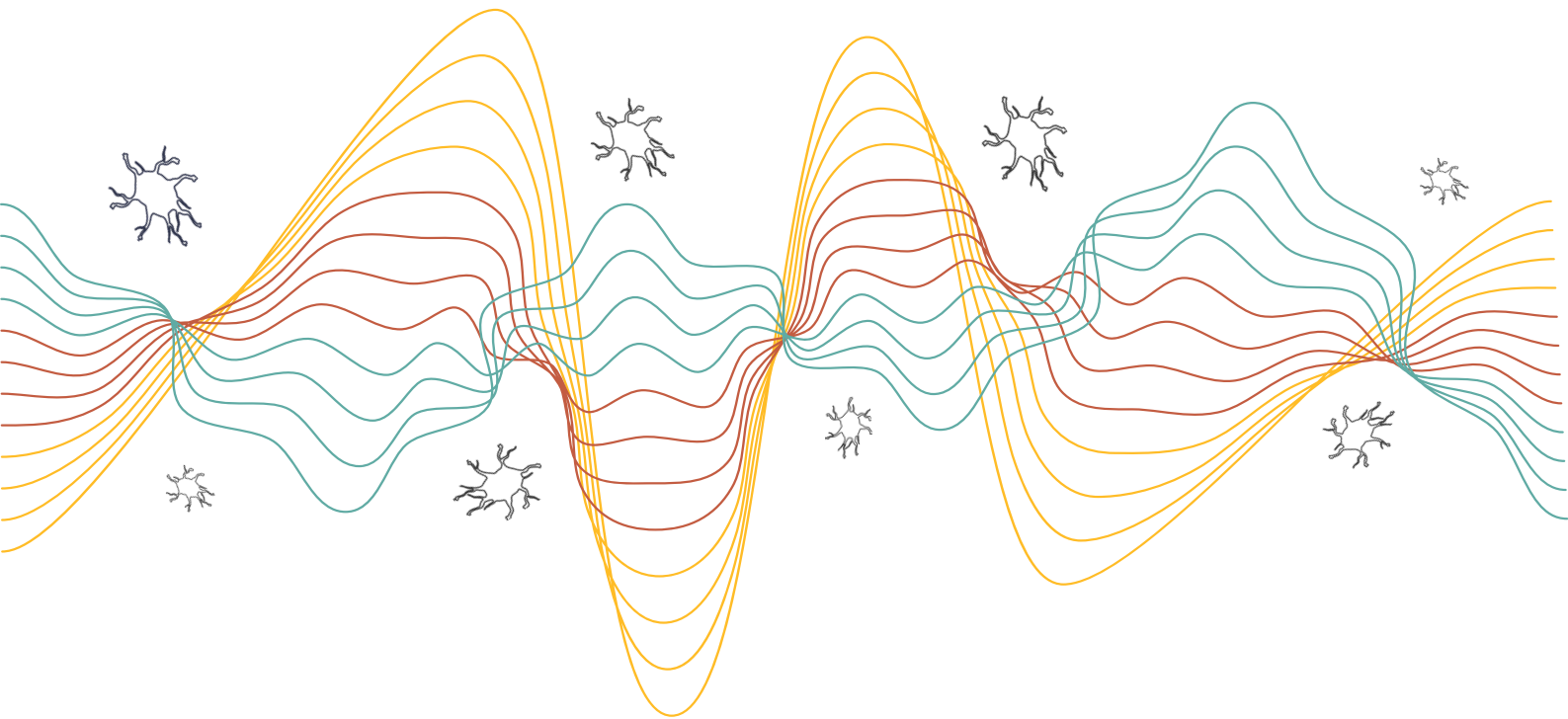
Finalmente, realizamos una serie de experimentos con optogenética para activar selectivamente los astrocitos y corroborar los hallazgos observados con quimiogenética. Las diferencias entre las dos técnicas fueron, por un lado, la resolución temporal, ya que la optogenética permite la activación de los astrocitos específicamente en el periodo de exposición a la luz, y, por otro, la estimulación unilateral, ya que se utilizó una cánula en el hipocampo ipsilateral a la inyección de KA. Los resultados muestran que la activación de astrocitos permite recuperar el metabolismo asociado al modelo a los 8 días. Sin embargo, y contrariamente a los experimentos de quimiogenética, no se observó ningún grado de protección frente a la muerte neuronal inducida por KA. Esto puede deberse al protocolo de estimulación empleado o a que sea necesaria la estimulación bilateral de los astrocitos para recuperar la pérdida neuronal, ya que estas áreas están conectadas y la lesión por KA en un hemisferio puede repercutir en el otro. Por otro lado, la estimulación crónica de los astrocitos con optogenética también provocó astrogliosis y procesos de neuroinflamación en el hipocampo. La inmunohistoquímica contra GFAP mostró una intensidad equivalente entre el grupo MLN+VEH y los grupos epilépticos, por lo que se puede inferir que la activación de los astrocitos en esta área puede estar involucrada en la astrogliosis. En cuanto a los resultados de la autorradiografía de  $^3\text{H}$ -PK11195, la neuroinflamación fue menor en el grupo MLN+KA únicamente en el hipocampo ipsilateral, donde habíamos realizado la inyección de MLN, y no en el hipocampo contralateral.

En conjunto, los resultados de este trabajo ponen en evidencia la importancia de los astrocitos en la epileptogénesis y su papel en la regulación de los estados metabólicos en esta patología. Por otra parte, se refuerza la relevancia de la detección del hipometabolismo post-ictal como biomarcador temprano del desarrollo de la patología, lo que lo convierte en una herramienta prometedora para el diagnóstico y control de la evolución de la epilepsia y sus síndromes asociados.



**Figura 5.2. La activación de astrocitos durante la epileptogénesis recupera el metabolismo cerebral y la muerte neuronal.** En la situación superior se representan los resultados con el tratamiento control, y en la inferior el tratamiento con CNO.

- CAPÍTULO 6 -  
**CONCLUSIONES**





# CONCLUSIONES

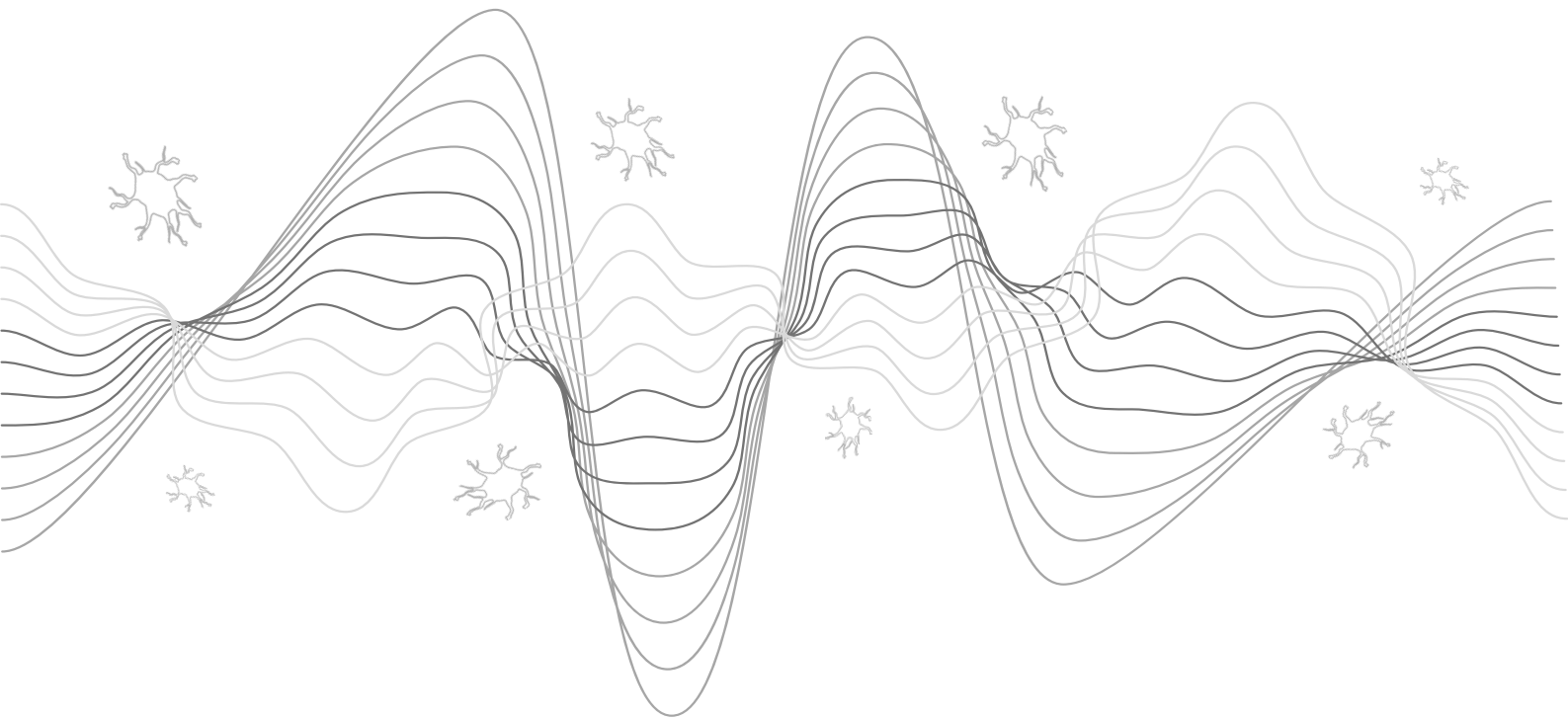
---

En base a los resultados y discusión presentados en esta tesis doctoral, se concluye que:

- 1) La activación quimiogénica de los astrocitos con CNO incrementa la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en la imagen PET cerebral.
- 2) El efecto metabólico de la activación de los astrocitos depende de la movilización de calcio mediada por  $\text{Ip}3\text{r}2$  y la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG se asocia al GLUT1 de los astrocitos.
- 3) La activación aguda de los astrocitos por quimiogénica aumenta los niveles de ácidos grasos y mioinositol.
- 4) El diazepam modifica el patrón metabólico del modelo, pero no protege de la muerte neuronal.
- 5) La activación de astrocitos durante la ventana epileptogénesis a través de quimiogénica modifica el patrón metabólico en el modelo de ácido kaínico intra-hipocampal y recupera la pérdida neuronal.
- 6) El tratamiento con quimiogénica disminuye la densidad de potencia en la banda de frecuencia comprendida entre 6 y 30 Hz en el modelo de ácido kaínico.
- 7) El tratamiento con quimiogénica mejora el déficit de memoria espacial asociado a la inyección de ácido kaínico, mientras que el tratamiento crónico con CNO no genera efectos secundarios motores.
- 8) El tratamiento crónico con optogénica por la estimulación unilateral de los astrocitos también revierte el metabolismo, pero no la pérdida neuronal.
- 9) La activación de astrocitos con quimiogénica y optogénica provoca cambios morfológicos en los astrocitos del grupo no epiléptico. Estos cambios se asocian con el aumento del mioinositol y la restricción de los procesos neuroinflamatorios al área hipocampal.



# BIBLIOGRAFÍA





# BIBLIOGRAFÍA

---

## - A -

- Adamsky A, Kol A, Kreisel T, Doron A, Ozeri-Engelhard N, Melcer T, Refaeli R, Horn H, et al. (2018), Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell* 174:59-71 e14.
- Agulhon C, Boyt KM, Xie AX, Friocourt F, Roth BL, McCarthy KD (2013), Modulation of the autonomic nervous system and behaviour by acute glial cell Gq protein-coupled receptor activation in vivo. *J Physiol* 591:5599-5609.
- Al Sufiani F, Ang LC (2012), Neuropathology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Treat* 2012:624519.
- Alexander GM, Rogan SC, Abbas AI, Armbruster BN, Pei Y, Allen JA, Nonneman RJ, Hartmann J, et al. (2009), Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* 63:27-39.
- Allen NJ, Eroglu C (2017), Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* 96:697-708.
- Allone C, Lo Buono V, Corallo F, Pisani LR, Pollicino P, Bramanti P, Marino S (2017), Neuroimaging and cognitive functions in temporal lobe epilepsy: A review of the literature. *J Neurol Sci* 381:7-15.
- Ammothumkandy A, Ravina K, Wolseley V, Tartt AN, Yu PN, Corona L, Zhang N, Nune G, et al. (2022), Altered adult neurogenesis and gliogenesis in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Nat Neurosci* 25:493-503.

- Andersen JV, Westi EW, Jakobsen E, Urruticoechea N, Borges K, Aldana BI (2021), Astrocyte metabolism of the medium-chain fatty acids octanoic acid and decanoic acid promotes GABA synthesis in neurons via elevated glutamine supply. *Mol Brain* 14:132.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999), Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000), SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20:666-673.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001), Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63:795-813.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A (2014), Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81:728-739.
- Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL (2007), Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5163-5168.
- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA, (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow, *Nature*, pp. 232-243.

**- B -**

- Barber CN, Raben DM (2019), Lipid Metabolism Crosstalk in the Brain: Glia and Neurons. *Front Cell Neurosci* 13:212.
- Barros LF, San Martín A, Ruminot I, Sandoval PY, Fernández-Moncada I, Baeza-Lehnert F, Arce-Molina R, Contreras-Baeza Y, et al. (2017), Near-critical GLUT1 and Neurodegeneration. *J Neurosci Res* 95:2267-2274.
- Barros LF, Bolanos JP, Bonvento G, Bouzier-Sore AK, Brown A, Hirrlinger J, Kasparov S, Kirchhoff F, et al. (2018), Current technical approaches to brain energy metabolism. *Glia* 66:1138-1159.
- Barros LF, Brown A, Swanson RA (2018), Glia in brain energy metabolism: A perspective. *Glia* 66:1134-1137.
- 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, *Molecular Imaging and Biology*, *Molecular Imaging and Biology*, pp. 733-740.
- Bascunana P, Gendron T, Sander K, Jahreis I, Polyak A, Ross TL, Bankstahl M, Arstad E, et al. (2019), Ex vivo characterization of neuroinflammatory and neuroreceptor changes during epileptogenesis using candidate positron emission tomography biomarkers. *Epilepsia* 60:2325-2333.
  - Bascuñana P, García-García L, Javela J, Fernández de la Rosa R, Shiha AA, Kelly J, Delgado M, Pozo MÁ. (2019), PET Neuroimaging Reveals Serotonergic and Metabolic Dysfunctions in the Hippocampal Electrical Kindling Model of Epileptogenesis, *Neuroscience*, Elsevier Ltd, pp. 101-110.
  - Bascuñana P, Brackhan M, Leiter I, Keller H, Jahreis I, Ross TL, Bengel FM, Bankstahl M, et al. (2020), Divergent metabolic substrate utilization in brain during epileptogenesis precedes chronic hypometabolism, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, , pp. 204-213.
  - Bazargani N, Attwell D (2016), Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat Neurosci* 19:182-189.
  - Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. (2011) Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation, *Cell Metabolism*, pp. 724-738.
  - Ben-Ari Y, Lagowska J, Tremblay E, Le Gal La Salle G (1979), A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res* 163:176-179.
  - Bertoglio D, Verhaeghe J, Dedeurwaerdere S, Grohn O (2017), Neuroimaging in animal models of epilepsy. *Neuroscience* 358:277-299.
  - Bertoglio D, Amhaoul H, Goossens J, Ali I, Jonckers E, Bijmens T, Siano M, Wyffels L, et al. (2021), TSPO PET upregulation predicts epileptic phenotype at disease onset independently from chronic TSPO expression in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuroimage Clin* 31:102701.
  - Bielefeld P, Sierra A, Encinas JM, Maletic-Savatic M, Anderson A, Fitzsimons CP (2017), A Standardized Protocol for Stereotaxic Intrahippocampal Administration of Kainic Acid Combined with Electroencephalographic Seizure Monitoring in Mice. *Front Neurosci* 11:160.
  - Binder DK, Steinhauser C (2021), Astrocytes and Epilepsy. *Neurochem Res* 46:2687-2695.

- Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ (1996), Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1079-1089.
- Blass JP (2002), Glucose/mitochondria in neurological conditions. *Int Rev Neurobiol* 51:325-376.
- Boison D (2012), Adenosine dysfunction in epilepsy. *Glia* 60:1234-1243.
- Boison D, Steinhauser C (2018), Epilepsy and astrocyte energy metabolism. *Glia* 66:1235-1243.
- Bonder DE, McCarthy KD (2014), Astrocytic Gq-GPCR-linked IP3R-Dependent Ca<sup>2+</sup> signaling does not mediate neurovascular coupling in mouse visual cortex in vivo, *Journal of Neuroscience*, pp. 13139-13150.
- Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G (1999), Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 89:717-729.
- Bouilleret V, Loup F, Kiener T, Marescaux C, Fritschy JM (2000), Early loss of interneurons and delayed subunit-specific changes in GABA(A)-receptor expression in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 10:305-324.
- Brackhan M, Bascunana P, Ross TL, Bengel FM, Bankstahl JP, Bankstahl M (2018), [(18)F]GE180 positron emission tomographic imaging indicates a potential double-hit insult in the intrahippocampal kainate mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 59:617-626.
- Bragin A, Azizyan A, Almajano J, Wilson CL, Engel J, Jr. (2005), Analysis of chronic seizure onsets after intrahippocampal kainic acid injection in freely moving rats. *Epilepsia* 46:1592-1598.
- Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D (1993), Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev Neurosci* 15:289-298.
- Brazhe AR, Verisokin AY, Vervevko DV, Postnov DE (2018), Sodium-Calcium Exchanger Can Account for Regenerative Ca(2+) Entry in Thin Astrocyte Processes. *Front Cell Neurosci* 12:250.

## - C -

- Calcaterra NE, Barrow JC (2014), Classics in chemical neuroscience: diazepam (valium). *ACS Chem Neurosci* 5:253-260.
- Canet G, Zub E, Zussy C, Hernandez C, Blaquiere M, Garcia V, Vitalis M, deBock F, et al. (2022), Seizure activity triggers tau hyperphosphorylation and amyloidogenic pathways. *Epilepsia* 63:919-935.
- Carmignoto G, Haydon PG (2012), Astrocyte calcium signaling and epilepsy. *Glia* 60:1227-1233.
- Carne RP, O'Brien TJ, Kilpatrick CJ, MacGregor LR, Hicks RJ, Murphy MA, Bowden SC, Kaye AH, et al. (2004), MRI-negative PET-positive temporal lobe epilepsy: a distinct surgically remediable syndrome. *Brain* 127:2276-2285.
- Cavalheiro EA, Riche DA, Le Gal La Salle G (1982), Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 53:581-589.
- Chai H, Diaz-Castro B, Shigetomi E, Monte E, Oceau JC, Yu X, Cohn W, Rajendran PS, et al. (2017), Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence, *Neuron*, pp. 531-549.e539.
- Chang BS, Lowenstein DH (2003), Epilepsy. *N Engl J Med* 349:1257-1266.
- Chang L, Munsaka SM, Kraft-Terry S, Ernst T (2013), Magnetic resonance spectroscopy to assess neuroinflammation and neuropathic pain. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:576-593.
- Chen L, Zhang Z, Hoshino A, Zheng HD, Morley M, Arany Z, Rabinowitz JD (2019), NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism. *Nat Metab* 1:404-415.
- Chen P, Chen F, Wu Y, Zhou B (2021), New Insights Into the Role of Aberrant Hippocampal Neurogenesis in Epilepsy. *Front Neurol* 12:727065.
- Cho J, Ryu S, Lee S, Kim J, Kim HI (2020), Optimizing clozapine for chemogenetic neuromodulation of somatosensory cortex, *Scientific Reports*, pp. 1-11.
- Clarke DD (1999), Circulation and energy metabolism of the brain. *Basic neurochemistry: Molecular, cellular, and medical aspects*.

- Corkrum M, Rothwell PE, Thomas MJ, Kofuji P, Araque A (2019), Opioid-Mediated Astrocyte–Neuron Signaling in the Nucleus Accumbens, *Cells*, pp. 586.
- Corkrum M, Covelo A, Lines J, Bellocchio L, Pisansky M, Loke K, Quintana R, Rothwell PE, et al. (2020), Dopamine-Evoked Synaptic Regulation in the Nucleus Accumbens Requires Astrocyte Activity. *Neuron* 105:1036-1047 e1035.
- Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M (2008), The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172:143-157.

**- D -**

- Das A, Wallace GC, Holmes C, McDowell ML, Smith JA, Marshall JD, Bonilha L, Edwards JC, et al. (2012), Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. *Neuroscience* 220:237-246.
- d'Isa R, Comi G, Leocani L (2021), Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze. *Sci Rep* 11:21177.
- Danbolt NC (2001), Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Danek J, Danacikova S, Kala D, Svoboda J, Kapoor S, Posusta A, Folbergrova J, Tauchmannova K, et al. (2022), Sulforaphane Ameliorates Metabolic Changes Associated With Status Epilepticus in Immature Rats. *Front Cell Neurosci* 16:855161.
- de Boer HM (2010), Epilepsy stigma: moving from a global problem to global solutions. *Seizure* 19:630-636.
- Descalzi G, Gao V, Steinman MQ, Suzuki A, Alberini CM (2019), Lactate from astrocytes fuels learning-induced mRNA translation in excitatory and inhibitory neurons. *Commun Biol* 2:247.
- Diaz-Garcia CM, Mongeon R, Lahmann C, Koveal D, Zucker H, Yellen G (2017), Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake. *Cell Metab* 26:361-374 e364.
- Diehl B, LaPresto E, Najm I, Raja S, Rona S, Babb T, Ying Z, Bingaman W, et al. (2003), Neocortical temporal FDG-PET hypometabolism correlates with temporal lobe

- atrophy in hippocampal sclerosis associated with microscopic cortical dysplasia. *Epilepsia* 44:559-564.
- Doron A, Rubin A, Benmelech-Chovav A, Benaim N, Carmi T, Refaeli R, Novick N, Kreisel T, et al. (2022), Hippocampal astrocytes encode reward location. *Nature* 609:772-778.
  - Dossani RH, Missios S, Nanda A (2015), The Legacy of Henry Molaison (1926-2008) and the Impact of His Bilateral Mesial Temporal Lobe Surgery on the Study of Human Memory. *World Neurosurg* 84:1127-1135.
  - Duelli R, Kuschinsky W (2001), Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol Sci* 16:71-76.
  - Dugladze T, Vida I, Tort AB, Gross A, Otahal J, Heinemann U, Kopell NJ, Gloveli T (2007), Impaired hippocampal rhythmogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17530-17535.
  - Duncan J (2009), The current status of neuroimaging for epilepsy. *Curr Opin Neurol* 22:179-184.
  - Durkee CA, Covelo A, Lines J, Kofuji P, Aguilar J, Araque A (2019), G(i/o) protein-coupled receptors inhibit neurons but activate astrocytes and stimulate gliotransmission. *Glia* 67:1076-1093.

- E -

- Eid T, Thomas MJ, Spencer DD, Runden-Pran E, Lai JC, Malthankar GV, Kim JH, Danbolt NC, et al. (2004), Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet* 363:28-37.
- Engel J, Jr., Pitkanen A, Loeb JA, Dudek FE, Bertram EH, 3rd, Cole AJ, Moshe SL, Wiebe S, et al. (2013), Epilepsy biomarkers. *Epilepsia* 54 Suppl 4:61-69.
- Engel J, Jr. (2019), Epileptogenesis, traumatic brain injury, and biomarkers. *Neurobiol Dis* 123:3-7.

**- F -**

- Falcon-Moya R, Sihra TS, Rodriguez-Moreno A (2018), Kainate Receptors: Role in Epilepsy. *Front Mol Neurosci* 11:217.
- Fellin T, Gomez-Gonzalo M, Gobbo S, Carmignoto G, Haydon PG (2006), Astrocytic glutamate is not necessary for the generation of epileptiform neuronal activity in hippocampal slices. *J Neurosci* 26:9312-9322.
- Feng D, Ho D, Chen K, Wu LC, Wang JK, Liu RS, Yeh SH (1995), An evaluation of the algorithms for determining local cerebral metabolic rates of glucose using positron emission tomography dynamic data. *IEEE Trans Med Imaging* 14:697-710.
- Fernández-Torre J (2002) Bases tecnológicas de los registros electroencefalográficos. In: *Manual de Electroencefalografía*, vol., pp. 19-34. McGraw-Hill Interamericana Madrid.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. (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.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Jr., Forsgren L, et al. (2014), ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55:475-482.
- Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshe SL, et al. (2017), Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58:522-530.
- Foldvary N, Lee N, Thwaites G, Mascha E, Hammel J, Kim H, Friedman A, Radtke R (1997), Clinical and electrographic manifestations of lesional neocortical temporal lobe epilepsy. *Neurology* 49:757-763.

**- G -**

- Gamkrelidze GN, Nanobashvili ZI, Bilanishvili IG, Lordkipanidze T, Kandashvili M, Kokaia M, Solomonias RO (2019), Concentration- and time-dependent effects of myo-inositol

- on evoked epileptic afterdischarge in the hippocampus in vivo. *Neuroreport* 30:1129-1134.
- Garcia-Garcia L, Shiha AA, Bascunana P, de Cristobal J, Fernandez de la Rosa R, Delgado M, Pozo MA (2016), Serotonin Depletion Does not Modify the Short-Term Brain Hypometabolism and Hippocampal Neurodegeneration Induced by the Lithium-Pilocarpine Model of Status Epilepticus in Rats. *Cell Mol Neurobiol* 36:513-519.
  - García-García L, Fernández de la Rosa R, Delgado M, Silván Á, Bascuñana P, Bankstahl JP, Gomez F, Pozo MA (2018), Metyrapone prevents acute glucose hypermetabolism and short-term brain damage induced by intrahippocampal administration of 4-aminopyridine in rats, *Neurochemistry International*, pp. 92-106.
  - Garcia-Garcia L, Gomez F, Delgado M, Fernandez de la Rosa R, Pozo MA (2023), The vasodilator naftidrofuryl attenuates short-term brain glucose hypometabolism in the lithium-pilocarpine rat model of status epilepticus without providing neuroprotection. *Eur J Pharmacol* 939:175453.
  - Garzillo CL, Mello LE (2002), Characterization of reactive astrocytes in the chronic phase of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsia* 43 Suppl 5:107-109.
  - Goffin K, Bormans G, Casteels C, Bosier B, Lambert DM, Grachev ID, Van Paesschen W, Van Laere K (2008), An in vivo [18F]MK-9470 microPET study of type 1 cannabinoid receptor binding in Wistar rats after chronic administration of valproate and levetiracetam. *Neuropharmacology* 54:1103-1106.
  - Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, Ellis RJ, Richie CT, et al. (2017), Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine, *Science*, pp. 503-507.
  - Gordon GRJ, Mulligan SJ, MacVicar BA (2007), Astrocyte Control of the Cerebrovasculature, *Glia*, pp. 1214-1221.
  - Gouder N, Fritschy JM, Boison D (2003), Seizure suppression by adenosine A1 receptor activation in a mouse model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia* 44:877-885.
  - Govil-Dalela T, Kumar A, Behen ME, Chugani HT, Juhasz C (2018), Evolution of lobar abnormalities of cerebral glucose metabolism in 41 children with drug-resistant epilepsy. *Epilepsia* 59:1307-1315.

- Groticke I, Hoffmann K, Löscher W (2008), Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate. *Exp Neurol* 213:71-83.
- Gröticke I, Hoffmann K, Löscher W (2008), Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate, *Experimental Neurology*, pp. 71-83.
- Guettier JM, Gautam D, Scarselli M, Ruiz de Azua I, Li JH, Rosemond E, Ma X, Gonzalez FJ, et al. (2009), A chemical-genetic approach to study G protein regulation of beta cell function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19197-19202.
- Guo Y, Gao F, Wang S, Ding Y, Zhang H, Wang J, Ding MP (2009), In vivo mapping of temporospatial changes in glucose utilization in rat brain during epileptogenesis: an 18F-fluorodeoxyglucose-small animal positron emission tomography study. *Neuroscience* 162:972-979.
- Guttenplan KA, Weigel MK, Prakash P, Wijewardhane PR, Hasel P, Rufen-Blanchette U, Munch AE, Blum JA, et al. (2021), Neurotoxic reactive astrocytes induce cell death via saturated lipids. *Nature* 599:102-107.

## - H -

- Hammers A, Koepp MJ, Hurlemann R, Thom M, Richardson MP, Brooks DJ, Duncan JS (2002), Abnormalities of grey and white matter [<sup>11</sup>C]flumazenil binding in temporal lobe epilepsy with normal MRI. *Brain* 125:2257-2271.
- Hauptmann A (1912), Luminal bei epilepsie. *Munch Med Wochenschr* 59:1907-1909.
- Haydon PG, Carmignoto G (2006), Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009-1031.
- Henning L, Unichenko P, Bedner P, Steinhauser C, Henneberger C (2023), Overview Article Astrocytes as Initiators of Epilepsy. *Neurochem Res* 48:1091-1099.
- Henshall DC, Engel T (2013), Contribution of apoptosis-associated signaling pathways to epileptogenesis: lessons from Bcl-2 family knockouts. *Front Cell Neurosci* 7:110.
- Heuser K, Eid T, Lauritzen F, Thoren AE, Vindedal GF, Tauboll E, Gjerstad L, Spencer DD, et al. (2012), Loss of perivascular Kir4.1 potassium channels in the sclerotic

hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 71:814-825.

- Hong YT, Fryer TD (2010), Kinetic modelling using basis functions derived from two-tissue compartmental models with a plasma input function: general principle and application to [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Neuroimage* 51:164-172.
- Hu F, Morris PJ, Bonaventura J, Fan H, Mathews WB, Holt DP, Lam S, Boehm M, et al. (2021), (18)F-labeled radiotracers for in vivo imaging of DREADD with positron emission tomography. *Eur J Med Chem* 213:113047.

**- I -**

- Ioannou MS, Jackson J, Sheu SH, Chang CL, Weigel AV, Liu H, Pasolli HA, Xu CS, et al. (2019), Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity. *Cell* 177:1522-1535 e1514.
- Isaacks RE, Bender AS, Kim CY, Prieto NM, Norenberg MD (1994), Osmotic regulation of myo-inositol uptake in primary astrocyte cultures. *Neurochem Res* 19:331-338.

**- J -**

- Jabs R, Seifert G, Steinhauser C (2008), Astrocytic function and its alteration in the epileptic brain. *Epilepsia* 49 Suppl 2:3-12.
- Jahreis I, Bascunana P, Ross TL, Bankstahl JP, Bankstahl M (2021), Choice of anesthesia and data analysis method strongly increases sensitivity of 18F-FDG PET imaging during experimental epileptogenesis. *PLoS One* 16:e0260482.
- Jendryka M, Palchauthuri M, Ursu D, van der Veen B, Liss B, Katzel D, Nissen W, Pekcec A (2019), Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Sci Rep* 9:4522.
- Ji B, Kaneko H, Minamimoto T, Inoue H, Takeuchi H, Kumata K, Zhang MR, Aoki I, et al. (2016), Multimodal Imaging for DREADD-Expressing Neurons in Living Brain and

- Their Application to Implantation of iPSC-Derived Neural Progenitors. *J Neurosci* 36:11544-11558.
- Jinde S, Belforte JE, Yamamoto J, Wilson MA, Tonegawa S, Nakazawa K (2009), Lack of kainic acid-induced gamma oscillations predicts subsequent CA1 excitotoxic cell death. *Eur J Neurosci* 30:1036-1055.
  - Jones ME, Paniccia JE, Lebonville CL, Reissner KJ, Lysle DT (2018), Chemogenetic Manipulation of Dorsal Hippocampal Astrocytes Protects Against the Development of Stress-enhanced Fear Learning. *Neuroscience* 388:45-56.
  - Juhász C, Mittal S (2019), Mapping Metabolism and Inflammation in. *Imaging biomarkers in epilepsy*:95.
  - Jukkola P, Guerrero T, Gray V, Gu C (2013), Astrocytes differentially respond to inflammatory autoimmune insults and imbalances of neural activity. *Acta Neuropathol Commun* 1:70.
  - Jupp B, Williams J, Binns D, Hicks RJ, Cardamone L, Jones N, Rees S, O'Brien TJ (2012), Hypometabolism precedes limbic atrophy and spontaneous recurrent seizures in a rat model of TLE. *Epilepsia* 53:1233-1244.

**- K -**

- Kandashvili M, Gamkrelidze G, Tserava L, Lordkipanidze T, Lepsveridze E, Lagani V, Burjanadze M, Dashniani M, et al. (2022), Myo-Inositol Limits Kainic Acid-Induced Epileptogenesis in Rats. *Int J Mol Sci* 23.
- Kang S, Hong SI, Lee J, Peyton L, Baker M, Choi S, Kim H, Chang SY, et al. (2020), Activation of Astrocytes in the Dorsomedial Striatum Facilitates Transition From Habitual to Goal-Directed Reward-Seeking Behavior, *Biological Psychiatry, Society of Biological Psychiatry*, pp. 797-808.
- Kann O (2023), Lactate as a supplemental fuel for synaptic transmission and neuronal network oscillations: Potentials and limitations. *J Neurochem*.
- Katzel D, Nicholson E, Schorge S, Walker MC, Kullmann DM (2014), Chemical-genetic attenuation of focal neocortical seizures. *Nat Commun* 5:3847.
- Kaur J, Paul BS, Goel P, Singh G (2019), Educational achievement, employment, marriage, and driving in adults with childhood-onset epilepsy. *Epilepsy Behav* 97:149-153.

- Knudsen FU (1991), Intermittent diazepam prophylaxis in febrile convulsions. Pros and cons. *Acta Neurol Scand Suppl* 135:1-24.
- Koeppe MJ, Hammers A, Labbe C, Woermann FG, Brooks DJ, Duncan JS (2000), 11C-flumazenil PET in patients with refractory temporal lobe epilepsy and normal MRI. *Neurology* 54:332-339.
- Koeppe RA, Holden JE, Ip WR (1985), Performance comparison of parameter estimation techniques for the quantitation of local cerebral blood flow by dynamic positron computed tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 5:224-234.
- Kornblum HI, Araujo DM, Annala AJ, Tatsukawa KJ, Phelps ME, Cherry SR (2000), In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by high resolution positron emission tomography (microPET). *Nat Biotechnol* 18:655-660.
- Kubista H, Boehm S, Hotka M (2019), The Paroxysmal Depolarization Shift: Reconsidering Its Role in Epilepsy, Epileptogenesis and Beyond. *Int J Mol Sci* 20.

- L -

- Lamusuo S, Jutila L, Ylinen A, Kalviainen R, Mervaala E, Haaparanta M, Jaaskelainen S, Partanen K, et al. (2001), [18F]FDG-PET reveals temporal hypometabolism in patients with temporal lobe epilepsy even when quantitative MRI and histopathological analysis show only mild hippocampal damage. *Arch Neurol* 58:933-939.
- Laxer KD, Trinko E, Hirsch LJ, Cendes F, Langfitt J, Delanty N, Resnick T, Benbadis SR (2014), The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy Behav* 37:59-70.
- Leiter I, Bascunana P, Bengel FM, Bankstahl JP, Bankstahl M (2019), Attenuation of epileptogenesis by 2-deoxy-d-glucose is accompanied by increased cerebral glucose supply, microglial activation and reduced astrocytosis. *Neurobiol Dis* 130:104510.
- Lévesque M, Avoli M (2013), The kainic acid model of temporal lobe epilepsy, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, pp. 2887-2899.
- Li G, Cao Y, Shen F, Wang Y, Bai L, Guo W, Bi Y, Lv G, et al. (2016), Mdivi-1 Inhibits Astrocyte Activation and Astroglial Scar Formation and Enhances Axonal Regeneration after Spinal Cord Injury in Rats. *Front Cell Neurosci* 10:241.

- Li H, Guglielmetti C, Sei YJ, Zilberter M, Le Page LM, Shields L, Yang J, Nguyen K, et al. (2023), Neurons require glucose uptake and glycolysis in vivo. *Cell Rep* 42:112335.
- Li L, Patel M, Almajano J, Engel J, Jr., Bragin A (2018), Extrahippocampal high-frequency oscillations during epileptogenesis. *Epilepsia* 59:e51-e55.
- Li T, Ren G, Lusardi T, Wilz A, Lan JQ, Iwasato T, Itohara S, Simon RP, et al. (2008), Adenosine kinase is a target for the prediction and prevention of epileptogenesis in mice. *J Clin Invest* 118:571-582.
- Li X, Zima AV, Sheikh F, Blatter LA, Chen J (2005), Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP<sub>3</sub>)-receptor type 2-deficient mice. *Circ Res* 96:1274-1281.
- Lim EY, Ye L, Paukert M (2021), Potential and Realized Impact of Astroglia Ca<sup>2+</sup> Dynamics on Circuit Function and Behavior, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, pp. 1-19.
- Loscher W (2011), Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 20:359-368.
- Löscher W (2017), *Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs*, *Neurochemical Research*, Springer US, pp. 1873-1888.

- M -

- Ma Y, Hof PR, Grant SC, Blackband SJ, Bennett R, Slatest L, McGuigan MD, Benveniste H (2005), A three-dimensional digital atlas database of the adult C57BL/6J mouse brain by magnetic resonance microscopy. *Neuroscience* 135:1203-1215.
- MacDonald AJ, Holmes FE, Beall C, Pickering AE, Ellacott KLJ (2020), Regulation of food intake by astrocytes in the brainstem dorsal vagal complex, *Glia*, pp. 1241-1254.
- MacLaren DA, Browne RW, Shaw JK, Krishnan Radhakrishnan S, Khare P, Espana RA, Clark SD (2016), Clozapine N-Oxide Administration Produces Behavioral Effects in Long-Evans Rats: Implications for Designing DREADD Experiments. *eNeuro* 3.
- Mader I, Rauer S, Gall P, Klose U (2008), (1)H MR spectroscopy of inflammation, infection and ischemia of the brain. *Eur J Radiol* 67:250-257.

- Mahler SV, Aston-Jones G (2018), CNO Evil? Considerations for the Use of DREADDs in Behavioral Neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 43:934-936.
- Maillard L, Vignal JP, Gavaret M, Guye M, Biraben A, McGonigal A, Chauvel P, Bartolomei F (2004), Semiologic and electrophysiologic correlations in temporal lobe seizure subtypes. *Epilepsia* 45:1590-1599.
- Manvich DF, Webster KA, Foster SL, Farrell MS, Ritchie JC, Porter JH, Weinshenker D (2018), The DREADD agonist clozapine N-oxide (CNO) is reverse-metabolized to clozapine and produces clozapine-like interoceptive stimulus effects in rats and mice. *Sci Rep* 8:3840.
- Marina N, Turovsky E, Christie IN, Hosford PS, Hadjihambi A, Korsak A, Ang R, Mastitskaya S, et al. (2018), Brain metabolic sensing and metabolic signaling at the level of an astrocyte. *Glia* 66:1185-1199.
- Marques FVBS, Kawamura LRdSM, Quintanilha MVT, Mota IFL, Vasconcelos AS, da Silva JFF, Mortari MR (2022), Pharmacological perspectives and mechanisms involved in epileptogenesis. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 11:97.
- Martin-Fernandez M, Jamison S, Robin LM, Zhao Z, Martin ED, Aguilar J, Benneyworth MA, Marsicano G, et al. (2017), Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior. *Nat Neurosci* 20:1540-1548.
- Martin E, Pozo M (2006), Animal models for the development of new neuropharmacological therapeutics in the status epilepticus. *Curr Neuropharmacol* 4:33-40.
- Martin R, Bajo-Graneras R, Moratalla R, Perea G, Araque A (2015), Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science* 349:730-734.
- Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM, Kuhlman PA (1996), The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res* 26:151-161.
- McCarthy EA, Maqsdulu A, Bass M, Georghiou S, Cherry JA, Baum MJ (2017), DREADD-induced silencing of the medial amygdala reduces the preference for male pheromones and the expression of lordosis in estrous female mice, *European Journal of Neuroscience*, pp. 2035-2046.
- McGarry JD, Foster DW (1980), Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 49:395-420.

- Mederos S, Hernandez-Vivanco A, Ramirez-Franco J, Martin-Fernandez M, Navarrete M, Yang A, Boyden ES, Perea G (2019), Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks. *Glia* 67:915-934.
- Medvedev A, Mackenzie L, Hiscock JJ, Willoughby JO (2000), Kainic acid induces distinct types of epileptiform discharge with differential involvement of hippocampus and neocortex. *Brain Res Bull* 52:89-98.
- Mi Y, Qi G, Vitali F, Shang Y, Raikes AC, Wang T, Jin Y, Brinton RD, et al. (2023), Loss of fatty acid degradation by astrocytic mitochondria triggers neuroinflammation and neurodegeneration. *Nat Metab* 5:445-465.
- Mirrione MM, Schiffer WK, Siddiq M, Dewey SL, Tsirka SE (2006), PET imaging of glucose metabolism in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Synapse* 59:119-121.
- Mirrione MM, Schiffer WK, Fowler JS, Alexoff DL, Dewey SL, Tsirka SE (2007), A novel approach for imaging brain-behavior relationships in mice reveals unexpected metabolic patterns during seizures in the absence of tissue plasminogen activator. *Neuroimage* 38:34-42.
- Morgan J, Moreno O, Alves M, Baz Z, Menendez Mendez A, Leister H, Melia C, Smith J, et al. (2023), Increased uptake of the P2X7 receptor radiotracer (18) F-JNJ-64413739 in the brain and peripheral organs according to the severity of status epilepticus in male mice. *Epilepsia* 64:511-523.
- Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ (2004), Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 73:1-60.

- N -

- Naffaa V, Magny R, Regazzetti A, Van Steenwinckel J, Gressens P, Laprevote O, Auzeil N, Schang AL (2022), Shift in phospholipid and fatty acid contents accompanies brain myelination. *Biochimie* 203:20-31.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, et al. (2003), Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13940-13945.
- Nagelhus EA, Ottersen OP (2013), Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev* 93:1543-1562.

- Navarrete M, Perea G, Maglio L, Pastor J, Garcia de Sola R, Araque A (2013), Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue. *Cereb Cortex* 23:1240-1246.
- Nehlig A (2004), Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70:265-275.
- Neschen S, Wu M, Fuchs C, Kondofersky I, Theis FJ, de Angelis MH, Haring HU, Sartorius T (2020), Impact of Brain Fatty Acid Signaling on Peripheral Insulin Action in Mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 128:20-29.
- Nguyen DL, Wimberley C, Truillet C, Jegou B, Caille F, Pottier G, Boisgard R, Buvat I, et al. (2018), Longitudinal positron emission tomography imaging of glial cell activation in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy: Toward identification of optimal treatment windows. *Epilepsia* 59:1234-1244.
- Nwachukwu KN, Evans WA, Sides TR, Trevisani CP, Davis A, Marshall SA (2021), Chemogenetic manipulation of astrocytic signaling in the basolateral amygdala reduces binge-like alcohol consumption in male mice, *Journal of Neuroscience Research*, pp. 1957-1972.

**- P -**

- Padma MV, Simkins R, White P, Satter M, Christian BT, Dunigan K, Lee C, Jacobs M, et al. (2004), Clinical utility of <sup>11</sup>C-flumazenil positron emission tomography in intractable temporal lobe epilepsy. *Neurol India* 52:457-462.
- Page MA, Krebs HA, Williamson DH (1971), Activities of enzymes of ketone-body utilization in brain and other tissues of suckling rats. *Biochem J* 121:49-53.
- Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB, Jegla T (2005), Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 307:600-604.
- Parent JM, Elliott RC, Pleasure SJ, Barbaro NM, Lowenstein DH (2006), Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 59:81-91.
- Park JH, Cho H, Kim H, Kim K (2006), Repeated brief epileptic seizures by pentylenetetrazole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discrete brain regions of freely moving adult rats. *Neuroscience* 140:673-684.
- Park TY, Nishida KS, Wilson CM, Jaiswal S, Scott J, Hoy AR, Selwyn RG, Dardzinski BJ, et al. (2017), Effects of isoflurane anesthesia and intravenous morphine self-

- administration on regional glucose metabolism ([<sup>18</sup>F] FDG-PET) of male Sprague-Dawley rats, *Eur J Neurosci.* 45(7): pp. 922-931.
- Parpura V, Zorec R (2010), Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 63:83-92.
  - Pascual MR (2007), Temporal lobe epilepsy: clinical semiology and neurophysiological studies. *Semin Ultrasound CT MR* 28:416-423.
  - Paur H, Chazot PL (2007), The anatomy of epilepsy. *Current Anaesthesia & Critical Care* 18:3-7.
  - Paxinos G, Franklin KBJ (2012) Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Elsevier Science.
  - Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ (2007), Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55:1251-1262.
  - Penfield W (1954), Temporal lobe epilepsy. *Br J Surg* 41:337-343.
  - Peng W, Tan C, Mo L, Jiang J, Zhou W, Du J, Zhou X, Liu X, et al. (2021), Glucose transporter 3 in neuronal glucose metabolism: Health and diseases. *Metabolism* 123:154869.
  - Perea G, Araque A (2005), Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38:375-382.
  - Perea G, Araque A (2007), Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-1086.
  - Petravicz J, Fiacco TA, McCarthy KD (2008), Loss of IP3 receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity. *J Neurosci* 28:4967-4973.
  - Pitkanen A, Ekolle Ndode-Ekane X, Lapinlampi N, Puhakka N (2019), Epilepsy biomarkers - Toward etiology and pathology specificity. *Neurobiol Dis* 123:42-58.
  - Puchalska P, Crawford PA (2017), Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metab* 25:262-284.
  - Purnell BS, Alves M, Boison D (2023), Astrocyte-neuron circuits in epilepsy. *Neurobiol Dis* 179:106058.

**- R -**

- Racine RJ (1972), Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281-294.
- Raedt R, Van Dycke A, Van Melkebeke D, De Smedt T, Claeys P, Wyckhuys T, Vonck K, Wadman W, et al. (2009), Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta Neurol Scand* 119:293-303.
- Ratzliff A, Santhakumar V, Howard A, Soltesz I (2002), Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis? *Trends Neurosci* 25:140-144.
- Reddy DS, Kuruba R (2013), Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci* 14:18284-18318.
- Riban V, Bouilleret V, Pham-Le BT, Fritschy JM, Marescaux C, Depaulis A (2002), Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 112:101-111.
- Romano A, Koczwara JB, Gallelli CA, Vergara D, Micioni Di Bonaventura MV, Gaetani S, Giudetti AM (2017), Fats for thoughts: An update on brain fatty acid metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 84:40-45.
- Roth BL (2016), DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89:683-694.
- Rusina E, Bernard C, Williamson A (2021), The Kainic Acid Models of Temporal Lobe Epilepsy. *eNeuro* 8.

**- S -**

- Sada N, Lee S, Katsu T, Otsuki T, Inoue T (2015), Epilepsy treatment. Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy. *Science* 347:1362-1367.
- Sadler M, Desbiens R (2000), Scalp EEG in temporal lobe epilepsy surgery. *Canadian journal of neurological sciences* 27:S22-S28.
- Sarkisian MR (2001), Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders. *Epilepsy Behav* 2:201-216.

- Sastre-Garriga J, Ingle GT, Chard DT, Ramio-Torrenta L, McLean MA, Miller DH, Thompson AJ (2005), Metabolite changes in normal-appearing gray and white matter are linked with disability in early primary progressive multiple sclerosis. *Arch Neurol* 62:569-573.
- Scharfman HE (2007), The neurobiology of epilepsy. *Current neurology and neuroscience reports* 7:348-354.
- Schmidt D (2016), Drug treatment strategies for epilepsy revisited: starting early or late? One drug or several drugs? *Epileptic Disord* 18:356-366.
- Schurr A, Miller JJ, Payne RS, Rigor BM (1999), An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *J Neurosci* 19:34-39.
- Shen W, Chen S, Liu Y, Han P, Ma T, Zeng LH (2021), Chemogenetic manipulation of astrocytic activity: Is it possible to reveal the roles of astrocytes?, *Biochemical Pharmacology*, Elsevier Inc., pp. 114457.
- Sheng J, Liu S, Qin H, Li B, Zhang X (2018), Drug-Resistant Epilepsy and Surgery. *Curr Neuroparmacol* 16:17-28.
- Shiha AA, de Cristobal J, Delgado M, Fernandez de la Rosa R, Bascunana P, Pozo MA, Garcia-Garcia L (2015), Subacute administration of fluoxetine prevents short-term brain hypometabolism and reduces brain damage markers induced by the lithium-pilocarpine model of epilepsy in rats. *Brain Res Bull* 111:36-47.
- Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ (2007), Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1766-1791.
- Sloviter RS (2008), Hippocampal epileptogenesis in animal models of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: the importance of the "latent period" and other concepts. *Epilepsia* 49 Suppl 9:85-92.
- Smith D, Pernet A, Hallett WA, Bingham E, Marsden PK, Amiel SA (2003), Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:658-664.
- Smith ZZ, Benison AM, Bercum FM, Dudek FE, Barth DS (2018), Progression of convulsive and nonconvulsive seizures during epileptogenesis after pilocarpine-induced status epilepticus. *J Neurophysiol* 119:1818-1835.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010), Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.

- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Rosiers MHD, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977), The [14C]Deoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization: Theory, Procedure, and Normal Values in the Conscious and Anesthetized Albino Rat, *Journal of Neurochemistry*, pp. 897-916.
- Spangler-bickell MG, Laat BD, Fulton R, Bormans G, Nuyts J (2016), The effect of isoflurane on 18 F-FDG uptake in the rat brain : a fully conscious dynamic PET study using motion compensation, *EJNMMI Research*, 6(1):86.
- Sueri C, Gasparini S, Balestrini S, Labate A, Gambardella A, Russo E, Leo A, Casarotto S, et al. (2018), Diagnostic Biomarkers of Epilepsy. *Curr Pharm Biotechnol* 19:440-450.

### - T -

- Taberner A, Medina JM, Giaume C (2006), Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. *J Neurochem* 99:1049-1061.
- Thorn SL, deKemp RA, Dumouchel T, Klein R, Renaud JM, Wells RG, Gollob MH, Beanlands RS, et al. (2013), Repeatable noninvasive measurement of mouse myocardial glucose uptake with 18F-FDG: evaluation of tracer kinetics in a type 1 diabetes model. *J Nucl Med* 54:1637-1644.
- Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, et al. (2005), An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med* 11:973-981.
- Töllner K, Twele F, Löscher W (2016), Evaluation of the pentylene-tetrazole seizure threshold test in epileptic mice as surrogate model for drug testing against pharmacoresistant seizures, *Epilepsy and Behavior*, Elsevier Inc., pp. 95-104.
- Toyama H, Ichise M, Liow J-s, Vines DC, Seneca NM, Modell KJ, Seidel J, Green MV, et al. (2004), Evaluation of anesthesia effects on [ 18 F ] FDG uptake in mouse brain and heart using small animal PET, pp. 251-256.
- Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, Shorvon S, Lowenstein DH (2015), A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia* 56:1515-1523.
- Turkington TG (2001), Introduction to PET instrumentation. *J Nucl Med Technol* 29:4-11.

**- U -**

- Ujita S, Sasaki T, Asada A, Funayama K, Gao M, Mikoshiba K, Matsuki N, Ikegaya Y (2017), cAMP-Dependent Calcium Oscillations of Astrocytes: An Implication for Pathology. *Cereb Cortex* 27:1602-1614.
- Urban DJ, Roth BL (2015), DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55:399-417.

**- V -**

- Vargas-Sánchez K, Mogilevskaya M, Rodríguez-Pérez J, Rubiano MG, Javela JJ, González-Reyes RE (2018), Astroglial role in the pathophysiology of status epilepticus: An overview, *Oncotarget*, pp. 26954-26976.
- Verkhratsky A, Matteoli M, Parpura V, Mothet JP, Zorec R (2016), Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *EMBO J* 35:239-257.

**- W -**

- Wang S, Levesque M, Avoli M (2019), Transition from status epilepticus to interictal spiking in a rodent model of mesial temporal epilepsy. *Epilepsy Res* 152:73-76.
- Weerth SH, Holtzclaw LA, Russell JT (2007), Signaling proteins in raft-like microdomains are essential for Ca<sup>2+</sup> wave propagation in glial cells. *Cell Calcium* 41:155-167.
- Westbrook GL (2014) Seizures and Epilepsy. In: *Principles of Neural Science*, Fifth Edition, vol. New York, NY: McGraw-Hill Education.
- Wiebe S (2000), Epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Can J Neurol Sci* 27 Suppl 1:S6-10; discussion S20-11.
- Williamson P (1998), Anatomic classification of localization-related epilepsies. *Epilepsy*:2405-2416.