



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ANÁLISIS LONGITUDINAL DE LOS CAMBIOS DEL SISTEMA LÍMBICO TRAS LA
MODULACIÓN DE LA VÍA SEPTO-HIPOCAMPAL EN UN MODELO DE EPILEPSIA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

BEATRIZ ALEJANDRA GARAY CORTES

TUTORES PRINCIPALES:

DR. LUIS CONCHA LOYOLA

DR. HIRAM LUNA MUNGUÍA

DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA CONDUCTUAL Y COGNITIVA - INB

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. JOSÉ GERARDO ROJAS PILONI

DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y NEUROFISIOLOGÍA-
INB

DRA. MANOLA CUÉLLAR HERRERA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"

JURIQUILLA, QUERÉTARO, SEPTIEMBRE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM –Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

La investigación aquí descrita contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (IA200621 HLM e IN204720 LC). De igual forma, se agradece al CONACYT por la beca de posgrado concedida para la realización de este trabajo (CVU: 1005958).

Este proyecto fue llevado a cabo en el Laboratorio de “Conectividad cerebral” (C-13) del Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, y en el Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM) del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la co-tutoría del Dr. Luis Concha Loyola y del Dr. Hiram Luna Munguía y con el apoyo de Mirelta Regalado y Juan Ortiz.

Este trabajo contó con la asistencia técnica de las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología, agradecemos a la Dra. Deisy Gasca Martínez, Elsa Nydia Hernández Ríos, Dra. Ericka A. de los Ríos Arellano, Leopoldo González Santos, Dra. Alejandra Castilla y MVZ Martín García.

Agradecemos a la Unidad de Enseñanza del Instituto de Neurobiología, particularmente a la Dra. Nuri Aranda López y a Ma. del Carmen Mendoza López por la instrucción y apoyo en la realización de trámites.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es resultado del esfuerzo y dedicación de muchas personas; primeramente, quiero agradecer a mi familia (a mis padres, Silvia y Javier, mis hermanos Marisol y Eder y mi abue Sol) y amigos (Alejandra, Aidé, Ángel, Itzel, Lalo, Anaí, Ana, Pablo) por siempre creer en mí, motivarme y apoyar cada decisión y cada logro, por estar en los momentos buenos y en los no tan buenos, por ser incondicionales cuando los necesité y aterrizarme cuando fue necesario.

A los doctores Hiram y Luis por el apoyo, tiempo, dedicación, soporte y paciencia que brindaron para mí y la realización de este trabajo, sin ello no hubiese sido posible; a los compañeros y amigos del laboratorio C13 (Ricardo, Ana, Itza, David, Mirelta, Temo, Pam, Poncho) por ayudarme y enseñarme siempre que lo necesité.

A quienes conocí en esta etapa, porque me escucharon y comprendieron durante el proceso, por ser mis amigos, mis terapeutas, mis colegas y mis rommies en algunos casos (Diego, Carlos, Luis Trujillo, Gama, Brenda).

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. ABSTRACT	9
3. INTRODUCCIÓN	11
4. ANTECEDENTES	11
4.1. DEFINICIÓN DE EPILEPSIA	11
4.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA EPILEPSIA	11
4.3. NEUROBIOLOGÍA DE LA EPILEPSIA	12
4.4. SISTEMA LÍMBICO EN CONDICIONES NORMALES Y PATOLÓGICAS	15
4.4.1. ANATOMÍA	15
4.4.2. CONECTIVIDAD	15
4.4.3. EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL	19
4.5. MODELOS EXPERIMENTALES EN RATA	20
4.5.1. LESIÓN DE LA VÍA SEPTO-HIPOCAMPAL MEDIANTE EL	
USO DE SAPORINAS	21
4.5.1.1. GAT1 saporina	21
4.5.1.2. 192-IgG saporina	22
4.5.2. MODELO DE PILOCARPINA	23
4.6. IMÁGENES CON TENSOR DE DIFUSIÓN EN EPILEPSIA DEL	
LÓBULO TEMPORAL	25
5. JUSTIFICACIÓN	28
6. HIPÓTESIS	29
7. OBJETIVOS	30
7.1. OBJETIVO GENERAL	30
7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
8. MATERIALES Y MÉTODOS	31
8.1. ANIMALES	31
8.2. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES <i>IN VIVO</i> POR RESONANCIA	
MAGNÉTICA	31
8.3. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA PARA LA MODULACIÓN DE LA VÍA	
SEPTO-HIPOCAMPAL	32

8.4. <i>STATUS EPILEPTICUS</i> INDUCIDO POR PILOCARPINA	33
8.5. PRE-PROCESAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN	35
8.6. SELECCIÓN DE REGIONES DE INTERÉS Y ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE DIFUSIÓN	36
8.7. PREPARACIÓN DEL TEJIDO Y ANÁLISIS HISTOLOGICO	37
8.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
9. RESULTADOS	39
9.1. DETERMINACIÓN DEL SITIO DE INYECCIÓN	39
9.2. CAMBIOS LONGITUDINALES EN LA FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA (FA) DERIVADOS DE LAS IMÁGENES ADQUIRIDAS <i>IN VIVO</i>	40
9.2.1. GRUPOS CONTROL	40
9.2.2. GRUPOS SOMETIDOS A LA INDUCCIÓN DE <i>STATUS</i> <i>EPILEPTICUS</i> POR PILOCARPINA	45
9.3. CAMBIOS EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE LOS ANIMALES PARA DESARROLLAR EL <i>STATUS EPILEPTICUS</i>	49
9.4. CAMBIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS TRAS LA LESIÓN SELECTIVA DEL SEPTUM MEDIAL	51
10. DISCUSIÓN	55
10.1. CAMBIOS INDUCIDOS TRAS LA LESIÓN SELECTIVA DEL SEPTUM MEDIAL	56
10.1.1. GAT1 SAPORINA	56
10.1.2. 192-IgG SAPORINA	58
10.2. CAMBIOS LONGITUDINALES EN LA FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA (FA) PROVOCADOS POR EL <i>STATUS EPILEPTICUS</i> INDUCIDO POR PILOCARPINA	59
11. CONCLUSIÓN	61
12. REFERENCIAS	62

1. RESUMEN

La epilepsia del lóbulo temporal es el síndrome epiléptico más frecuente alrededor del mundo y es el que muestra mayores índices de farmacorresistencia. Además, es un padecimiento asociado a lesiones en sustancia gris y sustancia blanca. El fórnix es un tracto de sustancia blanca que ha mostrado alteraciones en pacientes con epilepsia farmacorresistente, por esta razón es necesario conocer su participación en el proceso de epileptogénesis. Sin embargo, hacer el seguimiento de este proceso en pacientes resulta imposible y los modelos animales son una herramienta de vital importancia. Realizando modificaciones en las neuronas de la vía septo-hipocampal con saporinas (sustancias que inhiben la síntesis de proteínas de células específicas) se pueden observar cambios hipocampales que pueden contribuir a la modificación de procesos epileptogénicos. El objetivo de este trabajo fue analizar longitudinalmente los cambios de la microestructura de la vía septo-hipocampal tras la lesión selectiva de las aferencias del hipocampo. Para esto, se utilizó el modelo del tensor para calcular la fracción de anisotropía de tales estructuras en diferentes puntos temporales. Para ello, utilizamos ratas Sprague-Dawley macho de 38 días de edad al inicio del estudio. A través de cirugía estereotáxica, los animales de 44 días de edad fueron inyectados (325 ng/ml de saporina GAT1-Sap (lesión GABAérgica) ó 375 ng/ml de saporina 192-IgG (lesión colinérgica) a nivel del septum medial. Doce días post-cirugía, la mitad de los animales fueron llevados a *status epilepticus* inducido con inyecciones sistémicas de pilocarpina (340 mg/kg dosis inicial y 170 mg/kg dosis subsecuentes). Los animales fueron escaneados *in vivo* en un resonador 7T a diferentes tiempos: 1) inicio del protocolo, 2) 10 días después de la cirugía del septum medial, 3) 24 días después de la inducción del *status epilepticus* y 4) 64 días post-*status epilepticus*. Los resultados muestran que la lesión de grupos neuronales GABAérgicos o colinérgicos del septum medial no produce cambios observables en las imágenes de difusión en fimbria o hipocampo dorsal. Sin embargo, la saporina GAT1-SAP duplicó el índice de mortalidad de los animales en el modelo de pilocarpina, mientras que la saporina 192-IgG no mostró este cambio. Los resultados del análisis inmunohistoquímico sugieren que, si bien las

saporinas son efectivas para depletar las células del septum medial y son selectivas para células inmunorreactivas a parvalbúmina o acetilcolinesterasa, tienen un efecto parcial sobre el resto de las células de esta estructura. Esto sugiere que la integridad del septum medial es un factor determinante en la susceptibilidad para presentar crisis epilépticas, sin embargo, se necesitan técnicas más específicas para observar los cambios microestructurales en el proceso de epileptogénesis.

2. ABSTRACT

Temporal lobe epilepsy is the most common epileptic syndrome in the world, with the highest index of pharmacoresistance, and associated to gray and white matter lesions. Although the fornix is a white matter tract usually altered in patients with refractory temporal lobe epilepsy, its involvement in the epileptogenic process is still not fully understood. However, monitoring this evolution in patients is impossible and animal models become a very useful tool. By lesioning the septo-hippocampal pathway neurons with saporins (substances that inhibit the protein synthesis of specific cells) we can achieve hippocampal changes that can contribute to epileptogenic processes. The aim of this work was to longitudinally analyze the microstructural changes of some of the brain regions that integrate the septo-hippocampal pathway after selectively lesioning the GABAergic and cholinergic septal connections. For this matter, we used the tensor model to calculate the fractional anisotropy of medial septum, dorsal hippocampus and fimbria at four different time points. Male Sprague-Dawley rats (44 days old) were injected into medial septum with the following toxins: 1) GAT1-Sap (325 ng/ml; for GABAergic lesion) or 2) 192-IgG saporin (375 ng/ml; for cholinergic lesion). Twelve days after the stereotaxic surgery, half of the injected animals were submitted to the pilocarpine model. Animals were scanned using a 7T scanner at four different time points: 1) before any manipulation, 2) 10 and 3) 24 and 4) 64 days after the *status epilepticus* induction. The results show that the injuries of GABAergic or cholinergic neuronal groups induce no observable changes in diffusion-weighted images in fimbria or dorsal hippocampus. Nevertheless, the GAT1-SAP increased the mortality rate of those animals submitted to the pilocarpine model; effect that was not observed in those animals injected with 192-IgG saporin. The immunohistochemical analysis suggest that, although saporins are effective in depleting the cells of the medial septum and are selective for specific cells, they have a partial effect under the rest of the cells from this structure. This suggests that the medial septum integrity is a determining factor in the susceptibility to trigger seizures. However, more specific techniques are required to determine the microstructural specific changes during the epileptogenic processes.

3. INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una enfermedad crónica del sistema nervioso central que se manifiesta a través de la predisposición a presentar crisis epilépticas espontáneas recurrentes (CEER). Específicamente, la Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT) es la forma más frecuente de epilepsia de origen focal, identificándose a las crisis febriles, al *status epilepticus*, a las infecciones y a los traumatismos padecidos durante la infancia temprana como factores predisponentes del desarrollo de dicha enfermedad. Numerosos estudios tanto clínicos como experimentales han demostrado que la actividad epileptiforme en sujetos con ELT se origina en regiones del sistema límbico, describiéndose también alteraciones de sustancia gris y blanca a nivel de esta área cerebral (destacando la esclerosis hipocampal). Sin embargo, algunos trabajos también han identificado anormalidades en estructuras distantes al sistema límbico, lo cual ha modificado la perspectiva de la enfermedad, redireccionándola hacia un enfoque más global y menos focalizado. Dichas anormalidades alejadas del foco epiléptico han sido identificadas gracias a la imagenología por resonancia magnética (IRM) sensible a difusión pues es capaz de inferir la microestructura del tejido nervioso con base a la deducción de los movimientos aleatorios de las moléculas de agua. El problema radica en que tales hallazgos sólo se han descrito en pacientes con ELT instaurada, desconociéndose si éstos son causa o consecuencia del proceso epileptogénico. La dificultad para hacer el seguimiento de estas lesiones en pacientes ha impulsado el uso de modelos animales capaces de simular algunas de las características clínicas del trastorno. Uno de los modelos de epilepsia adquirida más usados es el de la pilocarpina pues reproduce algunas de las alteraciones estructurales de la enfermedad, favoreciendo el desencadenamiento de CEER de origen límbico en los animales. En general, durante las últimas cuatro décadas, dicho modelo ha ayudado a comprender mejor el proceso epileptogénico. Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar los cambios microestructurales que aparecen tras la lesión selectiva de conexiones GABAérgicas o colinérgicas y analizarlos longitudinalmente mediante el uso de IRM sensible a difusión.

4. ANTECEDENTES

4.1 DEFINICIÓN DE EPILEPSIA

La palabra epilepsia proviene del griego *epilambanein*, que significa ser “poseído o ser atacado”. Este término se deriva de la idea de que la epilepsia representaba un ataque o un castigo de los dioses o espíritus malignos (Magiorkinis et al., 2010). Actualmente, la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) define una crisis epiléptica como la ocurrencia de signos y/o síntomas debidos a una actividad neuronal excesiva sincrónica o asincrónica anormal; y a la epilepsia la define como una enfermedad cerebral crónica caracterizada por predisposición duradera a generar crisis epilépticas espontáneas y recurrentes (CEER) y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales propias de esta condición (Fisher et al., 2014; ILAE, 2014). Dichas CEER son secundarias a descargas neuronales anormalmente excesivas y sincrónicas cuyo origen puede estar limitado a una sola región cerebral o provenir de diferentes sitios cerebrales. De acuerdo con la distribución de las descargas, esta actividad del sistema nervioso central se manifiesta de diferentes formas y se asocia a una variada comorbilidad (ILAE, 2014). En cuanto a su etiología, se propone que su clasificación sea genética, estructural, metabólica, inmunitaria, infecciosa o desconocida (ILAE, 2014).

4.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA EPILEPSIA

La epilepsia comprende más de 40 síndromes clínicos y afecta a cerca de 60 millones de personas en el mundo, de las cuales el 80% se encuentran en los países en vías de desarrollo, . La mediana de incidencia de la epilepsia en estos países es de 68.7, en comparación con 43.4 en los países desarrollados. Además, en los países de ingresos altos, el riesgo de muerte prematura de las personas que viven con epilepsia es de dos a tres veces más alto que en la población general; cifra que se dispara en los países de ingresos bajos (seis veces superior) (Kotsopoulos et al., 2002; Burneo et al., 2005; Olmos-Hernández et al., 2013; Guzmán-Jiménez y Velasco-Monroy, 2015). En México, al menos 2 millones de

personas sufren epilepsia y se estima que la prevalencia oscila entre 11.4 y 20.3 casos por cada 1000 habitantes (Guzmán-Jiménez y Velasco-Monroy, 2015).

El alto índice de prevalencia de este padecimiento y los números elevados de individuos sin un tratamiento efectivo, así como el hecho de que aproximadamente 50% de la población con epilepsia sufre comorbilidades psiquiátricas como trastornos de conducta, ansiedad, depresión y alteraciones cognitivas, convierten a esta enfermedad en un grave problema de salud pública en los países en vías de desarrollo. Aunado a lo anterior, otro de los problemas a los que se enfrentan los pacientes epilépticos en países como México es la poca disponibilidad de recursos para detectarla a tiempo y así evitar un mayor impacto en sus actividades cotidianas y a la postre en su calidad de vida (Kwan y Brodie, 2000; Téllez-Zenteno et al., 2005; Téllez-Zenteno y Hernández-Ronquillo, 2012).

4.3 NEUROBIOLOGÍA DE LA EPILEPSIA

La membrana neuronal es semi-permeable, permitiendo el paso de forma selectiva a algunos iones cargados eléctricamente (principalmente Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^-). Esta característica le confiere la capacidad de originar cambios rápidos que alteran súbitamente la diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula (Scharfman, 2007). Durante el estado de reposo de la membrana neuronal, las células se mantienen cargadas negativamente con respecto al exterior y gracias a la bomba de sodio-potasio se logra la regulación de la concentración de iones en el interior de la neurona. Sin embargo, para originar un potencial de acción o descarga neuronal es necesario alterar el estado de reposo de la neurona a través de dos fenómenos: 1) la despolarización (la neurona recibe una carga positiva y se vuelve menos negativa con respecto al exterior) y 2) la hiperpolarización (la neurona alcanza una carga más positiva que su exterior) (Llinás, 1988; Zhang y McBain, 1995; Bean, 2007). Finalmente, dichos potenciales de acción o descargas neuronales se propagan a lo largo de los axones hacia neuronas vecinas y se favorece la liberación de neurotransmisores en las hendiduras sinápticas (Stuart et al., 1997). El problema radica en la aparición de estados de hiperexcitabilidad que

perturban el ambiente iónico antes descrito y desencadenan la actividad epiléptica (Chamberlin et al., 1990; Kullmann, 2002; Somjen, 2002; Vaillend et al., 2002).

La epileptogénesis es el proceso mediante el cual un grupo de neuronas desarrolla hiperexcitabilidad y alcanza un estado en el que puede generar crisis epilépticas de forma espontánea. En este proceso se involucran dos tipos de fenómenos: 1) el inicio de descargas que un cierto grupo de neuronas repiten de manera anómala y 2) la propagación de dichas descargas hacia neuronas vecinas y distantes. En este sentido, el desbalance entre la neurotransmisión excitadora e inhibitoria ha sido señalado como uno de los mecanismos esenciales de la ictogénesis (proceso a través del cual se inicia una crisis epiléptica) (Thomas et al., 2003, 2004; Blauwblomme et al., 2014; Luna-Munguía et al., 2019). Aseveración sustentada a partir de estudios clínicos de microdiálisis realizados en el foco epiléptico de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (ELT) farmacorresistente, los cuales han reportado niveles extracelulares elevados de glutamato y niveles extracelulares disminuidos del ácido gamma-amino butírico (GABA) durante el período ictal e interictal (During y Spencer, 1993; Cavus et al., 2005, 2008). Luna-Munguía et al. (2011) reportaron resultados similares en un modelo de epilepsia adquirida. Todos estos resultados sugieren que las concentraciones extracelulares de glutamato permanecen elevadas entre crisis y crisis, situación que puede llegar a generar excitotoxicidad (Barker-Haliski y White, 2015).

La aseveración de que el sistema glutamatérgico está involucrado en el inicio, propagación y mantenimiento de la actividad epiléptica se fundamenta en los trabajos descritos anteriormente y en estudios realizados en el tejido epiléptico removido de pacientes sometidos a cirugía. Éstos sugieren un ciclo glutamato-glutamina perturbado (Eid et al., 2016), consecuencia de diversas alteraciones como: 1) fallas en la expresión y/o funcionamiento de los transportadores de glutamato (Proper et al., 2002), 2) pérdida de la enzima glutamina sintetasa astroglial (Eid et al., 2004; van der Hel et al., 2005) y 3) cambios en la densidad y funcionalidad de receptores NMDA, AMPA, kainato y metabotrópicos (Mathern et

al., 1998; Blümcke et al., 2000; Tang y Lee, 2001; Das et al., 2012). Similar a lo descrito con el glutamato, la falla en el sistema GABAérgico no sólo involucra los niveles extracelulares disminuidos del GABA descritos anteriormente. También se han sugerido otras causas como parte del proceso que antecede al desarrollo de descargas epilépticas. Algunas son: 1) desensibilización de receptores GABAérgicos a nivel pre- y post-sináptico (Kamphuis et al., 1991; Asproдини et al., 1992), 2) alteración en la homeostasis de los iones Cloro (Auer et al., 2020), 3) anomalías en la liberación del GABA, posiblemente reguladas por los autorreceptores GABA_B (Mott et al., 1993), 4) fallas en los transportadores GABAérgicos (Mathern et al., 1999; Mattison et al., 2018; Schijns et al., 2020) y 5) pérdida masiva de neuronas GABAérgicas en CA1, CA3 y giro dentado, así como de interneuronas GABAérgicas que conectan hipocampo y septum medial (Liu et al., 2014; Rocha et al., 2014).

Las descripciones previas dejan claro que la ictogénesis surge como consecuencia de alteraciones en las propiedades intrínsecas de las neuronas, de la perturbación del ambiente iónico y del desbalance entre la neurotransmisión excitadora e inhibitoria. Sin embargo, estas explicaciones aún resultan insuficientes para tratar de explicar la naturaleza crónica y recurrente de las crisis epilépticas espontáneas. Por ello cobra relevancia el estudio de la epileptogénesis y la descripción de los procesos patológicos a través de los cuales las redes neuronales aumentan su excitabilidad y su susceptibilidad para presentar crisis epilépticas espontáneas hasta alcanzar el establecimiento de la enfermedad (Pitkänen et al., 2015). Actualmente se ha reportado que el proceso de epileptogénesis involucra tres etapas: 1) el insulto cerebral inicial o evento precipitante (traumatismos craneoencefálicos, tumores, accidentes cerebrovasculares, infecciones, crisis febriles, *status epilepticus*), 2) el período de latencia (tiempo entre el insulto cerebral y la aparición de la primera crisis epiléptica espontánea; puede durar meses o años) y 3) la fase crónica o epilepsia *per se* (Pitkänen et al., 2015; Lukawski et al., 2018).

4.4 SISTEMA LÍMBICO EN CONDICIONES NORMALES Y PATOLÓGICAS

4.4.1 ANATOMÍA

El sistema límbico es un conjunto de estructuras corticales y subcorticales localizadas en la cara medial de cada hemisferio cerebral y que rodean al diencéfalo. Dichas estructuras son: la formación hipocampal, el área subcallosa, el cíngulo, el giro parahipocampal, el área septal, el núcleo accumbens, el complejo amigdalino, los cuerpos mamilares, las formaciones olfatorias, la corteza órbito-frontal y todos aquellos fascículos de sustancia blanca que interconectan estas estructuras entre ambos hemisferios (Wilkinson, 1992; Catani et al., 2013). Describir a detalle el sistema límbico resultaría complejo y extenso. Por ello, explicaremos brevemente lo relevante para este trabajo de tesis.

La formación hipocampal es un conjunto de estructuras que se encargan de canalizar la información aferente de las áreas somatosensoriales y asociativas neocorticales hacia el giro dentado y el hipocampo. En el caso específico del hipocampo, se caracteriza por ser una prominencia de sustancia gris localizada en el piso del ventrículo lateral y dividida en 4 subáreas conocidas como *cornus ammonis* (CA1, CA2, CA3 y CA4). Esta estructura laminar a su vez también se divide en 6 estratos (*moleculare, lacunosum, radiatum, lucidum, pyramidale y oriens*) (Buhl y Dann, 1991; McDonald y Mott, 2017; Fogwe et al., 2021). Actualmente se sabe que la plurifuncionalidad del hipocampo se basa en su capacidad para establecer conexiones plásticas con regiones intra- y extra-límbicas. Sin embargo, esta característica es la que también lo implica en el proceso epileptogénico (Scharfman, 2007).

4.4.2 CONECTIVIDAD

El circuito de Papez es un conjunto de estructuras conectadas que unen al sistema límbico entre sí y con regiones extra-límbicas. El hipocampo es considerado como una estructura crucial pues representa el origen del circuito al permitir que la información multimodal procesada por la corteza entorrinal entre a

través de él y cruce a través de la vía perforante hasta llegar al giro dentado y *cornus ammonis* tras atravesar el subículo. De esta forma, las proyecciones del hipocampo y del subículo se juntan en la fimbria y viajan a través del fórnix hasta los tubérculos mamilares, los cuales se comunican con los núcleos anteriores del tálamo vía el tracto mamilotalámico. A partir de estos núcleos, las fibras tálamo-corticales ascienden por la cápsula interna hasta llegar a la corteza del giro cingular. Finalmente, el circuito continúa bajo el giro cingular, llegando hasta la corteza entorrinal del giro parahipocampal; completándose así el circuito (Figura 1). Aunque pareciera ser un circuito cerrado y unidireccional, éste también presenta conexiones extrínsecas y bidireccionales (Wilkinson, 1992; Fogwe et al., 2021). Estudios tanto clínicos como experimentales han reportado alteraciones específicas de este circuito (fórnix y cíngulo) en sujetos con epilepsia del lóbulo temporal (ELT). Es importante mencionar que otras dos vías intrahipocampales también han sido descritas en la fisiopatología de la ELT: la vía trisináptica y la vía monosináptica (Amaral y Lavenex, 2007).

El fórnix es una lámina de sustancia blanca constituida por axones mielinizados y no mielinizados. Dicha estructura se ubica sobre la cavidad del tercer ventrículo y su forma semeja una bóveda de 4 columnas. El cuerpo del fórnix se forma cuando cada columna posterior emerge de la fimbria ipsilateral, asciende, y traza una curva cóncava que se une con la columna contralateral. El cuerpo del fórnix sigue un curso subcalloso hasta curvarse y bifurcarse en su porción anterior para así formar las columnas anteriores. A nivel de la comisura anterior, cada columna se divide en dos porciones, la precomisural y la poscomisural, las cuales se dirigen hacia los núcleos septales y hacia los tubérculos mamilares, respectivamente (Chronister y Hardy, 2003; Latarjet y Ruiz-Liard, 2006).

El papel que juega el fórnix en todo el circuito cobra fuerza pues representa la principal ruta eferente del hipocampo. Las fibras eferentes glutamatérgicas que se originan de neuronas piramidales de CA1, CA3 y subículo, viajan a través de la vía precomisural hasta llegar al núcleo septal lateral (NSL) (Swanson y Cowan, 1977,

1979; Stevens y Cotman, 1986; Gaykema et al., 1991; Dutar et al., 1995; Liu y Alreja, 1998; Amaral y Lavenex, 2007; Khakpai et al., 2013). En el NSL, las neuronas GABAérgicas no son reactivas a parvalbúmina pero sí son positivas a calbindina o calretinina, es decir, las células de este núcleo expresan las proteínas calbindina o calretinina (Bjerke I.E., Yates S. C., Laja A., Witter M. P., Puchades M. A., Bjaalie J. G., and Leergaard T.B., 2021).

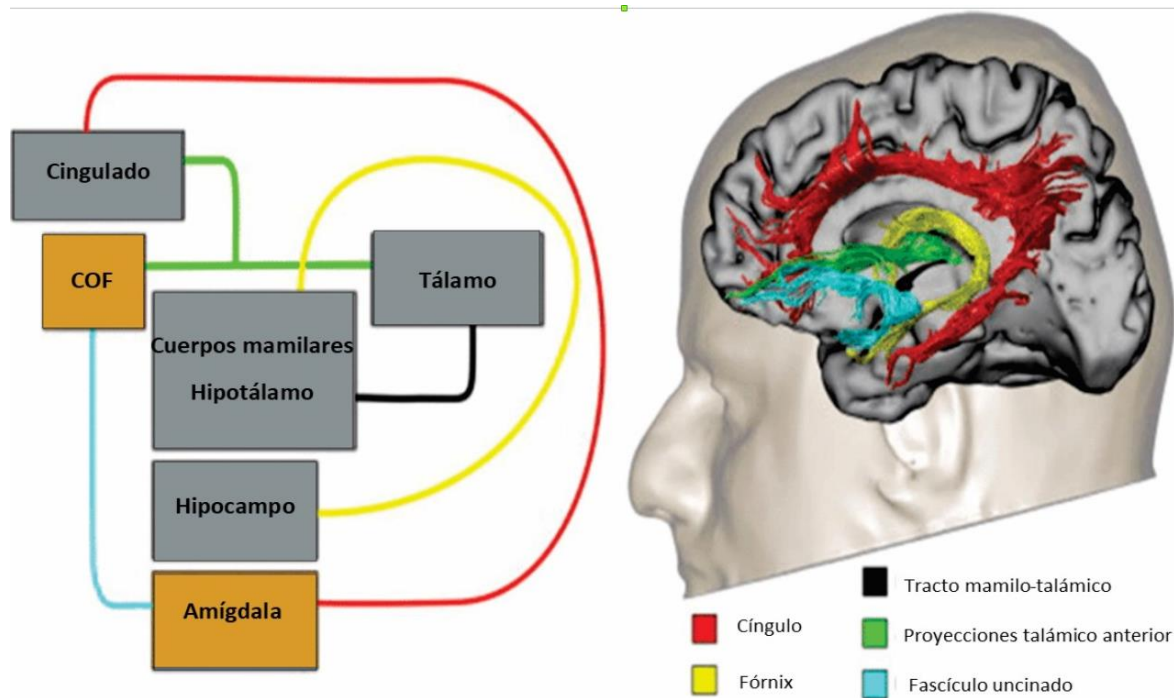


Figura 1. Conexiones del sistema límbico. Este sistema conecta estructuras intra- y extra-límbicas a través de tractos. El cíngulo se conecta a la corteza órbitofrontal (COF) y al tálamo a través de proyecciones talámicas anteriores (línea verde). La COF se conecta con la amígdala y el cíngulo a través del fascículo uncinado (línea azul). La amígdala tiene conexiones hacia el cíngulo a través del cíngulo (línea roja). El tálamo se conecta hacia el hipotálamo y los cuerpos mamilares por proyecciones talámicas anteriores; conectándose también con el hipocampo a través del fórnix. Modificado de: Wilkinson, 1992.

Posteriormente, dicho NSL envía proyecciones GABAérgicas al complejo del Núcleo Septal Medial y la Banda Diagonal del área de Broca (NSMBD), el cual está constituido por una población heterogénea de neuronas GABAérgicas, colinérgicas y glutamatérgicas (Figura 2) (Swanson y Cowan, 1979; Gaykema et

al., 1991; Liu y Alreja, 1998; Sotty et al., 2003; Colom et al., 2005, 2006; Khakpai et al., 2013; Kitchigina et al., 2013; Unal et al., 2015). Las proyecciones de este complejo constituyen las principales aferencias que viajan a través de la fimbria-fórnix hacia la formación hipocampal (Amaral y Kurz, 1985; Khakpai et al., 2013; Unal et al., 2015). Finalmente, es importante resaltar que la reciprocidad entre las conexiones del complejo NSMBD y la formación hipocampal radica en dos razones principalmente:

1. El complejo NSMBD es inervado por fibras colaterales de neuronas no piramidales ubicadas en el *stratum oriens* de CA1 y CA3 (Gaykema et al., 1991; Colom et al., 2006) y éstas conectan principalmente con neuronas septales GABAérgicas y en menor grado, colinérgicas (Toth et al., 1993).
2. Del complejo NSMBD surgen fibras colinérgicas que hacen sinapsis con neuronas piramidales e interneuronas de CA1 y CA3 (Amaral y Kurz, 1985; Frotscher y Leranth, 1985). También surgen fibras eferentes GABAérgicas que sólo se conectan con interneuronas hipocampales (Freund y Antal, 1988) y fibras glutamatérgicas que conectan con neuronas piramidales de CA3 (Colom et al., 2005; Huh et al., 2010).

En conjunto, todas estas conexiones establecen las vías septo-hipocampales (Figura 2), las cuales tienen como principal objetivo el generar y mantener la actividad eléctrica hipocampal conocida como ritmo theta (Lee et al., 1994; Buzsáki, 2002; Unal et al., 2015). En el caso específico del septum, éste se encarga de decrementar las espigas de las neuronas piramidales del hipocampo al regular las oscilaciones de la actividad neuronal y de sincronizar potenciales post-sinápticos que llegan a las células piramidales.

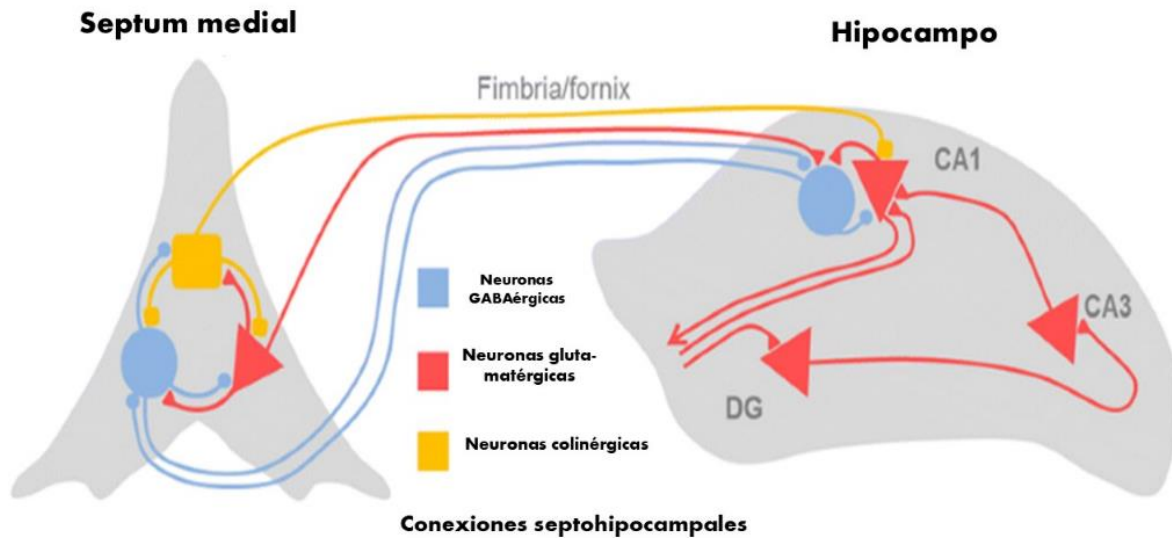


Figura 2. Conexiones de la vía septo-hipocámpal. Los cuerpos neuronales de las células GABAérgicas (azul), colinérgicas (amarillo) y glutamatérgicas (rojo) que se encuentran en el septum medial envían aferencias hacia las células glutamatérgicas de CA1, modulando la actividad de esta región. Modificado de: Müller, 2018.

4.4.3 EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL (ELT)

La ELT es la forma más frecuente de epilepsia con crisis focales secundarias a una etiología estructural. En ella, CEER se pueden originar a partir de las estructuras límbicas temporales, o bien, de regiones extra-temporales, propagándose hacia las regiones límbicas (Engel, 1996; Blair, 2012). Un alto porcentaje de estos pacientes reportan haber sufrido algún tipo de insulto cerebral durante la niñez, seguido de un período de latencia (meses o años en los que usualmente no se presenta algún síntoma), para finalmente presentar CEER durante la adolescencia o adultez temprana (Mathern et al., 1995). Este proceso sugiere la existencia de factores predisponentes que se suman a un evento precipitante que favorece la aparición de las CEER. Desafortunadamente, aunque la mayoría de los pacientes con ELT responden bien a la terapia farmacológica, 30% de ellos llegan a desarrollar farmacorresistencia (Kwan y Brodie, 2000).

La anomalía anatómica que caracteriza a la ELT es la esclerosis hipocámpal, alteración que usualmente se asocia con la refractariedad al tratamiento farmacológico (Bernasconi, 2006; Blümcke y Spreafico, 2012; Thom, 2014; Walker, 2015). Los marcadores patognómicos de la esclerosis hipocámpal incluyen pérdida segmentaria de neuronas piramidales y astrogliosis en CA1 y CA4, lo cual provoca atrofia y endurecimiento del tejido. A nivel de giro dentado se reporta una pérdida masiva de neuronas hilares asociada a la adopción de un patrón de dispersión que toman las neuronas granulares y que provoca que aumente el grosor y se difuminen los bordes de la capa granular (Sloviter, 1987; Houser, 1990; Bernasconi, 2006; Blümcke y Spreafico, 2012; Blümcke et al., 2013). Este patrón restringido del daño permite diferenciar la esclerosis hipocámpal de otras patologías como las lesiones isquémicas o hipóxicas (daño más generalizado).

Finalmente, los cambios estructurales e histopatológicos antes descritos culminarán con cambios a nivel de conectividad (Curia et al., 2014). En este sentido, Sloviter (1991) describe que la descarga excesiva y repetida de las neuronas granulares destruye a las células musgosas, las cuales hacen contactos sinápticos excitadores sobre las interneuronas GABAérgicas. De esta forma, las interneuronas perderán su impulso aferente excitador y no podrán mantener la inhibición en el giro dentado (Sloviter, 1987, 1991). Algo similar ocurre cuando las neuronas piramidales de CA3 mueren y se provoca disminución en el tono inhibitorio de las interneuronas de CA1 (Sloviter, 1991). Por lo tanto, la pérdida de células musgosas y neuronas piramidales en CA3 condicionará que las neuronas granulares pierdan sus blancos sinápticos y se facilite el surgimiento de fibras musgosas aberrantes que propiciarán circuitos excitadores recurrentes (Kuo et al., 2008).

4.5 MODELOS EXPERIMENTALES EN RATA

Los modelos animales tienen como objetivo representar las características celulares, moleculares, clínicas y fisiopatológicas de una enfermedad (Curia et al., 2008). En este trabajo usamos un modelo animal en el que es posible realizar

lesiones de poblaciones neuronales específicas mediante saporinas. Posteriormente, usamos el modelo de pilocarpina para mimetizar las características de las crisis epilépticas observadas en el humano y así poder evaluar los cambios longitudinales que ocurren durante el desarrollo de la enfermedad (Stables et al., 2002). Actualmente, existen tres consideraciones que ayudan a clasificar a los modelos experimentales de epilepsia. Éstas son: 1) la duración del protocolo para inducir las crisis epilépticas (agudo o crónico), 2) la causa de la actividad epiléptica (por sustancias químicas, estímulos físicos, alteraciones metabólicas o mutaciones genéticas), y 3) el tipo de actividad epiléptica que se genera (focales o generalizadas, corticales o límbicas, clónicas o tónicas, *status epilepticus*) (Fisher, 1989; Löscher, 2011).

4.5.1 LESIÓN DE LA VÍA SEPTO-HIPOCAMPAL MEDIANTE EL USO DE SAPORINAS

4.5.1.1 GAT1 SAPORINA (GAT1-SAP)

La síntesis del GABA se da a nivel neuronal a partir de la descarboxilación del glutamato, mediada por la enzima glutamato descarboxilasa. Una vez sintetizado, el GABA es introducido en vesículas es liberado de las terminales nerviosas pre-sinápticas. Al producirse el estímulo nervioso, el GABA se libera y llega hasta la membrana neuronal post-sináptica donde es reconocido por dos tipos de receptores: 1) los ionotrópicos GABAérgicos (GABA_A), los cuales permiten el paso de iones de Cloro, originan la hiperpolarización neuronal, y se encargan de mediar la inhibición sináptica rápida en el sistema nervioso central y 2) los metabotrópicos GABAérgicos (GABA_B), ampliamente distribuidos tanto a nivel pre-sináptico (inhibiendo canales de calcio) como a nivel post-sináptico (activando canales de potasio) (Liang et al., 2006; Eid et al., 2008).

El equilibrio en las concentraciones extracelulares del GABA se logra en buena medida gracias a la acción de los transportadores del GABA (GATs). En el caso específico de los GAT1, se encuentran localizados principalmente a nivel neuronal y son los responsables de mantener el 75% de los niveles del GABA extracelular y de activar la liberación vesicular de dicho neurotransmisor hacia las terminales

post-sinápticas (Zafar y Jabeen, 2018). Sin embargo, diversos estudios han evaluado la expresión de dichos transportadores en el tejido de pacientes con ELT refractaria, reportando disminución significativa a nivel hipocampal (During et al., 1995; Schousboe et al., 2004; Lee et al., 2006). Esto podría llegar a provocar las alteraciones reportadas en el sistema GABAérgico de pacientes con ELT farmacorresistente pues el GABA que permanece en el espacio extracelular sin ser re-capturado por los transportadores, podría ser captado por las células gliales, degradándolo a semialdehído succínico y de ahí a succinato por la acción de la enzima GABA transaminasa (Mathern et al., 1999; Liang et al., 2006; Eid et al., 2008; Mattison et al., 2018; Schijns et al., 2020).

Las saporinas son sustancias que inactivan el ribosoma de las células a través de la inhibición de la síntesis de proteínas. Por ello, al conjugarse con anticuerpos específicos son capaces de actuar sobre células específicas, provocando la muerte de dichas células y alterando el funcionamiento de las zonas aledañas a la inyección. En el caso específico de las saporinas conjugadas a los transportadores GAT1, éstas han sido utilizadas para lesionar de manera selectiva los cuerpos neuronales localizados a nivel del septum medial con el fin de inducir cambios en los procesos asociados con el correcto funcionamiento del circuito septo-hipocampal (Pang et al., 2011; Köppen et al., 2013; Roland et al., 2014a, 2014b).

4.5.1.2 192-IgG SAPORINA

La síntesis de acetilcolina se produce en el interior de las neuronas mediante la participación de la enzima colinacetiltransferasa (ChAT). Tras ello, la acetilcolina es enviada a lo largo del axón hasta el botón terminal, donde será almacenada hasta su liberación hacia el espacio sináptico. Sin embargo, una falla en la neurotransmisión colinérgica puede alterar la actividad oscilatoria rítmica theta (rango de frecuencia entre 6 y 12 Hz) y desencadenar desde trastornos de aprendizaje y memoria hasta epilepsia (Jerusalinsky et al., 1997; Kitchigina et al., 2013; Lévesque y Avoli, 2018).

Datos obtenidos a partir del tejido cerebral de pacientes con epilepsia refractaria sometidos a cirugía han mostrado actividad alterada de los marcadores enzimáticos de acetilcolinesterasa y ChAT. Además, la presencia de esclerosis hipocampal en estos pacientes altera el núcleo septal, reportándose cambios hipertróficos en la inmunoreactividad de neuronas septales a ChAT y al transportador vesicular de acetilcolina (VAChT) (Kish et al., 1988; Green et al., 1989). El estudio de la evolución de estos cambios a nivel clínico resulta complicado, por ello la relevancia del uso de modelos animales y de saporinas conjugadas a anticuerpos de células colinérgicas que sean capaces de modificar selectivamente la reorganización sináptica de regiones cerebrales específicas y en consecuencia la excitabilidad de los circuitos (Soares et al., 2019).

Diversos estudios han demostrado que el uso de la saporina 192-IgG provoca la disminución en la inmunoreactividad de células colinérgicas y de los VAChTs cuando es inyectada a nivel del septum medial e hipocampo (Rosal Lustosa et al., 2019; Soares et al., 2019). Sin embargo, cuando la saporina es inyectada a nivel hipocampal antes de someter a los animales a la inducción del *status epilepticus*, aumenta la reactividad de VAChT (Soares et al., 2019). Otros estudios han demostrado que la inyección intracerebroventricular de la saporina 192-IgG es capaz de disminuir el número de fibras colinérgicas a nivel de corteza, hipocampo y septum medial; disminuyendo al mismo tiempo la inmunoreactividad de neuronas positivas a ChAT a nivel de hipocampo dorsal y septum medial. Esto sugiere que la saporina 192-IgG es capaz de actuar en estructuras diferentes al sitio de inyección, alterando la excitabilidad de los circuitos involucrados (Silveira et al., 2002).

En general, los resultados de estos trabajos sugieren que la alteración de la actividad de AchT (Acetilcolina) dependerá del sitio de inyección y del modelo de epilepsia usado.

4.5.2 MODELO DE PILOCARPINA

El modelo de pilocarpina (agonista de los receptores muscarínicos M₁ y M₂) en roedores es considerado como un modelo isomórfico de la epilepsia del lóbulo

temporal en humanos. En él, los animales son sometidos a la administración sistémica del agente químico, provocando aumento de la excitabilidad (Segal, 1988). Dicho incremento es facilitado por la baja en la actividad de las ATPasas hipocampales, las cuales son incapaces de repolarizar la membrana neuronal y de exportar el exceso de Ca^{2+} intracelular (Fernandes et al., 1996; Funke et al., 2003). Estas concentraciones elevadas de Ca^{2+} promueven la liberación pre-sináptica de glutamato, generando desequilibrio entre la neurotransmisión excitadora e inhibidora y el desencadenamiento de las crisis epilépticas secundariamente generalizadas y el *status epilepticus*. Esta actividad epiléptica será sostenida por la acción del glutamato sobre los receptores NMDA, AMPA y kainato, lo cual favorecerá la entrada de iones Na^+ y más iones Ca^{2+} a la neurona post-sináptica. Esto a la postre provocará excitotoxicidad y muerte celular (Scorza et al., 2009). El modelo de pilocarpina está integrado por tres etapas:

1. Inducción química del *status epilepticus*. La administración sistémica del fármaco provocará alteraciones progresivas en la actividad electrográfica de áreas corticales y sub-corticales. Estas alteraciones van acompañadas de cambios conductuales como arrestos conductuales, movimientos orofaciales, guiño, movimiento de vibrisas y salivación. Estas conductas serán observadas por un determinado período de tiempo hasta la aparición de crisis motoras límbicas caracterizadas por salivación intensa, movimientos clónicos de cabeza y extremidades, adopción de una postura de canguro y finalmente, movimientos tónico-clónico generalizados que provoquen las caídas repetidas de los animales (Racine, 1972; Turski et al., 1983). Estas crisis motoras límbicas progresarán hasta alcanzar y establecer el *status epilepticus* (Cavalheiro, 1995).
2. Período de latencia que puede durar de 7 a 15 días. Inicia con la terminación del *status epilepticus* y finaliza con la aparición de la primera CEER (Cavalheiro et al., 1991). En esta etapa, los animales no suelen presentar actividad conductual atípica (Cavalheiro et al., 1991; Cavalheiro, 1995) pero se inician una serie de cambios epileptogénicos que culminan con la aparición de la primera crisis epiléptica no provocada. Esto sugiere

que se ha consolidado un circuito de actividad hiperexcitable (Dalby y Mody, 2001; Pitkänen y Sutula, 2002).

3. Período crónico. Caracterizado por la ocurrencia de CEERs. Esta etapa está integrada por la fase crónica temprana (abarca entre los 20 y los 30 días posteriores a la inducción química) y crónico tardía (considerada a partir de los 60 días post-inducción) de la enfermedad. Observándose un incremento en cuanto a la frecuencia y severidad de las CEERs que presenten los animales al paso del tiempo (Soukupova et al., 2014).

4.6 IMÁGENES CON TENSOR DE DIFUSIÓN EN EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL (ELT)

La Imagenología por Resonancia Magnética (IRM) es una técnica no invasiva, crucial en el diagnóstico y detección de lesiones asociadas a ELT (edemas, microhemorragias, esclerosis, reducción en el volumen de regiones cerebrales específicas, entre otras) (Kuzniecky y Jackson, 2004). Sin embargo, también ha sido ampliamente utilizada como una herramienta que permite la identificación *in vivo* de biomarcadores microestructurales asociados a las diferentes etapas que integran a la epileptogénesis. Esto facilitaría la identificación temprana de características anómalas específicas que puedan predecir el grado de desarrollo de la enfermedad y anticipar intervenciones terapéuticas oportunas (Reddy et al., 2019; Sidhu et al., 2018).

Las imágenes de difusión en resonancia magnética están basadas en la medición del movimiento Browniano, es decir, el movimiento aleatorio de las moléculas del agua en un vóxel. Este concepto se basa en el hecho de que las moléculas se dispersan con el tiempo, alejándose del punto inicial en forma simétrica, disminuyendo su concentración del punto de partida y alcanzando mayores distancias. Este espacio se puede medir mediante la cuantificación de un radio promedio que se interpreta como un coeficiente de difusión ($D = \text{cm}^2/\text{s}$). Dicho coeficiente es una propiedad intrínseca del medio y su valor está determinado por

el tamaño de las moléculas, la temperatura, y los factores microestructurales del ambiente. En el caso de la resonancia magnética, ésta puede ser sensible a dichos desplazamientos del agua pues la agitación de sus moléculas es capaz de cambiar la orientación de los giros o “spins”. El resultado será que los giros nucleares difundirán hacia otras regiones con campos magnéticos distintos, originando cambios en la frecuencia de relajación y pérdida en la intensidad de la señal. Esta intensidad está directamente influenciada por el cambio en el valor B, es decir, la media de desplazamiento en el tiempo (entre más alto sea el valor de B, las moléculas se moverán libremente por más tiempo y la señal será menos intensa y viceversa).

Las imágenes con tensor de difusión (DTI, por sus siglas en inglés) se desarrollaron a partir de la difusión por resonancia magnética. Actualmente constituyen un método cuantitativo que permite inferir la microestructura de los fascículos nerviosos basándose en el nivel de anisotropía (muchas moléculas de agua que se mueven en una sola dirección dadas las barreras que restringen su libre movimiento) que presentan (entre más anisotrópico, mayor la coherencia estructural que muestran los axones). Esta herramienta ha permitido revelar alteraciones microestructurales a nivel de los tractos de sustancia blanca cerebral antes de que éstos se vuelvan evidentes en escaneos convencionales (Basser et al., 1994; Pierpaoli et al., 1996; Beaulieu, 2002; Walhovd et al., 2014). Por muchos años se consideró que la ELT era un trastorno esencialmente relacionado con sustancia gris. Sin embargo, las imágenes con tensor de difusión evidenciaron que también existen alteraciones a nivel de la sustancia blanca del sistema límbico y en estructuras distantes a dicho sistema (Concha et al., 2005, 2010). Esto modificó la perspectiva de la enfermedad, re-direccionándola hacia un enfoque más global y menos focalizado. Clínicamente, esta herramienta ha sido muy útil para monitorear los cambios estructurales de manera longitudinal mediante la inferencia de la citoarquitectura a través del registro del movimiento aleatorio de las moléculas de agua. A nivel del fórnix (descrito anteriormente como un fascículo con aferencias y eferencias hipocampales) se han reportado anomalías bilaterales en los parámetros de difusión, reducción en la fracción de anisotropía e

incremento en la difusividad perpendicular (Concha et al., 2005, 2007, 2009, 2010; Reddy et al., 2019). Estudios realizados en modelos animales han reportado que aquellos sujetos que desarrollan crisis epilépticas espontáneas recurrentes tras un insulto cerebral inicial presentan anomalías en fórnix e hipocampo similares a las descritas en humanos (Parekh et al., 2010; Wang et al., 2017; Reddy et al., 2019; Luna-Munguia et al., 2021). Esto sugiere que dichas alteraciones pudieran representar un factor predisponente para el desarrollo posterior de la ELT. En este sentido, van Eijsden et al. (2011) proponen que dichos cambios pudieran representar una fase temprana del proceso patogénico de la epilepsia crónica. Algunos estudios se han enfocado en determinar cuáles son los elementos celulares que contribuyen en la determinación de las diferentes magnitudes que se observan en los parámetros de difusión, destacándose no sólo los axones mielinizados sino también los procesos astrocíticos (Ye et al., 2013; Salo et al., 2017).

5. JUSTIFICACIÓN

Alrededor de 60 millones de personas sufren epilepsia a nivel mundial. Específicamente, la epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es el tipo de epilepsia más frecuente y el más relacionado a la farmacoresistencia. Este trastorno se ha asociado a factores predisponentes que ocurren en etapas tempranas de la vida del individuo. Posteriormente, se describe un período de latencia carente de manifestaciones clínicas durante el cual se van desarrollando los mecanismos epileptogénicos que culminarán con la aparición de la primera crisis epiléptica espontánea recurrente y la instauración de la enfermedad. Una de las explicaciones que contribuyen al proceso epileptogénico en la ELT involucra desbalance en la neurotransmisión excitadora e inhibidora originado por fallas en el funcionamiento de las proyecciones septo-hipocampales. Esto sugiere que la vía septo-hipocampal juega un papel muy importante en el disparo de ráfagas epileptiformes que a la postre alteren las conformaciones microestructurales de la sustancia blanca y gris de ciertas regiones límbicas y extra-límbicas. En humanos resulta complicado dar un seguimiento pues generalmente el paciente llega con la enfermedad establecida. Por ello, la relevancia de los modelos animales y de las técnicas no invasivas de IRM con capacidades inferenciales de la microestructura tisular. Esto nos permitirá evaluar y caracterizar longitudinalmente las anomalías anatómicas que aparezcan tras la lesión selectiva del septum medial y determinar la susceptibilidad que presenten los animales tras dicha lesión al ser expuestos al modelo de pilocarpina.

6. HIPÓTESIS

La lesión selectiva de las conexiones GABAérgicas o colinérgicas localizadas a nivel de septum medial inducirá cambios microestructurales de regiones límbicas y extra-límbicas capaces de ser detectadas por IRM sensible a difusión. La lesión de la vía septo-hipocampal incrementará la susceptibilidad de los animales a desarrollar el *status epilepticus* inducido por pilocarpina.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar longitudinalmente los efectos de la lesión selectiva de la vía septo-hipocampal.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los efectos de la lesión selectiva de las interneuronas GABAérgicas localizadas a nivel del septum medial.
 - Analizar los cambios microestructurales que ocurren en componentes tanto de sustancia blanca como de sustancia gris de regiones límbicas y extra-límbicas.
 - Determinar los cambios en la susceptibilidad de los animales para desarrollar el *status epilepticus* inducido por pilocarpina.
 - Evaluar el grado de lesión inducido en el septum medial mediante la técnica de inmunohistoquímica.

2. Evaluar los efectos de la lesión selectiva de las interneuronas colinérgicas localizadas a nivel del septum medial.
 - Analizar los cambios microestructurales que ocurren en componentes tanto de sustancia blanca como de sustancia gris de regiones límbicas y extra-límbicas.
 - Determinar los cambios en la susceptibilidad de los animales para desarrollar el *status epilepticus* inducido por pilocarpina.
 - Evaluar el grado de lesión inducido en el septum medial mediante la técnica de inmunohistoquímica.

3. Identificar biomarcadores estructurales que puedan estar asociados al proceso epileptogénico.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 38 días de edad al inicio del estudio, provenientes del Bioterio del Instituto de Neurobiología (INB). Los animales tuvieron agua y comida *ad libitum* y fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (20-22°C) y humedad (50-60%) en una habitación dentro del bioterio que contaba con ventilación y ciclos normales luz/oscuridad de 12 horas. El cuidado y manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del INB (Protocolo CICUAL 105A).

8.2 ADQUISICIÓN DE IMÁGENES *IN VIVO* POR RESONANCIA MAGNÉTICA

Los protocolos de escaneo fueron llevados a cabo en un resonador para especies pequeñas Bruker de 7 Teslas (Biospec 70/16) conectado a una consola con software Paravision 6.0.1 integrado (Bruker, Alemania). El magneto está equipado con un arreglo de gradientes de 9 cm., capaces de generar una fuerza de gradiente máxima de 760 mT/m. Para la detección de la señal y la transmisión de pulsos de radiofrecuencia, se usó una antena de superficie 2x2 de recepción única y una antena de volumen, respectivamente. Los animales se anestesiaron con una mezcla de isoflurano (4%) - oxígeno a un flujo de 2.5 l/min. Una vez corroborada la sedación, los animales fueron colocados sobre un riel que cuenta con un marco con fijación y les fue suministrada una dosis de mantenimiento anestésico (mezcla de isoflurano (2%) - oxígeno) a un flujo similar al de la inducción. Durante el escaneo, los animales fueron colocados dentro del magneto, razón por la cual debieron mantenerse en normotermia (37°C) mediante un sistema de recirculación de agua caliente bajo el sujeto. Todas las ratas tuvieron monitoreo del ritmo cardiaco, la frecuencia respiratoria y la saturación de oxígeno.

Los cambios microestructurales que fueron ocurriendo a lo largo del estudio fueron evaluados a través de una secuencia eco-planar pesada a difusión con los siguientes parámetros: TR = 2250 ms, TE = 31.32 ms, 4 promedios, δ = 2.9 ms, Δ = 8.7 ms, 6 volúmenes no sensibles a difusión ($b = 0$ s/mm²) y volúmenes con sensibilización a difusión en 40 direcciones no colineales y no coplanares, para dos valores de b ($b = 650$ y 2000 s/mm²). La imagen obtenida tuvo una resolución de 133×135 μm y un grosor de rebanada de 750 μm . En la misma sesión, también se obtuvieron imágenes anatómicas con contraste T2, utilizando una secuencia eco de gradiente con ángulo limitado (FLASH, por sus siglas en inglés) y con una resolución isométrica de 100 μm por lado. La sesión completa de adquisición de imágenes, para ambas secuencias, tuvo una duración de 20 minutos. La primera adquisición de imágenes se hizo en animales de 38 días de edad (P38).

8.3 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA PARA LA MODULACIÓN DE LA VÍA SEPTO-HIPOCAMPAL

Seis días después del escaneo basal, los animales (P44) fueron asignados aleatoriamente en uno de los siguientes grupos (Figura 3):

1. Grupo Control ($n = 16$). Estos animales no fueron sometidos a algún tipo de procedimiento quirúrgico.
2. Grupo PBS 0.1 M ($n = 16$). Cada animal recibió 1.2 μl de PBS 0.1 M a un flujo de 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$.
3. Grupo saporina GABAérgica ($n = 22$)(GAT1-SAP; Advanced Targeting Systems). La saporina fue disuelta en PBS 0.1 M. Cada animal recibió 1.2 μl de dicha solución a una concentración de 325 ng/ μl (Pang et al., 2011; Roland et al., 2014a, 2014b) a un flujo de 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$.
4. Grupo saporina colinérgica ($n = 20$) (192-IgG SAP; Advanced Targeting Systems). Esta saporina también fue disuelta en PBS 0.1 M. Cada animal

recibió 1.2 μl de dicha solución a una concentración de 375 ng/ μl (Ferencz et al., 2000, 2001) a un flujo de 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Aquellos animales sometidos al procedimiento quirúrgico, fueron anestesiados con una combinación de ketamina-xilazina (100 y 20 mg/kg, respectivamente; i.p.). Posteriormente, se les montó sobre el estereotáxico y se les realizó un trépano craneal a nivel de septum medial de acuerdo a las siguientes coordenadas con referencia a bregma y a la superficie craneal: anteroposterior = 0.1 mm; lateral = -2 mm; profundidad = -6.8 mm; ángulo de inclinación de 20°. Es importante resaltar que estas coordenadas se basaron en pruebas previamente hechas dentro del laboratorio acorde al tamaño de los animales que se iban a utilizar. La inyección del líquido correspondiente se hizo a través de una jeringa Hamilton de 5 μl acoplada a una bomba de infusión conectada a un controlador digital (Micro4 MicroSyringe Pump Controller, WPI). Finalizada la inyección, la aguja se retiró paulatinamente, se suturó la incisión, y los animales se dejaron en un período de recuperación post-quirúrgico de 10 días. La segunda adquisición de imágenes se hizo en animales de 54 días de edad (P54).

8.4 STATUS EPILEPTICUS INDUCIDO POR PILOCARPINA

Cuarenta y ocho horas después del segundo escaneo, las ratas (P56) fueron sometidas al modelo de pilocarpina (Turski et al., 1983; Leite y Cavalheiro, 1995; Luna-Munguia et al., 2017). Para ello, a todos los animales se les administró sulfato de atropina (5 mg/kg; i.p.) 20 minutos antes de inyectar la pilocarpina (340 mg/kg intraperitonealmente a 8 animales del grupo Control y PBS, a 14 animales del grupo saporina GABAérgica y a 12 animales del grupo saporina colinérgica) o el volumen equivalente de solución salina (i.p.; aplicada al resto de los animales que integran cada grupo). Aquellos sujetos que no desarrollaron actividad convulsiva en los 50 minutos posteriores a la dosis inicial de pilocarpina, se les inyectaron dosis adicionales de 170 mg/kg (i.p.) cada 50 minutos hasta desarrollar el *status epilepticus*. La progresión de la actividad convulsiva se evaluó con base en los cambios conductuales descritos por Racine (1972). El *status epilepticus* se mantuvo por 90 minutos y se interrumpió con una inyección de diazepam (10

mg/kg; i.p.). En caso de no ceder la actividad convulsiva, se les aplicó una segunda dosis de 5 mg/kg (i.p.). Con respecto a los animales control, éstos recibieron la inyección de diazepam 2 horas después de haber recibido la inyección de solución salina.

Los animales que recibieron la inyección de pilocarpina y desarrollaron el *status epilepticus* se mantuvieron en un período de recuperación de 7 días. Durante esta semana, los animales consumieron suplementos alimenticios y fueron alojados en un cuarto con humedad y temperatura controladas dentro de la Unidad de Análisis Conductual del INB. Al octavo día se inició la videograbación continua de las ratas por 2 semanas con el fin de garantizar que los animales presentaran crisis epilépticas espontáneas recurrentes y poder evaluar el número y la severidad de las crisis convulsivas que presentara cada sujeto. Los animales regresaron al cuarto de videograbación 64 días después del día de la inducción del *status epilepticus* y fueron grabados ininterrumpidamente por una semana.

La tercera y la cuarta adquisición de imágenes de todos los animales se hizo a los siguientes tiempos (Figura 3):

- 1) Día 80 de edad (P80). Las imágenes fueron adquiridas 24 días después de la inducción del *status epilepticus*. Este momento corresponde a la etapa crónica temprana del desarrollo de la epilepsia en los animales sometidos al modelo de pilocarpina (Soukupova et al., 2014).
- 2) Día 120 de edad (P120). Las imágenes fueron adquiridas 64 días después de la inducción del *status epilepticus*. Este momento corresponde a la etapa crónica tardía del desarrollo de la enfermedad en estos animales (Soukupova et al., 2014).

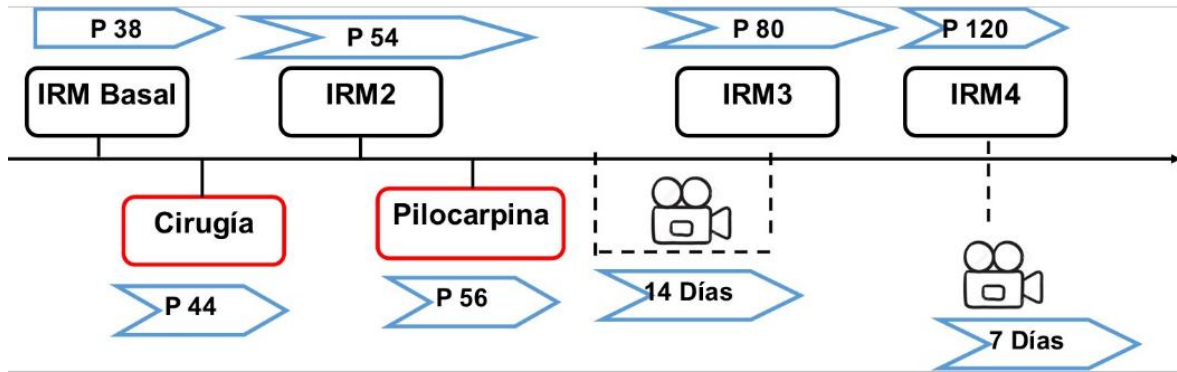


Figura 3. Esquema que ilustra el protocolo temporal de este trabajo de tesis. Los animales son escaneados por primera vez a los 38 días de edad y perfundidos para la extracción del cerebro a los 128 días de edad.

8.5 PRE-PROCESAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN

Las imágenes crudas pesadas a difusión requieren ser sometidas a un proceso de pre-procesamiento, el cual se encarga de corregir los artefactos derivados de la adquisición y de mejorar la calidad de la señal. Todas las imágenes fueron procesadas fuera de línea mediante el uso del software de acceso libre MRtrix versión 3.0 (Brain Research Institute, Melbourne, Australia). Dicho pre-procesamiento consistió en:

1. Convertir los archivos al formato .mif para habilitar las funciones de Mrtrix.
2. Reducir el ruido y mejorar la relación señal/ruido; esto se logra al suprimir las fluctuaciones de la señal secundarias a factores térmicos y anatómicos (Veraart et al., 2016a, 2016b).
3. Corregir los artefactos de movimiento generados por la respiración del animal y las propias vibraciones del resonador, así como las distorsiones secundarias a las corrientes de Foucault generadas por variaciones del campo magnético de los gradientes (uso de la herramienta `eddy_correct` (biblioteca de FSL 5.0.10)) con el fin de estimar la transformación afín óptima aplicada a cada volumen de difusión (Andersson y Sotiropoulos, 2016).

4. Corregir la inhomogeneidad de la intensidad de la señal para eliminar las variaciones en la intensidad de la señal sin relevancia anatómica derivadas del uso de una antena de superficie (Belaroussi et al., 2006).

Una vez que las imágenes están corregidas, se realizó el procesamiento de los datos con el modelo de tensor (Basser et al., 1994). Este modelo permite la cuantificación de la difusión en cualquier dirección vóxel a vóxel y que el comportamiento estocástico de la difusión de moléculas de agua se ordene en una matriz 3 x 3 (donde los 3 valores diagonales representan coeficientes de difusión a lo largo de los 3 ejes principales (x, y, z) del marco de referencia de laboratorio). Los 6 valores fuera de esta diagonal corresponden a correlaciones de movimientos aleatorios entre combinaciones de las direcciones principales. Además, el modelo se representa geoméricamente como una elipse, donde la magnitud de sus ejes principales es determinada por los valores propios ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) equivalentes a los coeficientes de difusión principales y su orientación resulta de los vectores propios (V_1, V_2, V_3) obtenidos a partir de las direcciones preferenciales de la difusión en cada plano ortogonal. A través del uso de los valores propios, se derivaron los mapas de fracción de anisotropía.

8.6 SELECCIÓN DE REGIONES DE INTERÉS Y ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE DIFUSIÓN

Las regiones de interés evaluadas corresponden a algunas de las áreas cerebrales que integran la vía septo-hipocampal y que se sabe presentan un daño considerable en sujetos con epilepsia del lóbulo temporal (Turski et al., 1983; Concha et al., 2009; Parekh et al., 2010; Curia et al., 2014; Salo et al., 2017). El delineado de dichas regiones de interés se hizo manualmente, tomando como referencia los límites anatómicos demarcados para cada estructura y ayudándonos del contraste T2 en los volúmenes no sensibles a difusión, de la escala de grises en el mapa de fracción de anisotropía, y del color en el mapa V_1 . Es importante resaltar que durante el delineado manual no se incluyeron los

vóxeles que se encontraban en los límites de cada estructura, con el fin de evitar efectos de volumen parcial. Las regiones de interés analizadas en este trabajo fueron: septum medial, fimbria e hipocampo dorsal.

Para la obtención de los valores de la fracción de anisotropía, se cuantificaron los promedios de dicha métrica de difusión, aplicando las regiones de interés sobre los respectivos mapas y tomando en cuenta todos los vóxeles contenidos en las regiones delimitadas.

8.7 PREPARACIÓN DEL TEJIDO Y ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Veinticuatro horas después de finalizado el último día de videograbación, todos los animales fueron inyectados con una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico y perfundidos con solución salina y posteriormente con una solución de paraformaldehído al 4% (pH 7.4). El cerebro fijado fue removido y sumergido en un vaso estéril con solución fresca de paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Al día siguiente, los cerebros fueron movidos a vasos estériles con solución de sacarosa al 20%; los cerebros tardaron en precipitar entre 24 y 48 horas. Una vez hallados en el fondo del contenedor, fueron movidos a un nuevo vaso estéril con solución de sacarosa al 30%; los cerebros tardaron en precipitar dos días aproximadamente. Los cerebros fueron congelados con hielo seco y almacenados a -70°C hasta el día en que serían utilizados para:

- 1) Determinación del sitio de inyección. Se determinó realizando cortes coronales de 60 micras de grosor a nivel del septum medial (acorde al atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson, 2009). Los cerebros fueron cortados en crióstato a -20°C y las rebanadas se montaron en portaobjetos con el fin de someterlas a la tinción de Nissl.
- 2) Inmunohistoquímica. Para comprobar el grado de lesión que provocó cada una de las saporinas selectivas usadas en este trabajo, los cerebros fueron

cortados en crióstato a nivel del septum medial y las rebanadas de 20 micras de grosor se colectaron por técnica de flotación en pocillos con PBS 1X. Es importante resaltar que a partir de este momento, todos los procedimientos se realizaron bajo agitación constante a 4°C. Primero, las rebanadas fueron lavadas con PBS 1X por 5 minutos; luego fueron lavadas 10 minutos con PBS + Tween (0.01%). Posteriormente, se sumergieron en solución de bloqueo con BSA + Tritón (2% y 1%, respectivamente) durante 45 minutos. Pasado este tiempo se realizó la incubación en el anticuerpo primario durante 24 horas (Anti-PV mouse monoclonal 1:500 para las saporinas GABAérgicas; Anti-ChAT mouse 1:500 para las saporinas colinérgicas). Pasadas las 24 horas, se realizaron 5 lavados con PBS + Tween cada 10 minutos; al finalizar, se hizo la incubación con anticuerpos secundarios fluorescentes (Alexa 488 para PV y Alexa 555 para ChAT) durante 4 horas. Luego, se realizaron 5 lavados con PBS + Tween y bloqueo con BSA + Tritón por 45 minutos; después se llevó a cabo la incubación con el segundo marcaje (aquí se invirtieron los anticuerpos, es decir, las rebanadas que habían sido incubadas con Anti-PV fueron incubadas con Anti-ChAT y viceversa) durante 22 horas. Finalmente, se realizaron 5 lavados y la incubación con las fluorescencias, también invertidas, además del marcaje con DAPI (1:200) para marcar los cuerpos neuronales.

8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

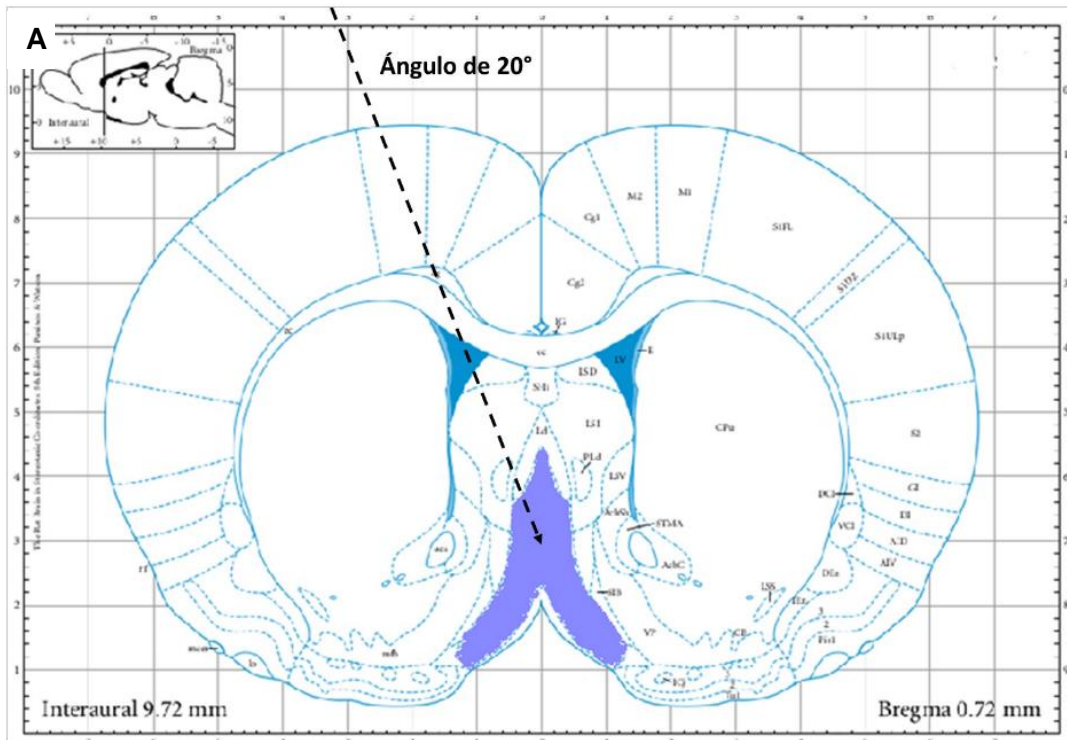
Aplicación de pruebas *t* pareadas para determinar si había diferencias entre el lado izquierdo y derecho de las tres regiones de interés evaluadas. Al no observar cambios significativos, se promediaron los valores de ambos lados y cada región se describió como una entidad. Los datos resultantes fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar su distribución. La progresión en los cambios de la fracción de anisotropía se evaluó mediante ANOVA de medidas repetidas de dos vías y con dos factores (tiempo y tratamiento). La prueba *post-hoc* de Sidak fue aplicada para comparar las variaciones entre las distintas mediciones. Los

datos fueron analizados con el programa Rstudio (versión 3.6.3) y se presentaron como la media \pm desviación estándar. Se consideraron significativas las diferencias con $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1 DETERMINACIÓN DEL SITIO DE INYECCIÓN

La Figura 4A muestra el esquema coronal a nivel de septum medial del cerebro de la rata tomado del atlas de Paxinos y Watson (2009). La evaluación histológica mostró que el extremo inferior de la aguja se localizó en la región deseada (Figura 4B). Esto nos permite asumir una adecuada inyección tanto de saporinas como de PBS en cada uno de los animales evaluados.



B

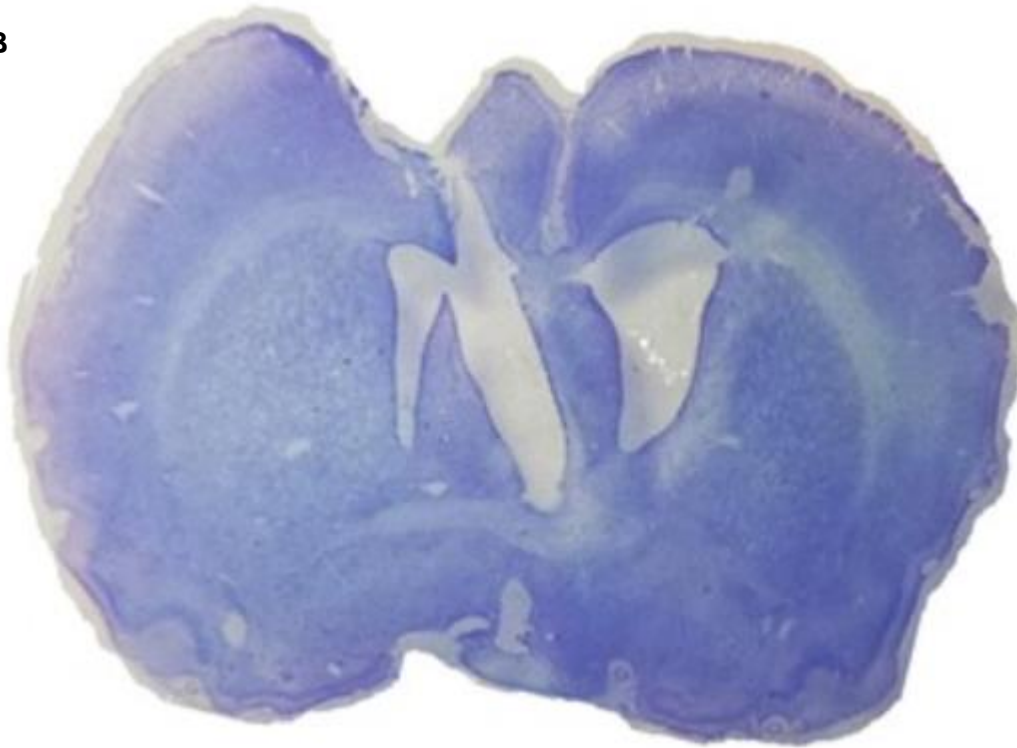


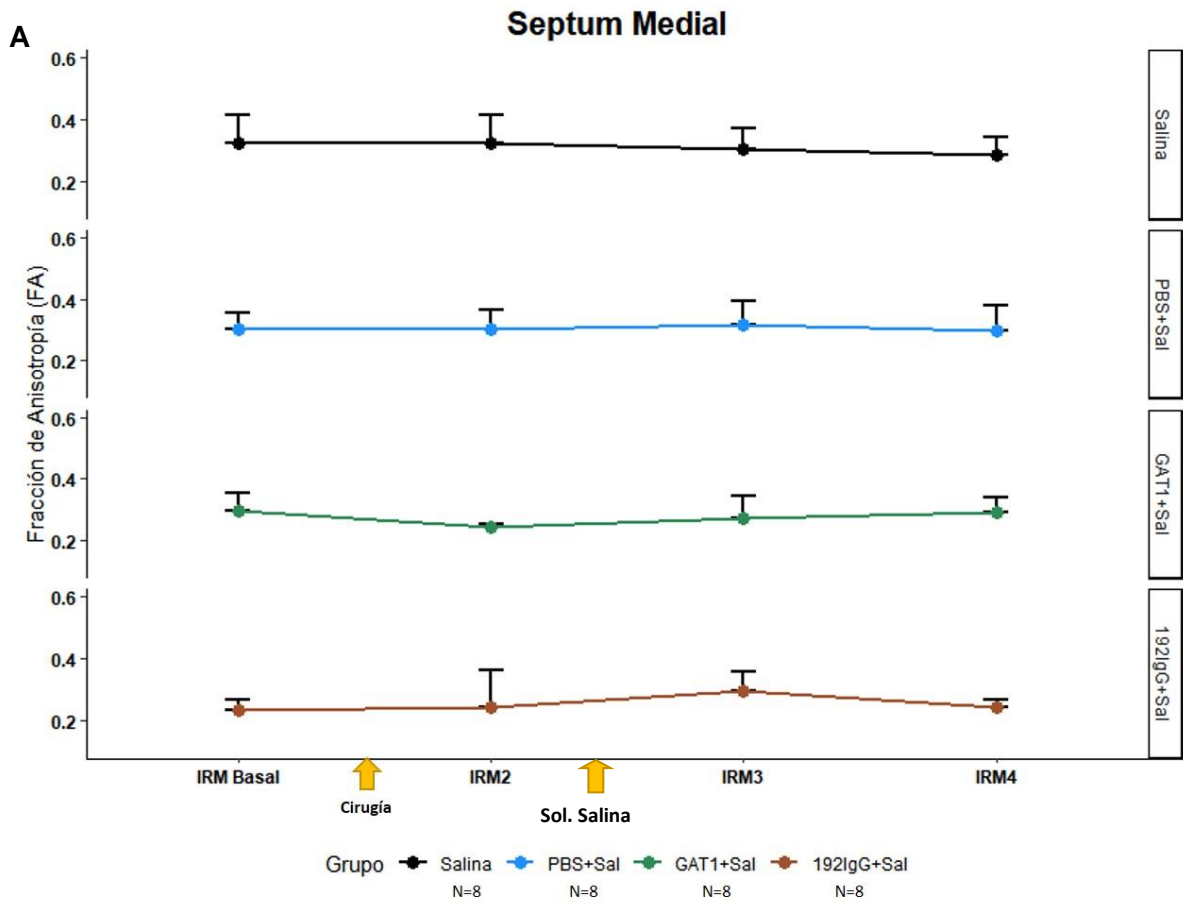
Figura 4. (A) La flecha punteada muestra la trayectoria del sitio de inyección dentro de un esquema coronal tomado del atlas de Paxinos y Watson (2009). Importante resaltar el ángulo de inclinación de 20° para alcanzar la región del septum medial. **(B)** La tinción de Nissl confirma que las coordenadas usadas para la localización del septum medial en animales de 44 días de edad, son las correctas.

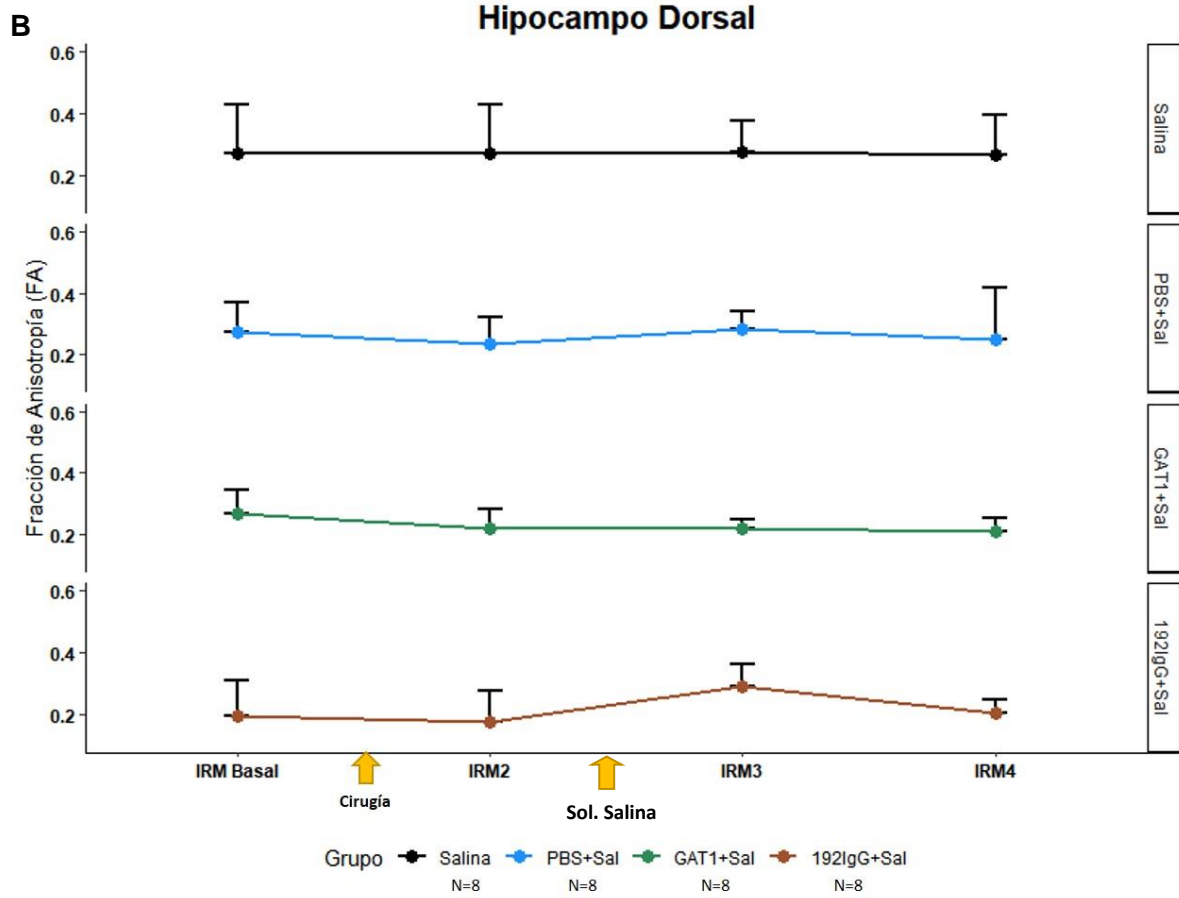
9.2 CAMBIOS LONGITUDINALES EN LA FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA (FA) DERIVADOS DE LAS IMÁGENES ADQUIRIDAS *IN VIVO*

9.2.1 GRUPOS CONTROL

La fracción de anisotropía (FA) es un índice de asimetría de la difusión asociado a coherencia estructural. En el caso de los animales que recibieron la inyección de cualquiera de las dos saporinas (GAT1-SAP (saporina GABAérgica) y 192-IgG (saporina colinérgica)), el septum medial (región donde se llevó a cabo la administración) no mostró cambios significativos con respecto a los animales que recibieron el vehículo (PBS 0.1M) o que no fueron sometidos al procedimiento quirúrgico. Es importante resaltar que los valores de FA en septum medial de los cuatro grupos tampoco presentaron variaciones significativas a lo largo del tiempo (Figura 5A). Los valores graficados para hipocampo dorsal representan el promedio de la FA del hipocampo dorsal derecho e izquierdo pues al comparar ambos lados no se apreciaron diferencias significativas entre ellos (Figura 5B). Lo mismo sucede con la gráfica de fimbria (Figura 5C). Al analizar los datos de hipocampo dorsal, éste no mostró cambios significativos entre grupos; tampoco a lo largo del tiempo (Figura 5B). Similar a lo observado en las otras dos regiones evaluadas, la FA de la fimbria no tuvo cambios entre grupos, aunque sí se observó un incremento significativo en los cuatro grupos evaluados al comparar IRM Basal vs IRM4 (Salina ↑22%, PBS + Salina ↑22%, GAT1 + Salina ↑16% y 192IgG + Salina ↑21%) (Figura 5C).

Estos resultados muestran que la inyección de cualquiera de las dos saporinas, así como de su vehículo, no alteran la microestructura de septum medial e hipocampo dorsal a lo largo del tiempo. En el caso de la fimbria, el incremento observado puede atribuirse al desarrollo normal de los animales.





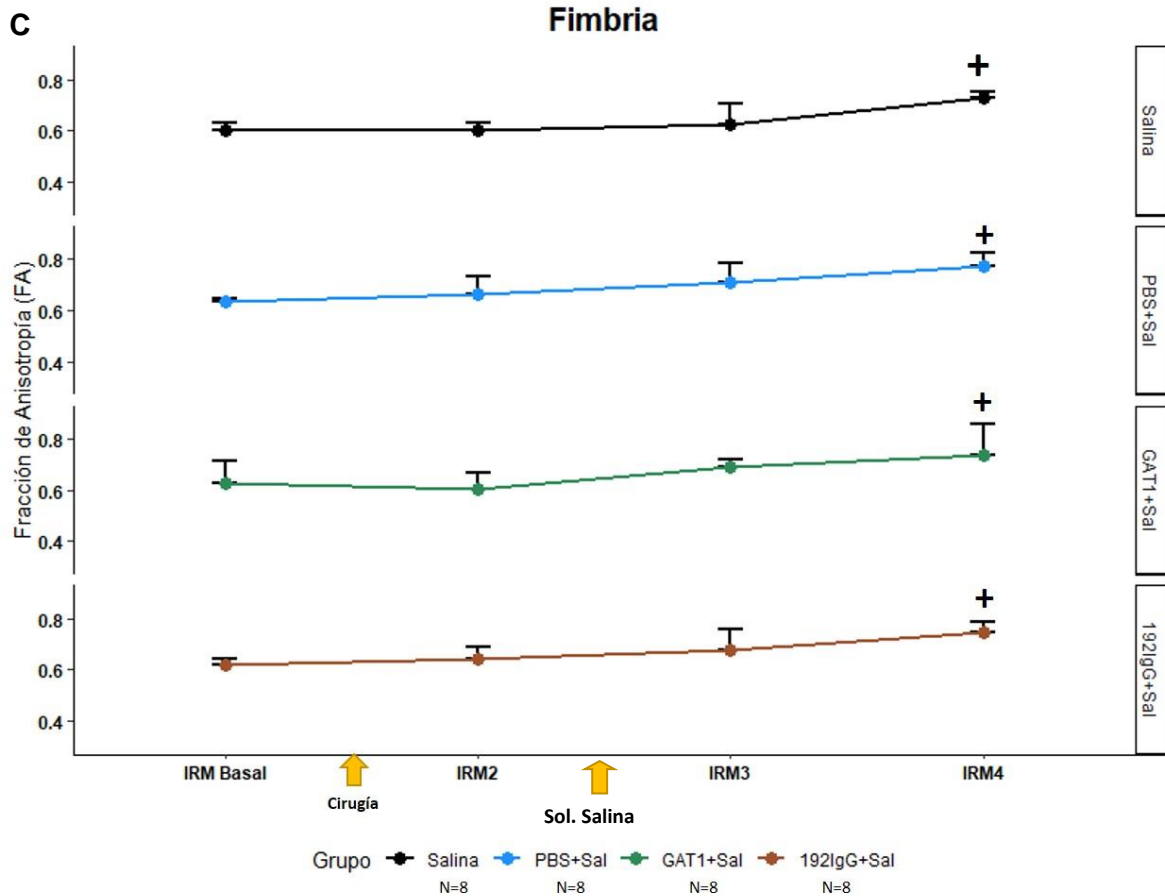


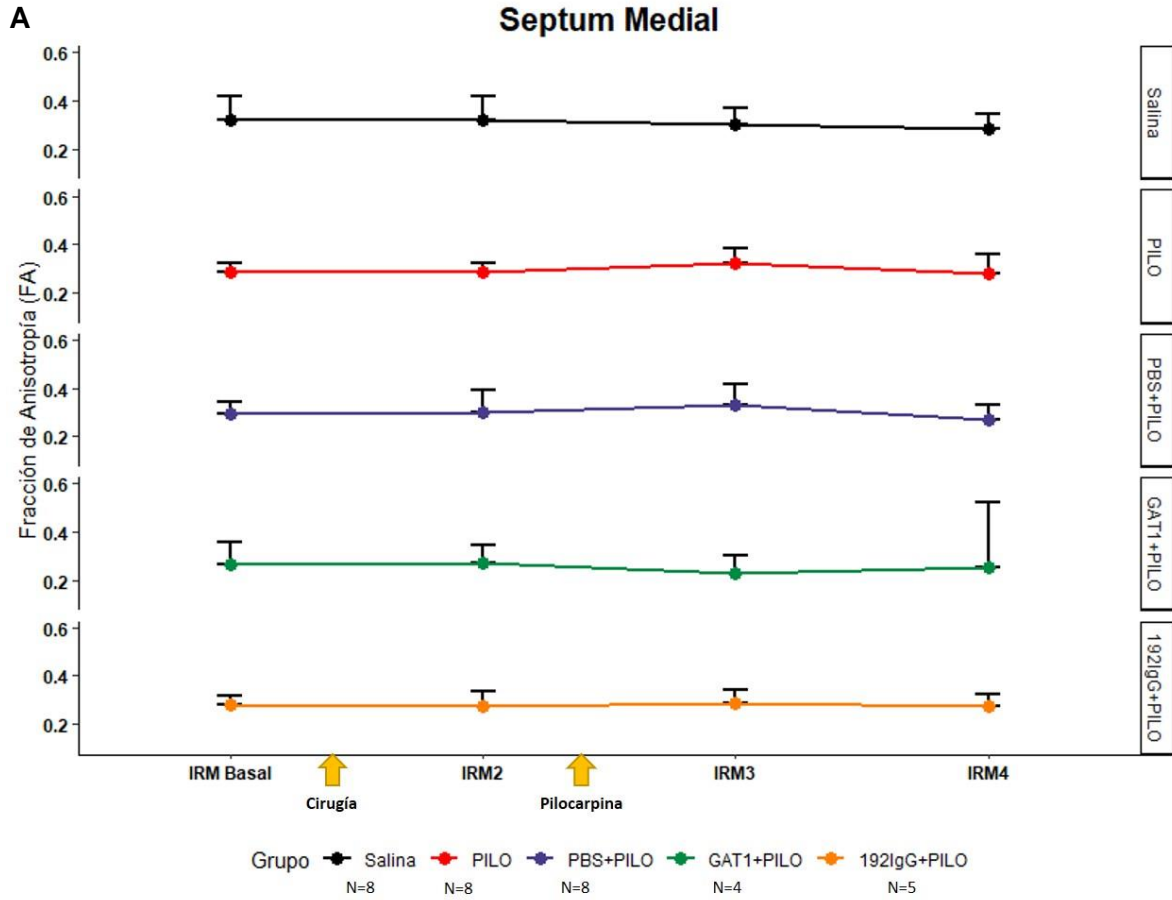
Figura 5. Cambios longitudinales en la fracción de anisotropía (FA) de estructuras de sustancia blanca (septum medial (A) y fimbria (C)) y sustancia gris (hipocampo dorsal (B)) de los cuatro grupos Control, es decir, aquéllos que no fueron sometidos a la inyección de pilocarpina. La comparación entre grupos de las tres regiones cerebrales evaluadas no muestra diferencias significativas entre ellos en ninguno de los cuatro puntos temporales evaluados. Sólo la fimbria (C) muestra diferencia significativa en los cuatro grupos al comparar el primer y el último escaneo ($+ p < 0.05$). La primera flecha indica el momento de la cirugía (evento no aplicable para el grupo Salina pues este grupo no fue sometido a procedimiento quirúrgico alguno). La segunda flecha indica el momento de la inyección de solución salina (evento aplicable para los cuatro grupos).

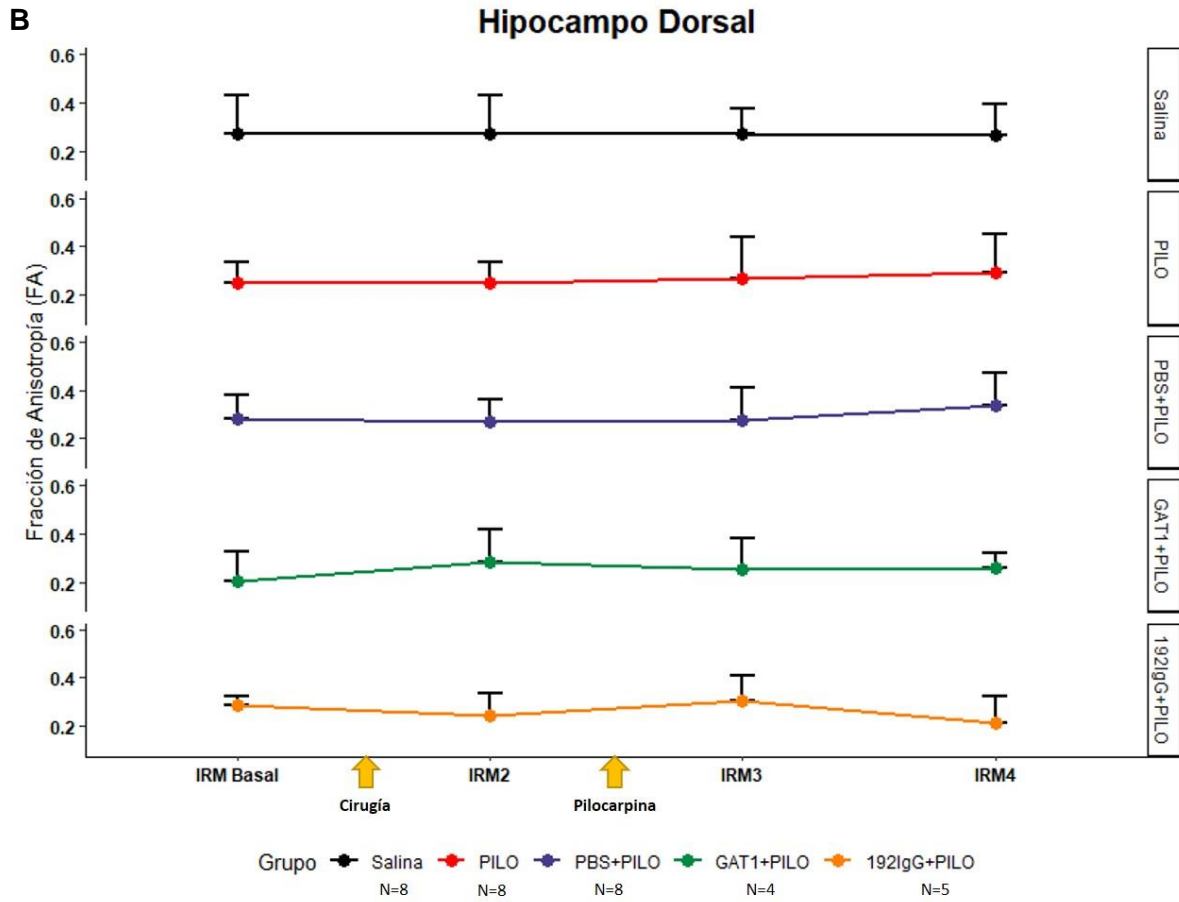
9.2.2 GRUPOS SOMETIDOS A LA INDUCCIÓN DE *STATUS EPILEPTICUS* POR PILOCARPINA

En el caso de los animales epilépticos que recibieron la inyección de cualquiera de las dos saporinas (GAT1-SAP (saporina GABAérgica) y 192-IgG (saporina colinérgica)) previo a la inducción del *status epilepticus*, el septum medial no mostró cambios significativos con respecto a los animales que recibieron la inyección de PBS 0.1M (vehículo) o que no fueron operados; la falta de cambios también se observó al evaluar cada grupo a lo largo del tiempo. Es importante resaltar que incluso al comparar los valores de la FA en el septum medial de los cuatro grupos epilépticos con respecto al grupo salina, tampoco se presentaron variaciones significativas (Figura 6A).

Similar a lo descrito en el apartado anterior, los valores graficados para hipocampo dorsal representan el promedio de la FA del hipocampo dorsal derecho e izquierdo pues al comparar ambos lados no se apreciaron diferencias significativas entre ellos (Figura 6B). Lo mismo ocurre con la gráfica de fimbria (Figura 6C). Al analizar los datos de hipocampo dorsal, los valores de esta región cerebral no mostraron cambios significativos al comparar los cuatro grupos sometidos al modelo de pilocarpina entre sí ni al compararlos con el grupo Control Salina; la ausencia de cambios se mantiene al comparar los valores de cada grupo a lo largo del tiempo (Figura 6B). Finalmente, al evaluar la FA de la fimbria de los cuatro grupos epilépticos, ésta mostró disminución significativa en dos de los cuatro grupos epilépticos (el grupo Pilocarpina disminuyó un 15% y el grupo PBS + Pilocarpina disminuyó un 14%) con respecto a la FA de los animales del grupo Control Salina (Figura 6C). Esta estructura no mostró cambios longitudinales en ninguno de los grupos epilépticos (Figura 6C).

Estos resultados muestran que la inyección de cualquiera de las dos saporinas, así como de su vehículo, no son un factor que altere la microestructura de las regiones evaluadas o que magnifique dichos cambios tras la inducción del *status epilepticus*.





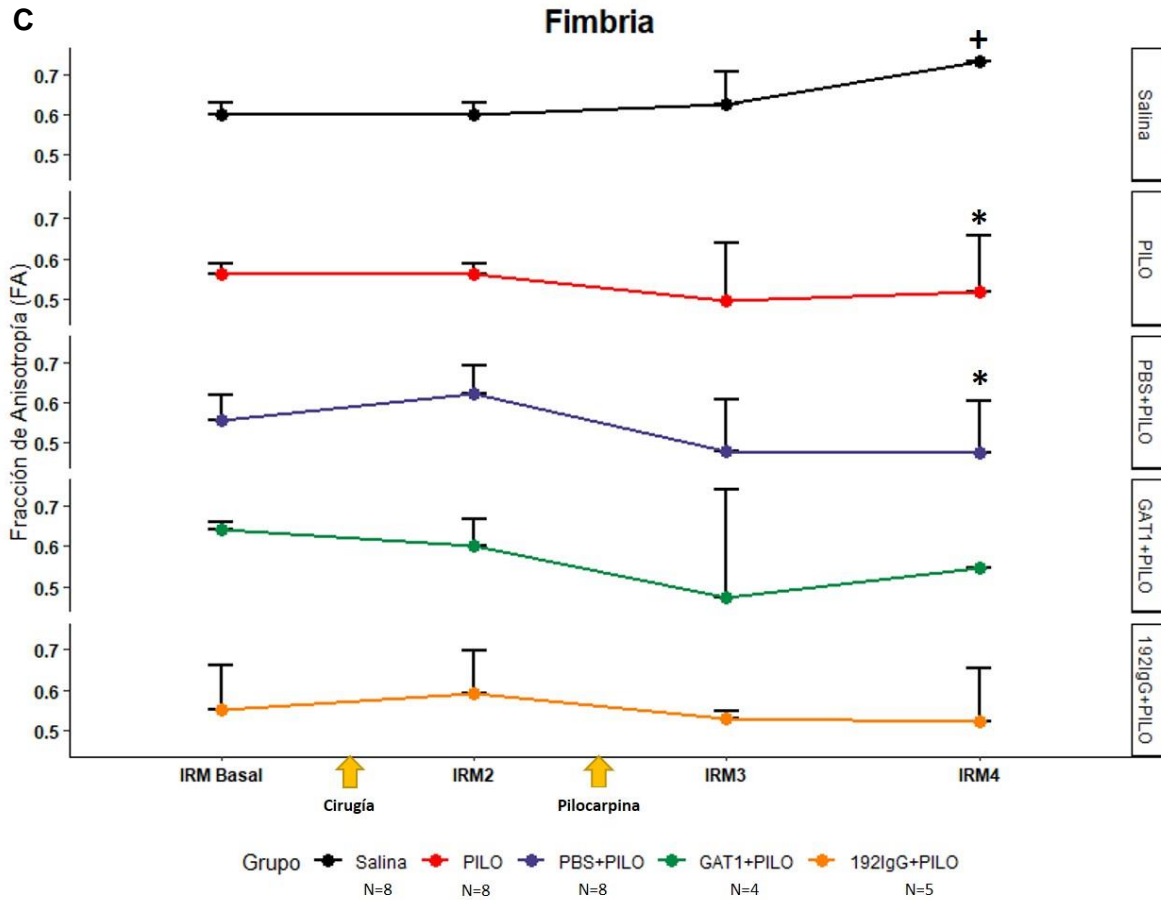


Figura 6. Cambios longitudinales en la fracción de anisotropía (FA) de estructuras de sustancia blanca (septum medial (A) y fimbria (C)) y sustancia gris (hipocampo dorsal (B)) del grupo Control Salina y los cuatro grupos sometidos a la inyección de pilocarpina. Sólo fimbria (C) muestra una reducción significativa en la FA de los animales del grupo Pilocarpina y PBS + Pilocarpina con respecto al grupo Control Salina durante el cuarto escaneo (* $p < 0.05$). Ninguno de los grupos epilépticos muestra diferencias longitudinales en las regiones cerebrales evaluadas. La primera flecha indica el momento de la cirugía y la segunda flecha indica el momento de la inyección de la pilocarpina.

9.3 CAMBIOS EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE LOS ANIMALES PARA DESARROLLAR EL *STATUS EPILEPTICUS*

Los animales tanto del grupo Control Pilocarpina como del grupo PBS+Pilocarpina requirieron un promedio de 5 inyecciones de fármaco para inducir el *status epilepticus*. El 30% de los animales murió durante el día de la inducción o en las 48 horas posteriores al día de la inyección. Importante resaltar que el 100% de los animales que lograron sobrevivir al *status epilepticus*, presentaron CEER tanto en la fase crónico temprana como en la fase crónico tardía del desarrollo de la enfermedad.

Los animales a los que se les inyectó la saporina GABAérgica (GAT1-SAP) y posteriormente fueron sometidos al modelo de pilocarpina, requirieron un promedio de 7 inyecciones para alcanzar el *status epilepticus*. Además, el 70% de los animales morían durante la inducción o en las 72 horas posteriores al día de la ejecución del modelo de pilocarpina (Figura 7A).

Finalmente, en el caso de los 12 animales a los que se les administró la saporina colinérgica (192-IgG) y luego fueron sometidos al modelo de pilocarpina, éstos presentaron diferentes escenarios: 1) cinco sujetos alcanzaron el *status epilepticus* y sobrevivieron, 2) cuatro murieron el día de la inducción o en los días posteriores y 3) tras 9 inyecciones de pilocarpina, 3 ratas nunca alcanzaron a desarrollar el *status epilepticus* (Figura 7B).

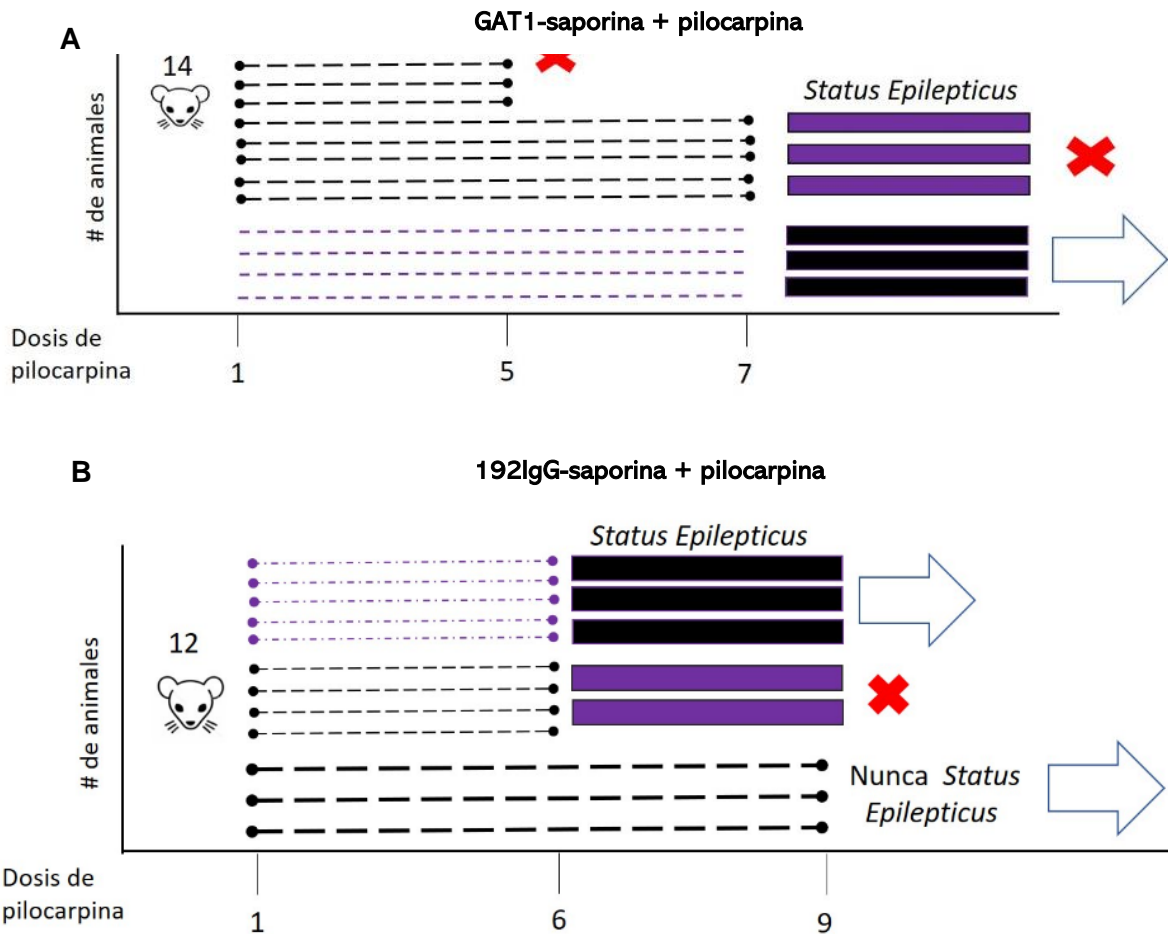


Figura 7. Esquemas que muestran que la inyección de la saporina GABAérgica (A) o colinérgica (B) altera la respuesta de los animales al modelo de pilocarpina. (A) La inyección de la saporina GABAérgica provoca aumento significativo en el índice de mortalidad de los animales sometidos a la inducción del *status epilepticus*. (B) Tras la inyección de la saporina colinérgica, 42% de los animales sobrevivieron al *status epilepticus*, 25% nunca lo presentaron y 33% murieron.

9.4 CAMBIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS TRAS LA LESIÓN SELECTIVA DEL SEPTUM MEDIAL

La Figura 8 muestra una fotografía panorámica de uno de los cortes coronales donde se aprecia con mayor claridad la región a evaluar, es decir, el septum medial (delimitada dentro del recuadro negro). La fotografía fue tomada con el microscopio Apotome.2 Zeiss programa Axiovision.

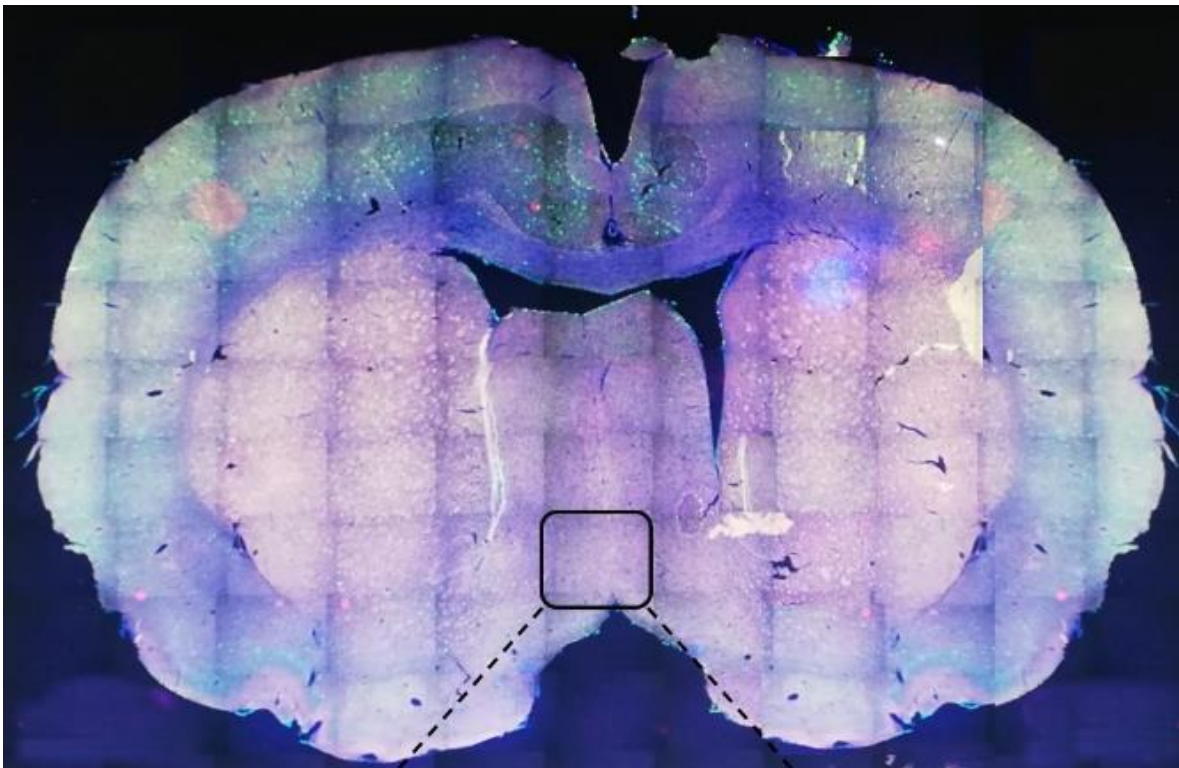


Figura 8. Fotografía panorámica hecha con el septum MosaiX Acquisition; cuadrículas de 13 x 11 tomadas con el objetivo 10X. El recuadro negro delimita la región del septum medial; región cerebral donde se hicieron las evaluaciones inmunohistoquímicas de los 8 animales evaluados.

Dos animales por grupo se usaron para las evaluaciones inmunohistoquímicas. Sin embargo, para integrar la Figura 9 sólo se seleccionaron las imágenes de un animal por grupo. Para determinar el grado de lesión inducido por cada una de las saporinas inyectadas, nos basamos en las coordenadas del mosaico para realizar acercamientos y tomas específicas a 40X del septum medial.

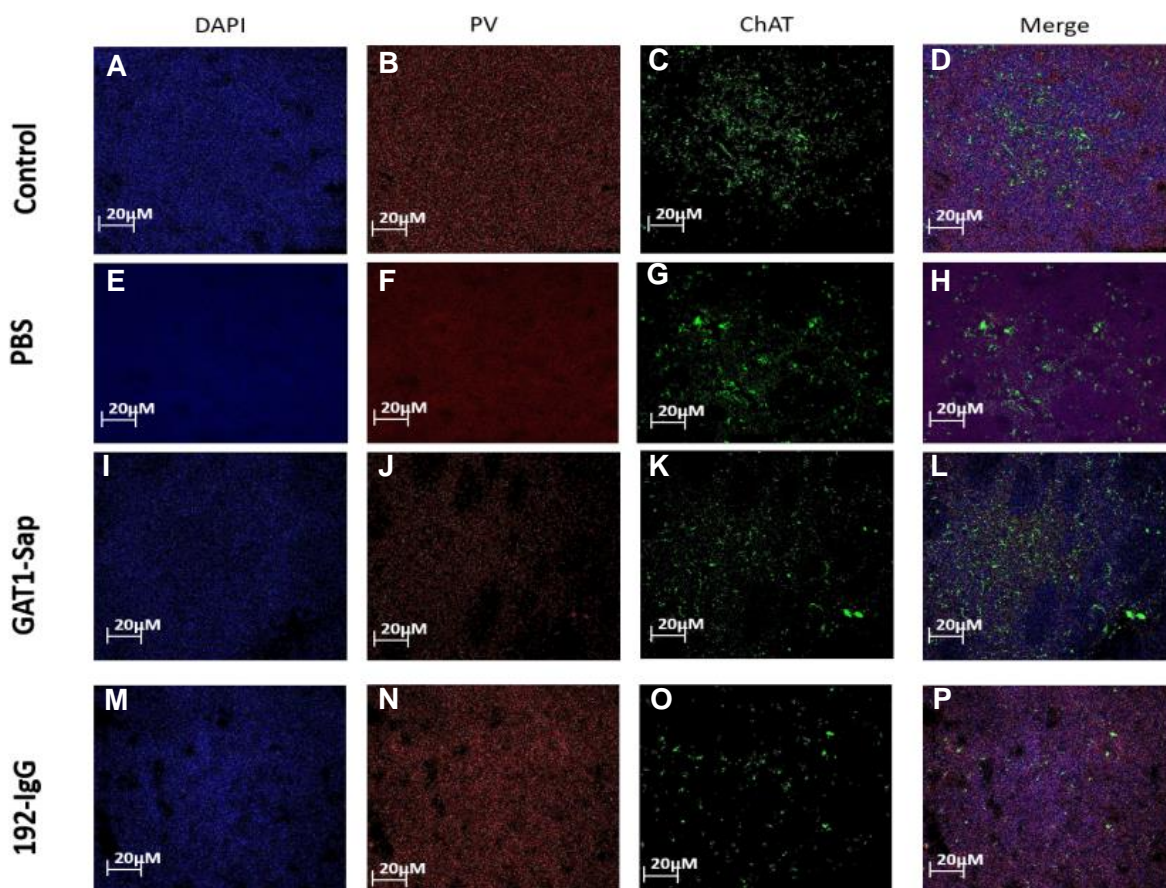
La totalidad de los cuerpos celulares localizados a nivel del septum medial se marcaron con DAPI (Figura 9A, E, I, M). Al comparar el número total de células contabilizadas en los animales del grupo inyectado con PBS con el de los animales del grupo Control, no se aprecia diferencia entre ambos (Figura 9A, E, Q). En el caso de los animales inyectados con cualquiera de los dos saporinas, éstos muestran una reducción en el número total de células al compararlos con el grupo Control (Figura 9A, I, M, Q).

La determinación del grado de lesión selectiva inducido por la saporina GABAérgica (GAT1-SAP) o colinérgica (192-IgG) se realizó a partir del análisis de inmunorreactividad que presentaron las células a parvalbúmina (PV; en rojo; Figura 9B, F, J, N) y acetilcolinesterasa (ChAT; en verde; Figura 9C, G, K, O).

Al comparar a los animales inyectados con GAT1-SAP, con los animales Control o PBS, se aprecia un menor número de células inmunoreactivas a PV en los animales lesionados con dicho agente (Figura 9B, F, J, Q). Reducción que no se aprecia en las células inmunoreactivas a ChAT (Figura 9C, G, K, Q).

En el caso de los animales inyectados con 192-IgG, éstos presentan una pronunciada caída en el número de células marcadas con ChAT en comparación con los animales Control y PBS (Figura 9C, G, O, Q).

Estos resultados sugieren cierta especificidad en los cambios celulares que ocurren tras la inyección de cada una de las saporinas. Sin embargo, la selectividad no es absoluta pues también se aprecia disminución de otros tipos celulares tras la administración de cada saporina. Después de 85 días de haber suministrado el agente lesionante, es evidente el daño masivo generado a nivel del septum medial.



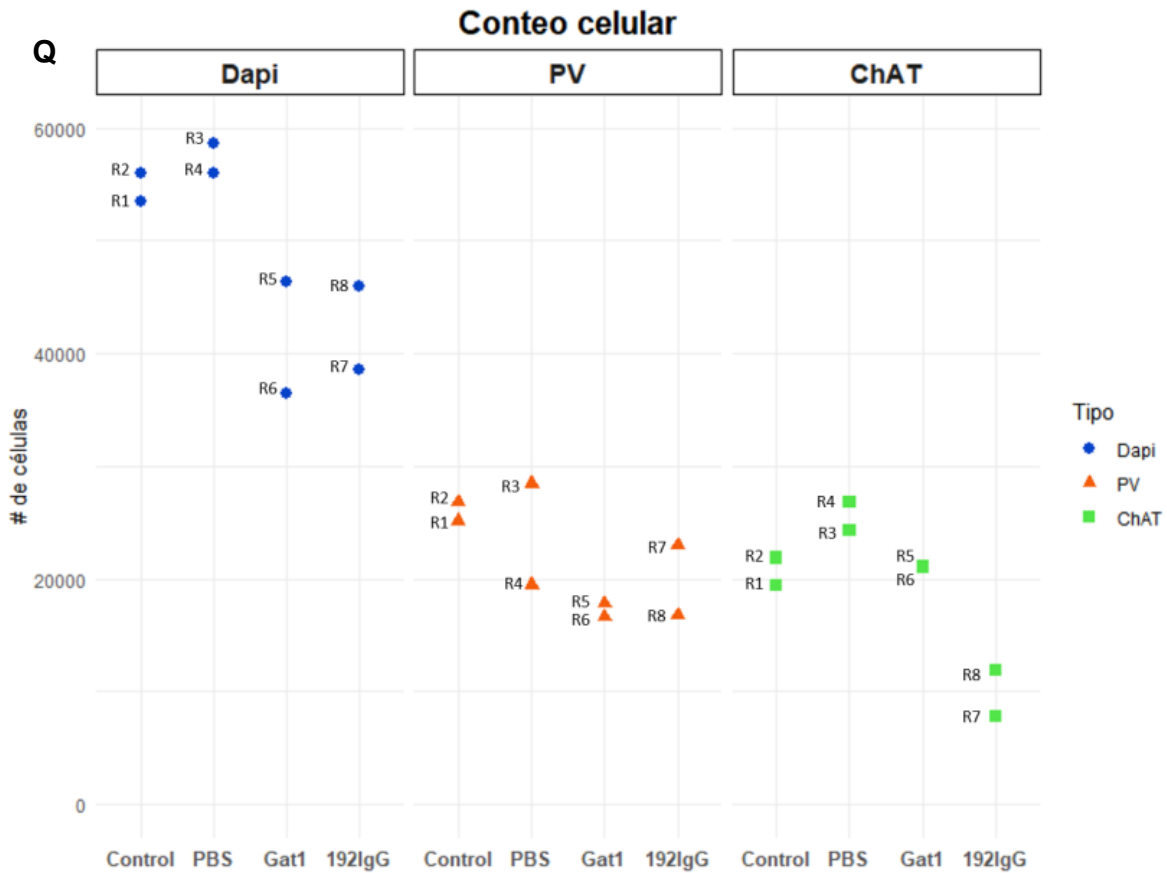


Figura 9. (A - P) Imágenes correspondientes a la evaluación inmunohistoquímica de un animal por grupo. (A, E, I, M) El marcaje con DAPI muestra el total de cuerpos celulares localizados a nivel del septum medial. Tras la lesión selectiva se evaluó la inmunoreactividad que presentaron las células a parvalbúmina (PV; rojo; B, F, J, N) y acetilcolinesterasa (ChAT; verde; C, G, K, O). (K) La inyección de GAT1-SAP disminuye el número de células inmunoreactivas a PV. (O) La inyección de 192-IgG provoca una pronunciada caída en el número de células marcadas con ChAT. (Q) La gráfica muestra el número de células contabilizadas en cada uno de los 8 animales evaluados (R = Rata; R1 - R8). Los puntos azules indican el número total de células marcadas con DAPI. Los triángulos naranjas representan el número de células reactivas a PV. Los cuadrados verdes señalan el número de células reactivas a ChAT.

10. DISCUSIÓN

En el presente estudio, la evaluación inmunohistoquímica muestra el grado de lesión selectiva que cada saporina es capaz de inducir a nivel del septum medial. Esta alteración se ve reflejada en la respuesta de los animales al ser sometidos al modelo de pilocarpina. Sin embargo, las imágenes de difusión adquiridas *in vivo* no lograron demostrar cambios longitudinales anatómo-patológicos en la microestructura de las regiones cerebrales evaluadas (septum medial, hipocampo dorsal y fimbria) secundarias a la lesión del septum, previo al *status epilepticus*. En el caso de los animales epilépticos, éstos presentaron cambios significativos en la microestructura del sistema fimbria-fórnix como consecuencia del insulto cerebral inducido por la pilocarpina y el *status epilepticus* provocado. Importante resaltar que los cambios producidos por el *status epilepticus* no se ven magnificados en animales lesionados previamente en el septum.

En humanos, el daño de las eferencias hipocampales secundario a la muerte neuronal característica de la esclerosis hipocampal provoca anomalías en los patrones de difusión del agua. Sin embargo, las anomalías del fórnix suelen ser bilaterales y simétricas en pacientes epilépticos con esclerosis hipocampal unilateral, sugiriendo que poblaciones adicionales de fibras a nivel del fórnix pudieran contribuir al daño bilateral. Entre éstas destacan las aferentes y en menor medida las comisurales (Concha et al., 2005, 2007; McDonald et al., 2010). Estudios previos en modelos animales han reportado que las lesiones en el sistema fimbria-fórnix que llegan a provocar denervación de las eferencias hipocampales, facilitan el desarrollo de la actividad epiléptica (Buzsáki et al., 1989; Ferencz et al., 1997, 2001). Este efecto podría ser resultado de la pérdida de las acciones moduladoras que ejercen las vías septo-hipocampales sobre la actividad eléctrica hipocampal pues dichas vías están íntimamente relacionadas con el ritmo theta (Lee et al., 1994; Buzsáki, 2002; Teles-Grilo Ruivo y Mellor, 2013; Unal et al., 2015). En este sentido, Petersen y Buzsáki (2020) reportaron cambios no permanentes en la actividad espontánea del hipocampo, específicamente en el ritmo theta, tras realizar manipulaciones físicas y químicas a nivel del septum.

Todo esto sugiere que el mantenimiento de la actividad eléctrica hipocampal en un rango oscilatorio limitado evitaría la aparición de estados de excitabilidad anormales y por lo tanto, evitaría la aparición de crisis epilépticas espontáneas recurrentes (Miller et al., 1994; Colom et al., 2006; Kitchigina y Butuzova, 2009; Kitchigina et al., 2013). Sin embargo, dada la complejidad de los circuitos involucrados en la modulación del ritmo theta, aún se desconocen cuáles son las alteraciones responsables de estos cambios. A continuación, se sugieren posibles causas que pudieran estar relacionadas:

- a) La muerte de interneuronas GABAérgicas septales, pues son muy susceptibles al daño excitotóxico agudo y crónico (Covolan y Mello, 2000; Garrido-Sanabria et al., 2006). Esto también contribuiría a los cambios reportados en el ritmo theta (Colom et al., 2006; Hangya et al., 2009; Kitchigina et al., 2013).
- b) La disminución en el número de neuronas colinérgicas septales (Cavalheiro, 1995; Follesa et al., 1999), lo cual también podría afectar directamente sobre el ritmo theta (Lee et al., 1994).

10.1 CAMBIOS INDUCIDOS TRAS LA LESIÓN SELECTIVA DEL SEPTUM MEDIAL

Estudios previos han simulado el daño a nivel de neuronas GABAérgicas o colinérgicas mediante el uso de modelos animales donde es posible realizar lesiones permanentes de poblaciones neuronales específicas mediante saporinas (agentes tóxicos que al conjugarse con anticuerpos específicos, inhiben la síntesis de proteínas y provocan la muerte celular). En este trabajo de tesis usamos dicho modelo para lesionar irreversiblemente poblaciones neuronales específicas a nivel del septum medial.

10.1.1 GAT1-SAP

La GAT1-SAP (saporina selectiva a neuronas GABAérgicas que expresan el transportador GAT1) se ha usado para dañar el sistema GABAérgico del septum

medial de roedores, los cuales a la postre presentan dificultades al tratar de realizar tareas de aprendizaje y memoria (Pang et al., 2011; Köppen et al., 2013; Roland et al., 2014a; Dashiani et al., 2015). En nuestro caso, observamos que la inyección de la GAT1-SAP a nivel de septum medial provoca disminución en la inmunoreactividad de las células a anticuerpos de parvalbúmina y similar a lo reportado en otros trabajos, también afecta parcialmente a otros tipos celulares (entre ellas, las células inmunoreactivas a acetilcolinesterasa) (Köppen et al., 2013; Dashiani et al., 2015). En adición al efecto celular inducido por la inyección de GAT1-SAP, también observamos:

- 1) Alteraciones conductuales en los animales inyectados (hiperactivos e hiperreactivos en los días posteriores a la administración de la saporina).
- 2) Un elevado índice de mortalidad en aquellos animales que, tras la lesión septal, eran sometidos al modelo de pilocarpina. Este modelo de epilepsia crónica ha demostrado ser útil en la evocación de actividad epiléptica en el lóbulo temporal y mimetiza el proceso de epileptogénesis descrito a nivel clínico. Este modelo, al involucrar a la pilocarpina (agente convulsivo muscarínico con efectos a nivel sistémico), suele presentar índices de mortalidad del 30%, un valor que contrasta con el 70% de mortalidad que nosotros observamos en los animales a los que se les inyectaba la GAT1-SAP dos semanas antes de la inducción del *status epilepticus* por pilocarpina. Este efecto podría atribuirse directamente a la lesión inducida del sistema GABAérgico septal, posiblemente debido a la alteración en la actividad de las neuronas piramidales del hipocampo y por lo tanto, en la modulación del ritmo theta hipocampal. Esto en conjunto traería la aparición sostenida e incontrolada de actividad epileptiforme (Kitchigina et al., 2013).
- 3) La falta de un efecto a lo largo del tiempo al analizar las imágenes sensibles a difusión de los animales control previo al *status epilepticus*. Con nuestros datos no es posible asegurar la ausencia de daño histológico en la fimbria-fórnix provocada por la lesión septal selectiva; si la hubiera, no se reflejó en las imágenes sensibles a difusión. Por el contrario, los animales epilépticos (que se sometieron a la administración de pilocarpina), presentaron

disminución (en algunos casos muy marcada) en la fracción de anisotropía de la fimbria como consecuencia del insulto cerebral inducido por la pilocarpina y el *status epilepticus*. No hubo evidencia que indicara que la lesión septal intensifique las anomalías de la difusión del agua en la fimbria después del *status epilepticus*. Los cambios provocados por la inducción del *status epilepticus* serán descritos en el apartado 7.2.

10.1.2 192-IgG

Diversos estudios han demostrado que el uso de la saporina 192-IgG provoca disminución en la inmunoreactividad de células colinérgicas y de los transportadores vesiculares de acetilcolina (VACHT) cuando es inyectada a nivel hipocampal y del septum medial (Rosal Lustosa et al., 2019; Soares et al., 2019). En nuestro caso, la inyección de la 192-IgG a nivel del septum medial provoca una caída en el número de células marcadas con ChAT. Sin embargo, similar a lo reportado en otros trabajos (Ferencz et al., 2000, 2001; Craig et al., 2008), la selectividad no es absoluta pues también se aprecia muerte de otros tipos celulares tras la administración de esta saporina. Además, Dobryakova et al. (2019) han descrito que la inyección septal de la saporina 192-IgG es capaz de provocar alteraciones morfológicas del hipocampo dorsal y un incremento en el número de células gliales y astrocitos a nivel de CA3.

En términos generales, la acción colinérgica ha sido vinculada con la actividad epileptiforme (Jope et al., 1987; Hillert et al., 2014). Incluso en algunos trabajos ya se reporta el efecto de la inyección de la saporina 192-IgG en diferentes regiones cerebrales previo a la estimulación eléctrica tipo “*kindling*” (en el cual se realizan estimulaciones de baja intensidad de corriente que aumentan la excitabilidad de las células) describiéndose una alteración en el desarrollo de las crisis convulsivas y por lo tanto en el establecimiento del estado “*kindled*” (Ferencz et al., 2000, 2001; Silveira et al., 2002; Craig et al., 2008; Soares et al., 2019). Estos trabajos sugieren que la actividad colinérgica juega un rol crucial en la generación de crisis convulsivas y en la generalización de éstas, así como en el desarrollo del proceso epileptogénico. En nuestro caso, los animales inyectados con la saporina 192-IgG

presentaron respuestas variables ante el modelo de pilocarpina: 1) establecimiento del *status epilepticus* similar al de los animales sin saporina, 2) nunca se alcanzó el *status epilepticus*, y 3) muerte durante o post-*status epilepticus*.

Similar a lo reportado con la saporina GABAérgica, la saporina 192-IgG no provocó efecto alguno al analizar las imágenes sensibles a difusión de los animales control; en el caso de los animales epilépticos, la lesión septal tampoco magnificó los cambios propios de la inducción del *status epilepticus*. Los cambios provocados por la inducción del *status epilepticus* fueron descritos en el apartado 7.2.

10.2 CAMBIOS LONGITUDINALES EN LA FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA (FA) PROVOCADOS POR EL *STATUS EPILEPTICUS* INDUCIDO POR PILOCARPINA

Estudios previos han descrito que pacientes con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente presentan variaciones en el comportamiento de la difusión a nivel del fórnix, señalándose a la degeneración Walleriana como la responsable de dichos cambios (Concha et al., 2005, 2006; Liu et al., 2013). En este trabajo de tesis, el valor de difusión de la fimbria post-*status epilepticus* destacó por ser el que presentó un mayor porcentaje de cambio en los cuatro grupos, observándose disminución significativa de la fracción de anisotropía en los animales que no recibieron inyección de saporina en el septum medial. Esto nos lleva a sugerir que tras la inducción del insulto cerebral ocurren una serie de eventos degradativos (inflamación, desintegración granular del citoesqueleto axonal, fragmentación axonal, entre otros) tanto en las regiones proximales como distales a la lesión primaria, concluyendo con la atrofia de las diversas regiones cerebrales afectadas (George y Griffin, 1994; Kerschensteiner et al., 2005; Beirowski et al., 2010).

Pocos estudios en animales han reportado el hallazgo de la reducción en la fracción de anisotropía del sistema fimbria-fórnix. Parekh et al. (2010) usaron un modelo de estimulación eléctrica hipocampal y reportaron que la caída en la fracción de anisotropía sólo aparece durante la fase aguda de aquellos animales que presentaban crisis epilépticas espontáneas recurrentes. En contraparte, van

Eijsden et al. (2011) usaron el modelo de litio-pilocarpina y únicamente reportaron reducción en la fracción de anisotropía de los animales tras 8 semanas de haber sufrido la inducción del *status epilepticus*. En nuestro caso, usamos el modelo de pilocarpina y observamos que la reducción de la fracción de anisotropía fue definitiva e irreversible. Resultado similar a lo reportado en pacientes sometidos a tratamientos resectivos del foco epiléptico y que incluso quedaron libres de crisis epilépticas tras la cirugía (Concha et al., 2007; McDonald et al., 2010). Esto sugiere una evolución anatómo-patológica progresiva de la degeneración Walleriana, la cual al completarse es capaz de arrojar un perfil de difusión caracterizado por alteraciones irreversibles (Liu et al., 2013).

La capacidad deductiva sobre la citoarquitectura de la sustancia gris que ofrece el modelo de tensor aplicado a imágenes sensibles a difusión es limitada. Esto debido a que los cambios microestructurales involucran cuerpos neuronales, axones, dendritas, células gliales y vasos sanguíneos. Esta heterogeneidad estructural confiere una alta dificultad para dilucidar los cambios que ocurren en regiones como el hipocampo (Sierra et al., 2015). Sin embargo, a pesar de dichas limitantes, pudimos observar la totalidad del hipocampo dorsal, apreciándose un perfil de difusión post-*status epilepticus* marcado por la falta de cambio de la anisotropía.

11. CONCLUSIÓN

Uno de los factores asociados a la epileptogénesis es el daño en el desarrollo y/o funcionamiento de las proyecciones septo-hipocampales mediadas por GABA y acetilcolina pues éstas constituyen el mayor porcentaje de las aferencias hipocampales; esto provocará fallas en los sistemas inhibitorios, incrementándose la excitabilidad. Debido a la dificultad para dar seguimiento a los mecanismos de epileptogénesis en el humano, se han desarrollado diversos modelos animales que simulan ciertas características de la epilepsia del lóbulo temporal clínica y otros que a través de lesiones de poblaciones neuronales específicas permiten inducir hiperexcitabilidad neuronal y rearrreglos estructurales del circuito hipocampal. Por ello, el desarrollo y la implementación de nuevos modelos analíticos, así como la combinación con otras técnicas imagenológicas, bioquímicas, optogenéticas, moleculares y funcionales, que permitan discernir los cambios progresivos que sufre la formación hipocampal tras la lesión de las conexiones septales y evaluar cómo influye en el desarrollo tanto ictogénico como epileptogénico es imprescindible.

12. REFERENCIAS

- Amaral DG, Kurz J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol*, 1985; 240(1):37-59.
- Amaral D, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. En: *The hippocampus book*. 2007. 1a edición. 37-114. Oxford University Press.
- Andersson JLR, Sotiropoulos SN. An integrated approach to correction for off-resonance effects and subject movement in diffusion MR imaging. *Neuroimage*, 2016; 125:1063-1078.
- Asprodini EK, Rainnie DG, Shinnick-Gallagher P. Epileptogenesis reduces the sensitivity of presynaptic gamma-aminobutyric acidB receptors on glutamatergic afferents in the amygdala. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992; 262(3):1011-1021.
- Auer T, Schreppel P, Erker T, Schwarzer C. Impaired chloride homeostasis in epilepsy: molecular basis, impact on treatment, and current treatment approaches. *Pharmacol Ther*, 2020; 205:107422.
- Barker-Haliski M, White HS. Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015; 5(8):a022863.
- Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J*, 1994; 66(1):259-267.
- Bean BP. The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci*, 2007; 8(6):451-465.
- Beaulieu C. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system- a technical review. *NMR Biomed*, 2002; 15:435-55.
- Beirowski B, Nógrádi A, Babetto E, Garcia-Alias G, Coleman MP. Mechanisms of axonal spheroid formation in central nervous system Wallerian degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010; 69(5):455-472.
- Belaroussi B, Milles J, Carme S, Zhu YM, Benoit-Cattin H. *Med Image Anal*, 2006; 10(2):234-246.

- Bernasconi A. Magnetic resonance imaging in intractable epilepsy: focus on structural image analysis. *Adv Neurol*, 2006; 97:273-278.
- Bjerke, I. E., Yates, S. C., Laja, A., Witter, M. P., Puchades, M. A., Bjaalie, J. G., & Leergaard, T. B. (2020). Densities and numbers of calbindin and parvalbumin positive neurons across the rat and mouse brain. *iScience*, 24(1), 101906. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101906>
- Blair RDG. Temporal lobe epilepsy semiology. *Epilepsy Res Treat*, 2012; 2012:751510.
- Blauwblomme T, Jiruska P, Huberfeld G. Mechanisms of ictogenesis. *Int Rev Neurobiol*, 2014; 114:155-85.
- Blümcke I, Becker AJ, Klein C, Scheiwe C, Lie AA, Beck H, Waha A, Friedl MG, Kuhn R, Emson P, Elger C, Wiestler OD. Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2000; 59(1):1-10.
- Blümcke I, Spreafico R. Cause matters: a neuropathological challenge to human epilepsies. *Brain Pathol*, 2012; 22(3):347-349.
- Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, Bernasconi N, Bien CG, Cendes F, Coras R, Cross JH, Jacques TS, Kahane P, Mathern GW, Miyata H, Moshé SL, Oz B, Özkara Ç, Perucca E, Sisodiya S, Wiebe S, Spreafico R. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, 2013; 54(7):1315-1329.
- Buhl EH, Dann JF. Cytoarchitecture, neuronal composition, and entorhinal afferents of the flying fox hippocampus. *Hippocampus*, 1991; 1(2):131-152.
- Bunce, J. G., Sabolek H. R. and Chrobak J. J. (2003). "Intraseptal infusion of oxotremorine impairs memory in a delayed-nonmatch-to-sample radial maze task." *Neuroscience* 121(2): 259–67
- Burneo JG, Tellez-Zenteno J, Wiebe S. Understanding the burden of epilepsy in Latin America: a systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Res*, 2005; 66(1-3):63-74.

- Buzsáki G, Ponomareff GL, Bayardo F, Ruiz R, Gage FH. Neuronal activity in the subcortically denervated hippocampus: a chronic model for epilepsy. *Neuroscience*, 1989; 28(3):527-538.
- Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 2002; 33(3):325-340.
- Catani M, Dell'acqua F, Thiebaut de Schotten M. A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*, 2013; 37(8):1724-1737.
- Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*, 1991; 32(6):778-782.
- Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*, 1995; 16:33-37.
- Cavus I, Kasoff WS, Cassaday MP, Jacob R, Gueorguieva R, Sherwin RS, Krystal JH, Spencer DD, Abi-Saab WM. Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Ann Neurol*, 2005; 57(2):226-235.
- Cavus I, Pan JW, Hetherington HP, Abi-Saab W, Zaveri HP, Vives KP, Krystal JH, Spencer SS, Spencer DD. Decreased hippocampal volume on MRI is associated with increased extracellular glutamate in epilepsy patients. *Epilepsia*, 2008; 49(8):1358-1366.
- Chamberlin NL, Traub RD, Dingledine R. Role of EPSPs in initiation of spontaneous synchronized burst firing in rat hippocampal neurons bathed in high potassium. *J Neurophysiol*, 1990; 64(3):1000-1008.
- Chronister RB, Hardy SGP. Sistema límbico. En: *Principios de neurociencia*. 2003. 2a edición. 493-504. Elsevier Ltd.
- Colom LV, Castaneda MT, Reyna T, Hernandez S, Garrido-Sanabria E. Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse*, 2005; 58(3):151-164.
- Colom LV, Garcia-Hernandez A, Castaneda MT, Perez-Cordova MG, Garrido-Sanabria ER. Septo-hippocampal networks in chronically epileptic rats:

- potential antiepileptic effects of theta rhythm generation. *J Neurophysiol*, 2006; 95(6):3645-3653.
- Concha L, Beaulieu C, Gross DW. Bilateral limbic diffusion abnormalities in unilateral temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 2005; 57(2):188-196.
 - Concha L, Gross DW, Wheatley BM, Beaulieu C. Diffusion tensor imaging of time-dependent axonal and myelin degradation after corpus callosotomy in epilepsy patients. *Neuroimage*, 2006; 32(3):1090-1099.
 - Concha L, Beaulieu C, Wheatley BM, Gross DW. Bilateral white matter diffusion changes persist after epilepsy surgery. *Epilepsia*, 2007; 48(5):931-940.
 - Concha L, Beaulieu C, Collins DL, Gross DW. White-matter diffusion abnormalities in temporal-lobe epilepsy with and without mesial temporal sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2009; 80:312-19.
 - Concha L, Livy DJ, Beaulieu C, Wheatley BM, Gross DW. In vivo diffusion tensor imaging and histopathology of the fimbria-fornix in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, 2010; 30(3):996-1002.
 - Covolani L, Mello LE. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res*, 2000; 39(2):133-152.
 - Craig LA, Hong NS, Kopp J, McDonald RJ. Reduced cholinergic status in hippocampus produces spatial memory deficits when combined with kainic acid induced seizures. *Hippocampus*, 2008; 18(11):1112-1121.
 - Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*, 2008; 172(2):143-157.
 - Curia G, Lucchi C, Vinet J, Gualtieri F, Marinelli C, Torsello A, Constantino L, Biagini G. Pathophysiology of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? *Curr Med Chem*, 2014; 21(6):663-688.
 - Dalby NO, Mody I. The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. *Curr Opin Neurol*, 2001; 14:187-192.
 - Das A, Wallace 4th GC, Holmes C, McDowell ML, Smith JA, Marshall JD, Bonilha L, Edwards JC, Glazier SS, Ray SK, Banik NL. Hippocampal tissue of

patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. *Neuroscience*, 2012; 220:237-246.

- Dashiani MG, Kruashvili LB, Rusadze KZ, Matatradze SB, Beselia GV. Effects of immunotoxic and electrolytic lesions of medial septal area on spatial short-term memory in rats. *Georgian Med News*, 2015; 239:98-103.
- Dobryakova YV, Volobueva MN, Manolova AO, Medvedeva TM, Kvichansky AA, Gulyaeva NV, Markevich VA, Stepanichev MY, Bolshakov AP. Cholinergic deficit induced by central administration of 192IgG-saporin is associated with activation of microglia and cell loss in the dorsal hippocampus of rats. *Front Neurosci*, 2019; 13:146.
- During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet*, 1993; 341(8861):1607-1610.
- During MJ, Ryder KM, Spencer DD. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature*, 1995; 376(6536):174-177.
- Dutar P, Bassant MH, Senut MC, Lamour Y. The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol Rev*, 1995; 75(2):393-427.
- Eid T, Thomas MJ, Spencer DD, Runden-Pran E, Lai JCK, Malthankar GV, Kim JH, Danbolt NC, Ottersen OP, de Lanerolle NC. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet*, 2004; 363(9402):28-37.
- Eid T, Williamson A, Lee TSW, Petroff OA, de Lanerolle NC. Glutamate and astrocytes: key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia*, 2008; Suppl 2:42-52.
- Eid T, Gruenbaum SE, Dhaher R, Lee TW, Zhou Y, Danbolt NC. The Glutamate-Glutamine Cycle in Epilepsy. *Adv Neurobiol*, 2016; 13:351-400.
- Elvander-Tottie E, Eriksson TM, Sandin J, Ogren SO. N-methyl-D-aspartate receptors in the medial septal area have a role in spatial and emotional learning in the rat. *Neuroscience*, 2006; 142(4):963–78.

- Engel Jr J. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 1996; 26(1):141-150.
- Ferencz I, Kokaia M, Elmér E, Metsis M, Kokaia Z, Lindvall O. Effects of cholinergic denervation on seizure development and neurotrophin messenger RNA regulation in rapid hippocampal kindling. *Neuroscience*, 1997; 80(2):389-399.
- Ferencz I, Leanza G, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Basal forebrain neurons suppress amygdala kindling via cortical but not hippocampal cholinergic projections in rats. *Eur J Neurosci*, 2000; 12(6):2107-2116.
- Ferencz I, Leanza G, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Septal cholinergic neurons suppress seizure development in hippocampal kindling in rats: comparison with noradrenergic neurons. *Neuroscience*, 2001; 102(4):819-832.
- Fernandes MJS, Naffah-Mazzacoratti MG, Cavalheiro EA. Na+K+ATPase in the rat hippocampus: A study in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Int*, 1996; 28:497-500.
- Fisher RS. Animal models of the epilepsies. *Brain Res Brain Res Rev*, 1989; 14(3):245-278.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel Jr J, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshe SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 2014; 55(4):475-482.
- Fogwe LA, Reddy V, Mesfin FB. Neuroanatomy, Hippocampus. 2021 Feb 15. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 29489273.
- Follesa P, Tarantino A, Floris S, Mallei A, Porta S, Tuligi G, Cagetti E, Caddeo M, Mura A, Serra M, Biggio G. Changes in the gene expression of GABAA receptor subunit mRNAs in the septum of rats subjected to pentylenetetrazol-induced kindling. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999; 70(1):1-8.
- Freund TF, Antal M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 1988; 336(6195):170-173.

- Frotscher M, Leranth C. Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*, 1985; 239(2):237-246.
- Funke MG, da Silva Costa M, Amado D, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG. Calcium homeostasis and temporal lobe epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr*, 2003; 61(Suppl 1):8-14.
- Garrido-Sanabria ER, Castañeda MT, Banuelos C, Perez-Cordova MG, Hernandez S, Colom LV. Septal GABAergic neurons are selectively vulnerable to pilocarpine-induced status epilepticus and chronic spontaneous seizures. *Neuroscience*, 2006; 142(3):871-883.
- Gaykema RP, van der Kuil J, Hersh LB, Luiten PG. Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-diagonal band complex: anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunohistochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience*, 1991; 43(2-3):349-360.
- George R, Griffin JW. Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiculotomy model. *Exp Neurol*, 1994; 129(2):225-236.
- Green RC, Blume HW, Kupferschmid SB, Mesulam MM. Alterations of hippocampal acetylcholinesterase in human temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 1989; 26(3):347-351.
- Guzman-Jimenez DE, Velasco-Monroy AL. Genetic alterations and cytogenetic tests related to mesial temporal lobe epilepsy. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 2015; 16(5):39-47.
- Hangya B, Borhegyi Z, Szilágyi N, Freund TF, Varga V. GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *J Neurosci*, 2009; 29(25):8094-8102.
- Hillert MH, Imran I, Zimmermann M, Lau H, Weinfurter S, Klein J. Dynamics of hippocampal acetylcholine release during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *J Neurochem*, 2014; 131(1):42-52.

- Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res*, 1990; 535(2):195-204.
- Huh CY, Goutagny R, Williams S. Glutamatergic neurons of the mouse medial septum and diagonal band of Broca synaptically drive hippocampal pyramidal cells: relevance for hippocampal theta rhythm. *J Neurosci*, 2010; 30(47):15951-15961.
- ILAE. The International League Against Epilepsy, the 2014 definition of epilepsy: a perspective for patients and caregivers.
- Jang SH, Yeo SS. The differences of the precommissural and postcommissural fornix in the hippocampal location: a diffusion tensor tractography study. *Neuroradiology*, 2017; 59(4):397-401.
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Izquierdo I. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochem Res*, 1997; 22(4):507-515.
- Jope RS, Simonato M, Lally K. Acetylcholine content in rat brain is elevated by status epilepticus induced by lithium and pilocarpine. *J Neurochem*, 1987; 49(3):944-951.
- Kamphuis W, Gorter JA, da Silva FL. A long-lasting decrease in the inhibitory effect of GABA on glutamate responses of hippocampal pyramidal neurons induced by kindling epileptogenesis. *Neuroscience*, 1991; 41(2-3):425-431.
- Kerschensteiner M, Schwab ME, Lichtman JW, Misgeld T. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med*, 2005; 11(5):572-577.
- Khakpai F, Nasehi M, Haeri-Rohani A, Eidi A, Zarrindast MR. Scopolamine induced memory impairment; possible involvement of NMDA receptor mechanisms of dorsal hippocampus and/or septum. *Behav Brain Res*, 2012; 231(1):1–10.
- Khakpai F, Nasehi M, Haeri-Rohani A, Eidi A, Reza Zarrindast M. Septo-hippocampo-septal loop and memory formation. *Basic Clin Neurosci*, 2013; 4(1):5-23.

- Kish SJ, Olivier A, Dubeau F, Robitaille Y, Sherwin AL. Increased activity of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in actively epileptic human cerebral cortex. *Epilepsy Res*, 1988; 2(4):227-231.
- Kitchigina VF, Butuzova MV. Theta activity of septal neurons during different epileptic phases: the same frequency but different significance? *Exp Neurol*, 2009; 216(2):449-458.
- Kitchigina V, Popova I, Sinelnikova V, Malkov A, Astasheva E, Shubina L, Aliev R. Disturbances of septohippocampal theta oscillations in the epileptic brain: reasons and consequences. *Exp Neurol*, 2013; 247:314-327.
- Köppen JR, Winter SS, Stuebing SL, Cheatwood JL, Wallace DG. Infusion of GAT1-saporin into the medial septum/vertical limb of the diagonal band disrupts self-movement cue processing and spares mnemonic function. *Brain Struct Funct*, 2013; 218(5):1099-1114.
- Kotsopoulos IAW, van Merode T, Kessels FGH, de Krom M, Knottnerus JA. Systematic review and meta-analysis of incidence studies of epilepsy and unprovoked seizures. *Epilepsia*, 2002; 43(11):1402-1409.
- Kullmann DM. The neuronal channelopathies. *Brain*, 2002; 125(Pt 6):1177-1195.
- Kuo LW, Lee CY, Chen JH, Wedeen VJ, Chen CC, Liou HH, Tseng WYI. Mossy fiber sprouting in pilocarpine-induced status epilepticus rat hippocampus: a correlative study of diffusion spectrum imaging and histology. *Neuroimage*, 2008; 41(3):789-800.
- Kuzniecky R, Jackson G. Temporal lobe epilepsy. En: *Magnetic resonance in epilepsy*, 2004; 2nd edition. (pp. 99-176) New York. Elsevier.
- Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*, 2000; 342(5):314-319.
- Latarjet M, Ruiz Liard A. Encéfalo. Generalidades y definiciones. En: *Anatomía humana (Tomo 1)*. 2006. 2a reimpression de la 4a edición. 154-202. Editorial Médica Panamericana.

- Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG, Buzsaki G. Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience*, 1994; 62(4):1033-1047.
- Lee TS, Bjornsen LP, Paz C, Kim JH, Spencer SS, Spencer DD, Eid T, de Lanerolle NC. GAT1 and GAT3 expression are differently localized in the human epileptogenic hippocampus. *Acta Neuropathol*, 2006; 111(4):351-363.
- Leite JP, Cavalheiro EA. Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. *Epilepsy Res*, 1995; 20(2):93-104.
- Lévesque M, Avoli M. Carbachol-induced theta-like oscillations in the rodent brain limbic system: underlying mechanisms and significance. *Neurosci Biobehav Rev*, 2018; 95:406-420.
- Liang SL, Carlson GC, Coulter DA. Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. *J Neurosci*, 2006; 26(33):8537-8548.
- Liu W, Alreja M. Norepinephrine inhibits neurons of the intermediate subnucleus of the lateral septum via alpha2-adrenoreceptors. *Brain Res*, 1998; 806(1):36-54.
- Liu M, Gross DW, Wheatley BM, Concha L, Beaulieu C. The acute phase of Wallerian degeneration: longitudinal diffusion tensor imaging of the fornix following temporal lobe surgery. *Neuroimage*, 2013; 74:128-139.
- Liu YQ, Yu F, Liu WH, He XH, Peng BW. Dysfunction of hippocampal interneurons in epilepsy. *Neurosci Bull*, 2014; 30(6):985-998.
- Llinás RR. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science*, 1988; 242(4886):1654-1664.
- Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 2011; 20:359-68.

- Łukawski K, Andres-Mach M, Czuczwar M, Łuszczki JJ, Kruszyński K, Czuczwar SJ. Mechanisms of epileptogenesis and preclinical approach to antiepileptogenic therapies. *Pharmacol Rep*, 2018; 70(2):284-293.
- Luna-Munguia H, Orozco-Suarez S, Rocha L. Effects of high frequency electrical stimulation and R-Verapamil on seizures susceptibility and glutamate and GABA release in a model of phenytoin-resistant seizures. *Neuropharmacology*, 2011; 61(4):807-814.
- Luna-Munguia H, Starski P, Chen W, Gliske S, Stacey WC. Control of in vivo ictogenesis via endogenous synaptic pathways. *Sci Rep*, 2017; 7(1):1311.
- Luna-Munguia H, Zestos AG, Gliske SV, Kennedy RT, Stacey WC. Chemical biomarkers of epileptogenesis and ictogenesis in experimental epilepsy. *Neurobiol Dis*, 2019; 121:177-186.
- Luna-Munguia H, Marquez-Bravo L, Concha L. Longitudinal changes in gray and white matter microstructure during epileptogenesis in pilocarpine-induced epileptic rats. *Seizure*, 2021; in press.
- Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A. Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy Behav*, 2010; 17(1):103-108.
- Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain*, 1995; 118(Pt 1):105-118.
- Mathern GW, Pretorius JK, Leite JP, Kornblum HI, Mendoza D, Lozada A, Bertram 3rd EH. Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res*, 1998; 32(1-2):154-171.
- Mathern GW, Mendoza D, Lozada A, Pretorius JK, Dehnes Y, Danbolt NC, Nelson N, Leite JP, Chimelli L, Born DE, Sakamoto AC, Assirati JA, Fried I, Peacock WJ, Ojemann GA, Adelson PD. Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 1999; 52(3):453-472.
- Mattison KA, Butler KM, Inglis GAS, Dayan O, Boussidan H, Bhambhani V, Philbrook B, da Silva C, Alexander JJ, Kanner BI, Escayg A. SLC6A1 variants

- identified in epilepsy patients reduce γ -aminobutyric acid transport. *Epilepsia*, 2018; 59(9):e135-e141.
- McDonald CR, Hagler DJ, Girard HM, Pung C, Ahmadi ME, Holland D, Patel RH, Barba D, Tecoma ES, Iragui VJ, Halgren E, Dale AM. Changes in fiber tract integrity and visual fields after anterior temporal lobectomy. *Neurology*, 2010; 75(18):1631-1638.
 - McDonald AJ, Mott DD. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *J Neurosci Res*, 2017; 95(3):797-820.
 - Miller JW, Turner GM, Gray BC. Anticonvulsant effects of the experimental induction of hippocampal theta activity. *Epilepsy Res*, 1994; 18(3):195-204.
 - Mott DD, Xie CW, Wilson WA, Swartzwelder HS, Lewis DV. GABAB autoreceptors mediate activity-dependent disinhibition and enhance signal transmission in the dentate gyrus. *J Neurophysiol*, 1993; 69(3):674-691.
 - Müller C, Remy S. Septo-hippocampal interaction. *Cell Tissue Res*. 2018 Sep;373(3):565-575. doi: 10.1007/s00441-017-2745-2. Epub 2017 Dec 18
 - Olmos-Hernandez A, Avila-Luna A, Arch-Tirado E, Bueno-Nava A, Espinosa-Molina G, Alfaro-Rodriguez A. La epilepsia como un problema de discapacidad. Instituto Nacional de Rehabilitación, Investigación en Discapacidad, 2013; 2(3):122-130.
 - Pang KCH, Jiao X, Sinha S, Beck KD, Servatius RJ. Damage of GABAergic neurons in the medial septum impairs spatial working memory and extinction of active avoidance: effects on proactive interference. *Hippocampus*, 2011; 21(8):835-846.
 - Parekh MB, Carney PR, Sepulveda H, Norman W, King M, Mareci TH. Early MR diffusion and relaxation changes in the parahippocampal gyrus precede the onset of spontaneous seizures in an animal model of chronic limbic epilepsy. *Exp Neurol*, 2010; 224(1):258-70.
 - Pascual M, Perez-Sust P, Soriano E. The GABAergic septohippocampal pathway in control and reeler mice: target specificity and termination onto Reelin-expressing interneurons. *Mol Cell Neurosci*, 2004; 25(4):679–91.

- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 6th edition, U.S.A., 2009.
- Petersen PC, Buzsáki G. Cooling of medial septum reveals theta phase lag coordination of hippocampal cell assemblies. *Neuron*, 2020; 107(4):731-744.
- Pierpaoli C, Jezzard P, Basser PJ, Barnett A, Di Chiro G. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology*, 1996; 201(3):637-648.
- Pitkänen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol*, 2002; 1(3):173-181.
- Pitkänen A, Lukasiuk K, Dudek FE, Staley KJ. Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015; 5(10):a022822.
- Proper EA, Hoogland G, Kappen SM, Jansen GH, Rensen MGA, Schrama LH, van Veelen CWM, van Rijen PC, van Nieuwenhuizen O, Gispen WH, de Graan PNE. Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain*, 2002; 125(Pt 1):32-43.
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972; 32:281-294.
- Reddy SD, Younus I, Sridhar V, Reddy DS. Neuroimaging biomarkers of experimental epileptogenesis and refractory epilepsy. *Int J Mol Sci*, 2019; 20(1):220.
- Résibois A, Rogers JH. Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience*. 1992;46(1):101-34. doi: 10.1016/0306-4522(92)90012-q.
- Rocha L, Alonso-Vanegas M, Orozco-Suarez S, Alcantara-Gonzalez D, Cruzblanca H, Castro E. Do certain signal transduction mechanisms explain the comorbidity of epilepsy and mood disorders? *Epilepsy Behav*, 2014; 38:25-31.
- Roland JJ, Stewart AL, Janke KL, Gielow MR, Kostek JA, Savage LM, Servatius RJ, Pang KCH. Medial septum-diagonal band of Broca (MSDB) GABAergic regulation of hippocampal acetylcholine efflux is dependent on cognitive demands. *J Neurosci*, 2014a; 34(2):506-514.
- Roland JJ, Janke KL, Servatius RJ, Pang KCH. GABAergic neurons in the medial septal-diagonal band (MSDB) are important for acquisition of the

- classically conditioned eyeblink response. *Brain Struct Funct*, 2014b; 219(4):1231-1237.
- Rosal Lustosa I, Soares JI, Biagini G, Lukoyanov NV. Neuroplasticity in cholinergic projections from the basal forebrain to the basolateral nucleus of the amygdala in the kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Int J Mol Sci*, 2019; 20(22):5688.
 - Salo RA, Miettinen T, Laitinen T, Grohn O, Sierra A. Diffusion tensor MRI shows progressive changes in the hippocampus and dentate gyrus after status epilepticus in rat: histological validation with Fourier-based analysis. *Neuroimage*, 2017; 152:221-236.
 - Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2007; 7(4):348-354.
 - Schijns OE, Bisschop J, Rijkers K, Dings J, Vanherle S, Lindsey P, Smeets HJ, Hoogland G. GAT-1 (rs2697153) and GAT-3 (rs2272400) polymorphisms are associated with febrile seizures and temporal lobe epilepsy. *Epileptic Disord*, 2020; 22(2):176-182.
 - Schousboe A, Larsson OM, Sarup A, White HS. Role of the betaine/GABA transporter (BGT-1/GAT2) for the control of epilepsy. *Eur J Pharmacol*, 2004; 500(1-3):281-287.
 - Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti MG, Scerni DA, Calderazzo L, Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc*, 2009; 81(3):345-365.
 - Segal M. Synaptic activation of a cholinergic receptor in rat hippocampus. *Brain Res*, 1988; 452(1-2):79-86.
 - Sidhu MK, Duncan JS, Sander JW. Neuroimaging in epilepsy. *Curr Opin Neurol*, 2018; 31(4):371-378.
 - Sierra A, Gröhn O, Pitkänen A. Imaging microstructural damage and plasticity in the hippocampus during epileptogenesis. *Neuroscience*, 2015; 309:162-172.
 - Silveira D, Cha BH, Holmes GL. Effects of lesions of basal forebrain cholinergic neurons in newborn rats on susceptibility to seizures. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002; 139(2):277-283.

- Sloviter RS. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*, 1987; 235(4784):73-76.
- Sloviter RS. Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, 1991; 1(1):41-66.
- Soares JI, Da Costa C, Ferreira MH, Andrade PA, Maia GH, Lukoyanov NV. Partial depletion of septohippocampal cholinergic cells reduces seizure susceptibility, but does not mitigate hippocampal neurodegeneration in the kainate model of epilepsy. *Brain Res*, 2019; 1717:235-246.
- Somjen GG. Ion regulation in the brain: implications for pathophysiology. *Neuroscientist*, 2002; 8(3):254-267.
- Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S. Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol*, 2003; 551(Pt 3):927-943.
- Soukupova M, Binaschi A, Falcicchia C, Zucchini S, Roncon P, Palma E, Magri E, Grandi E, Simonato M. Impairment of GABA release in the hippocampus at the time of the first spontaneous seizure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*, 2014; 257:39-49.
- Stables JP, Bertram EH, White HS, Coulter DA, Dichter MA, Jacobs MP, Löscher W, Lowenstein DH, Moshe SL, Noebels JL, Davis M. Models for epilepsy and epileptogenesis: report from the NIH workshop, Bethesda, Maryland. *Epilepsia*, 2002; 43(11):1410-1420.
- Stevens DR, Cotman CW. Excitatory amino acid antagonists depress transmission in hippocampal projections to the lateral septum. *Brain Res*, 1986; 382(2):437-440.
- Stuart G, Spruston N, Sakmann B, Häusser M. Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci*, 1997; 20(3):125-131.

- Swanson LW, Cowan WM. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol*, 1977; 172(1):49-84.
- Swanson LW, Cowan WM. The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol*, 1979; 186(4):621-655.
- Tang FR, Lee WL. Expression of the group II and III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurocytol*, 2001; 30(2):137-143.
- Teles-Griolo Ruivo LM, Mellor JR. Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Front Synaptic Neurosci*, 2013; 5:2.
- Tellez-Zenteno JF, Matijevic S, Wiebe S. Somatic comorbidity of epilepsy in the general population in Canada. *Epilepsia*, 2005; 46(12):1955-1962.
- Tellez-Zenteno JF, Hernandez-Ronquillo L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Treat*, 2012; 2012:630853.
- Thom M. Review: hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2014; 40(5):520-543.
- Thomas AG, Koumellis P, Dineen RA. The fornix in health and disease: an imaging review. *Radiographics*, 2011; 31(4):1107-1121.
- Thomas PM, Phillips JP, Delanty N, O'Connor WT. Elevated extracellular levels of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid within the intraoperative, spontaneously epileptiform human hippocampus. *Epilepsy Res*, 2003; 54(1):73-79.
- Thomas PM, Phillips JP, O'Connor WT. Hippocampal microdialysis during spontaneous intraoperative epileptiform activity. *Acta Neurochir (Wien)*, 2004; 146(2):143-151.
- Toth K, Borhegyi Z, Freund TF. Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *J Neurosci*, 1993; 13(9):3712-3724.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural,

- electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*, 1983; 9(3):315-335.
- Unal G, Joshi A, Viney TJ, Kis V, Somogyi P. Synaptic targets of medial septal projections in the hippocampus and extrahippocampal cortices of the mouse. *J Neurosci*, 2015; 35(48):15812-15826.
 - Vaillend C, Mason SE, Cuttle MF, Alger BE. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na⁺-K⁺-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. *J Neurophysiol*, 2002; 88(6):2963-2978.
 - van der Hel WS, Notenboom RGE, Bos IWM, van Rijen PC, van Veelen CWM, de Graan PNE. Reduced glutamine synthetase in hippocampal areas with neuron loss in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 2005; 64(2):326-333.
 - van Eijsden P, Otte WM, van der Hel WS, van Nieuwenhuizen O, Dijkhuizen RM, de Graaf RA, Braun KPJ. In vivo diffusion tensor imaging and ex vivo histologic characterization of white matter pathology in a post-status epilepticus model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2011; 52(4):841-45.
 - Veraart J, Fieremans E, Novikov DS. Diffusion MRI noise mapping using random matrix theory. *Magn Reson Med*, 2016a; 76(5):1582-1593.
 - Veraart J, Novikov DS, Christiaens D, Ades-Aron B, Sijbers J, Fieremans E. Denoising of diffusion MRI using random matrix theory. *Neuroimage*, 2016b; 142:394-406.
 - Walhovd KB, Johansen-Berg H, Karadottir RT. Unraveling the secrets of white matter: bridging the gap between cellular, animal and human imaging studies. *Neuroscience*, 2014; 276(100):2-13.
 - Walker MC. Hippocampal Sclerosis: Causes and Prevention. *Semin Neurol*, 2015; 35(3):193-200.
 - Wang H, Huang Y, Coman D, Munbodh R, Dhaher R, Zaveri HP, Hyder F, Eid T. Network evolution in mesial temporal lobe epilepsy revealed by diffusion tensor imaging. *Epilepsia*, 2017; 58(5):824-834.
 - Wilkinson JL. Chapter 10. Olfactory and limbic systems. En: *Neuroanatomy for Medical Students*. 1992. 2a edición. 197-205. Elsevier Ltd.

- Ye Y, Xiong J, Hu J, Kong M, Cheng L, Chen H, Li T, Jiang L. Altered hippocampal myelinated fiber integrity in a lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: a histopathological and stereological investigation. *Brain Res*, 2013; 1522:76-87.
- Zafar S, Jabeen I. Structure, function, and modulation of γ -aminobutyric acid transporter 1 (GAT1) in neurological disorders: a pharmacoinformatic prospective. *Front Chem*, 2018; 6:397.
- Zhang L, McBain CJ. Potassium conductances underlying repolarization and after-hyperpolarization in rat CA1 hippocampal interneurons. *J Physiol*, 1995; 488(Pt 3):661-672.