



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOCAMPAL Y LA HIPEREXCITABILIDAD  
INDUCIDA CON 4-AMINOPIRIDINA POR LA HIPOXIA INTERMITENTE  
CRÓNICA Y LA MANIPULACIÓN MICROGLIAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**M. en C. BENJAMÍN VILLASANA SALAZAR**

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. José Fernando Peña Ortega  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA - UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Claudia González Espinosa  
DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA – CINVESTAV SEDE SUR

Dr. José Jesús García Colunga  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA - UNAM

Querétaro, Querétaro

Agosto, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*Cuando emprendas tu viaje a Ítaca  
pide que el camino sea largo,  
lleno de aventuras, lleno de experiencias.  
No temas a los lestrigones ni a los cíclopes  
ni al colérico Poseidón,  
seres tales jamás hallarás en tu camino,  
si tu pensar es elevado, si selecta  
es la emoción que toca tu espíritu y tu cuerpo.  
Ni a los lestrigones ni a los cíclopes  
ni al salvaje Poseidón encontrarás,  
si no los llevas dentro de tu alma,  
si no los yergue tu alma ante ti.*

*Pide que el camino sea largo.  
Que muchas sean las mañanas de verano  
en que llegues - ¡con qué placer y alegría!-  
a puertos nunca vistos antes.  
Detente en los emporios de Fenicia  
y hazte con hermosas mercancías,  
nácar y coral, ámbar y ébano  
y toda suerte de perfumes sensuales,  
cuantos más abundantes perfumes sensuales puedas.  
Ve a muchas ciudades egipcias  
a aprender, a aprender de sus sabios.*

*Ten siempre a Ítaca en tu mente.  
Llegar allí es tu destino.  
Mas no apresures nunca el viaje.  
Mejor que dure muchos años  
y atracar, viejo ya, en la isla,  
enriquecido de cuanto ganaste en el camino  
sin aguantar a que Ítaca te enriquezca.*

*Ítaca te brindó tan hermoso viaje.  
Sin ella no habrías emprendido el camino.  
Pero no tiene ya nada que darte.*

*Aunque la halles pobre, Ítaca no te ha engañado.  
Así, sabio como te has vuelto, con tanta experiencia,  
entenderás ya qué significan las Ítacas.*

*Camino a Ítaca de Constantino Cavafis*

## **Agradecimientos institucionales.**

En primer lugar, agradezco al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la formación recibida durante mi participación en su programa de doctorado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca con la que me fue posible dedicarme de tiempo completo a mis estudios y a la realización de mi proyecto de doctorado.

Número de becario: 587113

CVU: 669628

Esta tesis fue financiada con proyectos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, México (PAPIIT: IG200521) y del CONACYT (A1-S-7540).

Agradezco a mi tutor principal, el Dr. José Fernando Peña Ortega y a los miembros de mi comité tutor, la Dra. Claudia González Espinosa y el Dr. José Jesús García Colunga, por su guía y retroalimentación durante el desarrollo de este proyecto doctoral.

También, agradezco a los miembros de mi jurado de examen, la Dra. Aliesha Araceli González Arenas, la Dra. Anahí Chavarría Krauser, la Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta y el Dr. Luis Concha Loyola, cuyos comentarios y sugerencias ayudaron a enriquecer esta tesis.

Por último, agradezco el apoyo brindado por parte del personal de las Unidades de Apoyo a la Investigación del Instituto de Neurobiología (INB) de la UNAM, a la Dra. Alejandra Castilla León, a la Dra. María Carbajo Mata y al MVZ. José Martín García Servín, del Laboratorio Universitario de Bioterio; a la M. en C. Adriana González Gallardo, de la Unidad de Proteogenómica; a la Dra. Elsa Nydia Hernández Ríos y a la Dra. Ericka Alejandra De los Ríos Arellano, de la Unidad de Microscopía; y a la Dra. Deisy Gasca Martínez, de la Unidad de Análisis Conductual. También agradezco el apoyo brindado por el Dr. Benito Ordaz Sánchez, técnico académico del laboratorio C-01, y por el Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez, catedrático CONACYT en el laboratorio C-01.



## **A título personal.**

A mi mamá y a Alejandro. Su apoyo y consejos sin duda me ayudaron en los momentos más difíciles de este proceso.

A mi papá y a mi hermana, a quienes siempre llevo en el corazón. Gracias por su apoyo.

A Rebeca, por todo su amor y apoyo incondicional, tanto personal como profesional, a lo largo del desarrollo de esta tesis. También por alentarme cada día a ser mejor persona y mejor científico. Gracias a ti pude disfrutar de la vida y poder concluir con este proceso.

Al Dr. David Martínez Vargas, amigo y colega, quien me ha mostrado que la ciencia es un eterno aprendizaje y que la perseverancia y el esfuerzo constante son cruciales para poder realizar investigación científica.

A Abraham Betancourt, Elva Adán, Carlos Fernando Montes y Luis Márquez, por brindarme su amistad y compartir grandes experiencias durante mi estancia en el Instituto de Neurobiología.

A mis compañeros y excompañeros del laboratorio C-01: Jonathan Lorea, Keila Rojas, Karla Salgado, Guadalupe Contreras, Laura Pinedo, Lorena Xolalpa, Ignacio Martínez, David Alcántara, Estefanía Guerrero, Eduardo Morado, Polet Camacho, Kenia Pardo, Anahí Salas, César Zaa, Perla González, Ramsés Noguez, Naga Bhavya, Stephanie Thebault, Ángel Robles, Armando Ortega, Josué Juárez, Ernesto Flores, José María Cornejo, Ana Karen Pimentel, Martín Macias, Arturo Isla, Sheini Sánchez, Keiry García, Guadalupe Manrique y Víctor Vargas. Particularmente, le agradezco a Polet Camacho Hernández por su apoyo en la implementación de la técnica de ELISA.

A mi tutor, el Dr. José Fernando Peña Ortega, por brindarme un espacio en su laboratorio en donde pude desarrollarme tanto académica como personalmente, así como por su apoyo durante la realización de mis estudios de posgrado.

Finalmente le agradezco a nuestra máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme recibido en sus aulas durante toda mi formación académica, desde la Iniciación Universitaria hasta el Doctorado, en donde siempre recibí educación de calidad y las oportunidades necesarias para mi desarrollo profesional.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>12</b>
<b>El síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) en pacientes con epilepsia.....</b>	<b>12</b>
Definición del SAOS. ....	12
La hiperexcitabilidad neuronal y la epilepsia. ....	13
Modelos experimentales de hiperexcitabilidad neuronal y de epilepsia.....	15
Comorbilidad entre el SAOS y la epilepsia. ....	18
<b>La neuroinflamación y su asociación con la epilepsia y el SAOS. ....</b>	<b>20</b>
La neuroinflamación. ....	20
Neuroinflamación en la epilepsia.....	22
Neuroinflamación en el SAOS. ....	25
<b>Mecanismos de neuroinflamación inducidos por la hiperexcitabilidad y la hipoxia intermitente crónica (HIC).....</b>	<b>27</b>
Neuroinflamación en modelos experimentales de hiperexcitabilidad y de epilepsia.....	27
Neuroinflamación inducida por la HIC. ....	29
<b>Efecto de las moléculas proinflamatorias sobre la actividad neuronal y su hiperexcitabilidad. .....</b>	<b>32</b>
La interleucina (IL) 1 $\beta$ (IL1 $\beta$ ).....	32
El factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ).....	37
La IL6.....	40
Otras moléculas proinflamatorias.....	42
Moléculas proinflamatorias provenientes de la microglía.....	43
<b>Papel de la manipulación farmacológica de la microglía en los efectos inducidos por la HIC y en la inducción experimental de hiperexcitabilidad.....</b>	<b>44</b>
La microglía. ....	44
Manipulación farmacológica de la microglía.....	48
Manipulación farmacológica de la microglía en los efectos inducidos por la HIC. ....	50
Manipulación farmacológica de la microglía en modelos experimentales de hiperexcitabilidad y de epilepsia.....	52
<b>Estrategias experimentales de manipulación selectiva de los macrófagos cerebrales.....</b>	<b>55</b>
Manipulación genética. ....	56

Depleción de los macrófagos cerebrales .....	57
La optogenética.....	59
La quimiogenética.....	60
<b>Planteamiento del problema de investigación.....</b>	<b>63</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>65</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>66</b>
Objetivo general.....	66
Objetivos particulares.....	66
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
<b>Animales.....</b>	<b>67</b>
<b>Experimentos <i>in vitro</i> con rebanadas de hipocampo de animales sometidos a hipoxia intermitente crónica (HIC).....</b>	<b>70</b>
Protocolo de HIC <i>in vivo</i> .....	70
Extracción de rebanadas de hipocampo.....	72
Registro electrofisiológico de la actividad hipocampal e inducción de hiperexcitabilidad con 4-aminopiridina (4-AP) <i>in vitro</i> .....	72
<b>Experimentos con animales anestesiados.....</b>	<b>74</b>
Cirugía estereotáxica y registros electrofisiológicos de la actividad hipocampal en animales anestesiados.....	74
Registro electrofisiológico de la actividad hipocampal e inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP y pentilinetetrazol (PTZ) en animales anestesiados.....	75
Administración intracerebroventricular de lipopolisacárido (LPS) y de interleucina 1 beta (IL1 $\beta$ ) en animales anestesiados.....	75
Manipulación optogenética en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2.....	76
Manipulación optogenética en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 y registro electrofisiológico de la actividad multiunitaria hipocampal con un arreglo de multielectrodos.....	76
Manipulación quimiogenética de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en animales anestesiados.....	77
Coadministración intracerebroventricular de la proteína antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL1Ra) y de clozapina-N-óxido (CNO) en animales anestesiados.....	78
<b>Grupos experimentales.....</b>	<b>79</b>
Experimentos <i>in vitro</i> con rebanadas de hipocampo.....	79
Efecto de la HIC sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP <i>in vitro</i> .....	79
Efecto de la reoxigenación (ReOx) sobre la modulación producida por la HIC en la excitabilidad hipocampal y en la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP <i>in vitro</i> .....	79
Experimentos con animales anestesiados.....	80
Manipulación farmacológica de la microglía con LPS en animales anestesiados.....	80
Manipulación optogenética en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2.....	81

Manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.....	83
Manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di.....	88
<b>Perfusión y obtención de muestras para análisis histológico.....</b>	<b>90</b>
<b>Tinción de Nissl.....</b>	<b>91</b>
<b>Inmunofluorescencia.....</b>	<b>92</b>
<b>Genotipificación de animales transgénicos.....</b>	<b>92</b>
<b>Cuantificación de la expresión proteica de IL1<math>\beta</math> hipocampal.....</b>	<b>95</b>
<b>Análisis de datos.....</b>	<b>96</b>
Actividad electrofisiológica.....	96
Actividad multiunitaria hipocampal.....	97
Análisis morfológico de la microglía y cuantificación de núcleos celulares.....	97
Análisis estadístico.....	99
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>100</b>
<b>La HIC incrementa la actividad hipocampal en la banda de frecuencia gamma y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP <i>in vitro</i>.....</b>	<b>100</b>
Peso de los animales y mortalidad después del protocolo de HIC.....	100
La HIC aumenta la actividad electrofisiológica basal del hipocampo en la banda de frecuencia gamma <i>in vitro</i> .....	101
La HIC exacerba la hiperexcitabilidad hipocampal inducida con 4-AP <i>in vitro</i> .....	102
<b>Los efectos de la HIC sobre la actividad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP son revertidos después de un periodo de reoxigenación (ReOx).....</b>	<b>105</b>
Las alteraciones inducidas por la HIC sobre la actividad electrofisiológica hipocampal <i>in vitro</i> son revertidas después de un periodo de ReOx.....	105
Las alteraciones inducidas por la HIC sobre la hiperexcitabilidad hipocampal inducida con 4-AP <i>in vitro</i> son revertidas después de un periodo de ReOx.....	107
<b>Manipulación farmacológica de la microglía.....</b>	<b>110</b>
La administración intracerebroventricular de LPS no afecta la actividad electrofisiológica del hipocampo en animales anestesiados.....	110
La administración intracerebroventricular de LPS no afecta la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP en animales anestesiados.....	112
<b>Manipulación optogénica en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2.....</b>	<b>116</b>
La manipulación optogénica en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 incrementa la actividad electrofisiológica hipocampal.....	116
La manipulación optogénica en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 exacerba la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP.....	118
La manipulación optogénica en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 potencia la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP.....	120
La manipulación optogénica en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 incrementa la densidad microglial en el hipocampo e induce cambios morfológicos en estas células.....	122

Las neuronas hipocampales de los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 responden a la estimulación optogenética. ....	125
La proteína ChR2 es expresada de forma constitutiva en animales de la cepa Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP). ....	128
<b>Manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales.....</b>	<b>131</b>
Activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales. ....	131
Los receptores diseñados para responder exclusivamente a fármacos diseñados (DREADDs) hM3Dq están expresados exclusivamente en los macrófagos cerebrales de animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. ....	131
La activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales aumenta la excitabilidad hipocampal e induce actividad epileptiforme en animales anestesiados. ....	133
La activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales exacerba la inducción de hiperexcitabilidad hipocampal en animales anestesiados. ....	136
La activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales potencia la hiperexcitabilidad hipocampal ya establecida en animales anestesiados. ....	141
La activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales incrementa la densidad microglial y altera la morfología de la microglía hipocampal. ....	143
El efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad es mediado por el receptor de la interleucina 1 (IL1R) en animales anestesiados. ....	145
La administración intracerebroventricular de IL1 $\beta$ exacerba la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad en animales anestesiados. ....	152
Inhibición quimiogénica de la activación de la microglía y de los macrófagos no parenquimales. ....	161
Caracterización de la expresión de los DREADDs hM4Di en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. ....	161
La activación de los DREADDs hM4Di en la microglía y en los macrófagos no parenquimales inhibe la excitabilidad hipocampal en animales anestesiados. ....	163
La activación de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales bloquea parcialmente la inducción de hiperexcitabilidad en animales anestesiados. ....	165
La activación de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales no modula la hiperexcitabilidad ya inducida en animales anestesiados. ....	169
La activación de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales no altera la densidad microglial en el hipocampo ni la morfología de estas células. ....	171
 <b>DISCUSIÓN .....</b>	 <b>174</b>
 <b>CONCLUSIONES .....</b>	 <b>206</b>
 <b>REFERENCIAS.....</b>	 <b>208</b>
 <b>ANEXOS .....</b>	 <b>258</b>

<b>Anexo 1 – Caracterización del efecto de la estimulación optogenética sobre la excitabilidad hipocampal en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2. ....</b>	<b>258</b>
<b>Anexo 2 – Caracterización de la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2. ....</b>	<b>260</b>
<b>Anexo 3 – Caracterización de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2. ....</b>	<b>262</b>
<b>Anexo 4 – Caracterización de la expresión de las proteínas de fusión hM3Dq-mCitrina y hM4Di-mCitrina en macrófagos no parenquimales de los espacios perivascuales del hipocampo de animales de las cepas Cx3cr1/hM3Dq y Cx3cr1/hM4Di. ....</b>	<b>264</b>
<b>Anexo 5– Caracterización del efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la actividad electrofisiológica hipocampal en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.....</b>	<b>266</b>
<b>Anexo 6 – Caracterización de la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.....</b>	<b>268</b>
<b>Anexo 7 – Caracterización de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.....</b>	<b>270</b>
<b>Anexo 8 – Caracterización de la expresión proteica de IL1<math>\beta</math> hipocampal después de la administración intracerebroventricular de CNO en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. ....</b>	<b>272</b>
<b>Anexo 9 – Caracterización de la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di.....</b>	<b>273</b>
<b>Anexo 10 – Caracterización de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di.....</b>	<b>275</b>
<b>Anexo 11 – Publicaciones generadas durante mis estudios de doctorado.....</b>	<b>277</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>4-AP</b>	4-aminopiridina
<b>ADAM17</b>	Enzima desintegrina y metaloproteasa 17 (por sus siglas en inglés)
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato
<b>APs</b>	Proteínas activadoras (por sus siglas en inglés)
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro (por sus siglas en inglés)
<b>BrdU</b>	Bromodesoxiuridina
<b>CB1R</b>	Receptores a cannabinoides tipo 1 (por sus siglas en inglés)
<b>CB2R</b>	Receptores a cannabinoides tipo 2 (por sus siglas en inglés)
<b>ChR2</b>	Canalrodopsina 2 (por sus siglas en inglés)
<b>CNO</b>	Clozapina-N-Óxido
<b>COX2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>CPAP</b>	Presión positiva continua de aire en las vías respiratorias (por sus siglas en inglés)
<b>CRAC</b>	Canales de calcio activados por calcio (por sus siglas en inglés)
<b>CRE</b>	Elemento de respuesta al AMP cíclico (por sus siglas en inglés)
<b>CSF1R</b>	Receptor del factor estimulador de colonias tipo 1 (por sus siglas en inglés)
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DREADDs</b>	Receptores diseñados para responder exclusivamente a fármacos diseñados (por sus siglas en inglés)
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (por sus siglas en inglés)
<b>eYFP</b>	Proteína amarilla fluorescente aumentada (por sus siglas en inglés)
<b>FFT</b>	Transformada rápida de Fourier (por sus siglas en inglés)
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>GLUT1</b>	Transportador de glucosa tipo 1 (por sus siglas en inglés)
<b>Gp130</b>	glicoproteína de membrana 130
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HIC</b>	Hipoxia intermitente crónica
<b>HMGB1</b>	Proteína de alta movilidad del grupo 1 (por sus siglas en inglés)
<b>IKB</b>	Proteína inhibidora del factor de transcripción NFκB (por sus siglas en inglés)
<b>Iba1</b>	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (por sus siglas en inglés)
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IKKB</b>	Cinasa de IKB subunidad β (por sus siglas en inglés)

<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL1R</b>	Receptor de la interleucina 1 (por sus siglas en inglés)
<b>IL1Ra</b>	Proteína antagonista del receptor de la interleucina 1 (por sus siglas en inglés)
<b>IL1RAP</b>	Proteína accesoria del IL1R (por sus siglas en inglés)
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>ILAE</b>	Liga internacional contra la epilepsia (por sus siglas en inglés)
<b>INB</b>	Instituto de Neurobiología
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible (por sus siglas en inglés)
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>IRAK</b>	Cinasas asociadas al receptor IL1R (por sus siglas en inglés)
<b>JAK1</b>	Cinasa <i>Janus</i> tipo 1 (por sus siglas en inglés)
<b>LCRa</b>	Líquido cefalorraquídeo artificial
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MADs</b>	Moléculas asociadas a daño celular
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos (por sus siglas en inglés)
<b>MAPs</b>	Moléculas asociadas a patógenos
<b>MYD88</b>	Factor de diferenciación mieloide 88 (por sus siglas en inglés)
<b>NEMO</b>	Modulador esencial del factor de transcripción NF $\kappa$ B (por sus siglas en inglés)
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de células T activadas (por sus siglas en inglés)
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras $\kappa$ de las células B activadas (por sus siglas en inglés)
<b>NLRP1</b>	Dominio de la familia del receptor tipo NOD que contiene pirina tipo 1 (por sus siglas en inglés)
<b>P2Y12R</b>	Receptores purinérgicos tipo P2Y12 (por sus siglas en inglés)
<b>PBS</b>	Solución de buffer de fosfatos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PIP2</b>	Fosfatidil inositol difosfato
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C (por sus siglas en inglés)
<b>PLX</b>	Plexikon
<b>PTX</b>	Toxina pertussis (por sus siglas en inglés)
<b>PTZ</b>	Pentilenetetrazol
<b>ReaChR</b>	Canalrodopsina activada por luz roja (por sus siglas en inglés)
<b>ReOx</b>	Reoxigenación
<b>RRPs</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>SAOS</b>	Síndrome de apnea obstructiva del sueño
<b>STAT3/5</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción tipo 3/5 (por sus siglas en inglés)



<b>TAB2</b>	Proteína de unión a TAK1 tipo 2 (por sus siglas en inglés)
<b>TACE</b>	Enzima convertidora del TNF $\alpha$ (por sus siglas en inglés)
<b>TAK1</b>	Cinasa activada por el TGF $\beta$ tipo 1 (por sus siglas en inglés)
<b>TEP</b>	Tomografía por emisión de positrones
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$ (por sus siglas en inglés)
<b>TLR</b>	Receptores tipo <i>Toll</i> (por sus siglas en inglés)
<b>Tmem119</b>	Proteína transmembranal 119 (por sus siglas en inglés)
<b>TNFR</b>	Receptor del factor de necrosis tumoral
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (por sus siglas en inglés)
<b>TRAF6</b>	Factor asociado al receptor de TNF tipo 6 (por sus siglas en inglés)
<b>TRPV4</b>	Receptores de potencial transitorio tipo V4 (por sus siglas en inglés)
<b>TSPO</b>	Proteína translocadora mitocondrial (por sus siglas en inglés)
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México

## RESUMEN

El síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) se presenta en una gran proporción de pacientes con epilepsia. La coexistencia de ambas patologías agrava la condición clínica de estos pacientes, incrementando la frecuencia y la severidad de las crisis epilépticas, así como los signos/síntomas asociados al SAOS. Por otro lado, la aplicación de tratamientos enfocados en resolver el SAOS en pacientes con epilepsia, como la aplicación de presión positiva continua de aire en las vías respiratorias (CPAP, por sus siglas en inglés) o las intervenciones quirúrgicas en las vías respiratorias superiores (como la tonsilectomía, la adenoidectomía y la uvuloplastia) e inferiores (como la traqueostomía), disminuyen la frecuencia y la severidad de las crisis epilépticas. Lo anterior, sugiere que el SAOS podría incrementar la excitabilidad neuronal y precipitar la inducción de hiperexcitabilidad y que sus efectos son reversibles tras el restablecimiento de la oxigenación “normal”. A pesar de estas evidencias clínicas, aún no ha sido posible demostrar de forma experimental, primero, que la inducción de hipoxia intermitente crónica (HIC), que es la principal consecuencia inmediata del SAOS, favorezca la generación de hiperexcitabilidad neuronal y, segundo, qué mecanismos podrían estar mediando este efecto. Por lo anterior, en esta tesis nos planteamos investigar el efecto de la HIC sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-aminopiridina (4-AP). Nuestros resultados mostraron que la HIC incrementa la excitabilidad hipocampal en la banda de frecuencia gamma y exacerba la inducción de hiperexcitabilidad. Adicionalmente, observamos que dichos efectos fueron revertidos después de un periodo de reoxigenación (ReOx), sugiriendo que los efectos de la HIC sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP son transitorios. Por otro lado, se ha reportado que la HIC induce neuroinflamación y activación microglial. Considerando que las moléculas proinflamatorias provenientes de la microglía activada favorecen la excitabilidad neuronal y la inducción de hiperexcitabilidad, también hipotetizamos que la activación microglial podría ser uno de los mecanismos por los que la HIC ejerce sus efectos proepileptiformes. Sin embargo, el papel de la activación microglial en la excitabilidad neuronal y la inducción de hiperexcitabilidad aún no es concluyente,

debido, en gran medida, a la inespecificidad celular de las herramientas farmacológicas usadas hasta el momento. Lo anterior, ha planteado como necesario el uso de estrategias experimentales de manipulación celular específica para evaluar el papel de la activación microglial en el desarrollo de la hiperexcitabilidad. Para explorar esta posibilidad, en la presente tesis, nos propusimos investigar el rol específico de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental, utilizando al lipopolisacárido (LPS) para manipular a la microglía y a los macrófagos no parenquimales de forma no selectiva y a la optogenética y a la quimiogenética para manipular de forma selectiva a estas células. Nuestros resultados mostraron que la activación farmacológica no selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales con LPS no indujo efectos sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP. Por otro lado, la activación optogenética y quimiogenética de la microglía y de los macrófagos no parenquimales indujo un incremento robusto de la excitabilidad hipocampal y de la hiperexcitabilidad, en una forma dependiente de la liberación de IL1 $\beta$ , pues la administración intracerebroventricular de la proteína antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL1Ra, por sus siglas en inglés) bloqueó los efectos producidos por la activación quimiogenética de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, así como la aplicación intracerebroventricular de IL1 $\beta$  incrementó la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad. Por último, la inhibición quimiogenética de la activación microglial inhibió la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad. En conclusión, nuestros resultados muestran que la HIC favorece la excitabilidad neuronal y la inducción de hiperexcitabilidad y que estos efectos son revertidos después de un periodo de ReOx. Adicionalmente, nuestros resultados mostraron que la activación de la microglía y de los macrófagos no parenquimales exacerba la excitabilidad neuronal y la inducción de hiperexcitabilidad, sugiriendo que los efectos proepileptiformes inducidos por la HIC podrían estar mediados por la activación de la microglía y de los macrófagos parenquimales y que podrían ser mitigados por la inhibición de la activación de estas células.

## ABSTRACT

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) occurs in a large proportion of patients with epilepsy. The coexistence of both pathologies aggravates the clinical condition of these patients, increasing the frequency and severity of epileptic seizures, as well as the signs/symptoms associated with OSAS. On the other hand, the application of treatments focused on resolving OSAS in patients with epilepsy, such as the application of continuous positive airway pressure (CPAP) or surgical interventions in the upper (such as tonsillectomy, adenoidectomy and uvuloplasty) and lower (such as tracheostomy) respiratory tract, reduce the frequency and severity of epileptic seizures. The foregoing suggests that OSAS could increase neuronal excitability and precipitate the induction of hyperexcitability and that its effects are reversible after reestablishing "normal" oxygenation. Despite this clinical evidence, it has not yet been possible to demonstrate experimentally, first, that the induction of chronic intermittent hypoxia (CIH), which is the main immediate consequence of OSAS, favors the generation of neuronal hyperexcitability and, second, what mechanisms could be mediating this effect. Therefore, in this thesis we intend to investigate the effect of CIH on hippocampal excitability and hyperexcitability induced with 4-aminopyridine (4-AP). Our results showed that CIH increases hippocampal excitability in the gamma frequency band and exacerbates the induction of hyperexcitability. Additionally, we observed that these effects were reversed after a period of reoxygenation (ReOx), suggesting that the effects of CIH on hippocampal excitability and 4-AP-induced hyperexcitability are transient. On the other hand, CIH has been reported to induce neuroinflammation and microglial activation. Considering that proinflammatory molecules from activated microglia favor neuronal excitability and the induction of hyperexcitability, we also hypothesize that microglial activation could be one of the mechanisms by which CIH exerts its pro-epileptiform effects. However, the role of microglial activation in neuronal excitability and induction of hyperexcitability is not yet conclusive, mainly due to the cellular non-specificity of the pharmacological tools used to date. This has raised the need for the use of experimental strategies for specific cell modulation to evaluate the role of microglial and non-parenchymal macrophages activation in the

development of hyperexcitability. To explore this possibility, in this thesis, we aimed to investigate the specific role of microglia and non-parenchymal macrophages on hippocampal excitability and experimentally induced hyperexcitability, using lipopolysaccharide (LPS) to non-selectively manipulate microglia and non-parenchymal macrophages, and optogenetics and chemogenetics to selectively manipulate these cells. Our results showed that non-selective pharmacological activation of microglia and non-parenchymal macrophages with LPS did not induce effects on hippocampal excitability and 4-AP-induced hyperexcitability. On the other hand, the optogenetic and chemogenetic activation of microglia and non-parenchymal macrophages induced a robust increase in hippocampal excitability and hyperexcitability, in an IL1 $\beta$ -release-dependent manner, since the intracerebroventricular administration of the interleukin 1 receptor antagonist (IL1Ra) protein blocked the effects produced by the chemogenetic activation of microglia and non-parenchymal macrophages; and the intracerebroventricular application of IL1 $\beta$  increased hippocampal excitability and hyperexcitability. Finally, chemogenetic inhibition of microglial and non-parenchymal macrophages activation inhibited hippocampal excitability and induction of hyperexcitability. In conclusion, our results show that CIH favors neuronal excitability and the induction of hyperexcitability and that these effects are reversed after a period of ReOx. Additionally, our results showed that activation of microglia and non-parenchymal macrophages exacerbates neuronal excitability and the induction of hyperexcitability, suggesting that CIH-induced proepileptiform effects could be mediated by the activation of microglia and non-parenchymal macrophages and that these effects could be mitigated by inhibiting the activation of these cells.

## INTRODUCCIÓN

El síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) es un trastorno del sueño causado por episodios repetitivos de obstrucción total o parcial de las vías respiratorias superiores, debido al colapso recurrente de los músculos de la faringe, resultando en episodios intermitentes de apnea durante el sueño (Chiang, 2006; Dempsey et al., 2010; Rosenzweig et al., 2014a; Sforza & Roche, 2016; Thorpy, 2012; Sateia, 2014; Akashiba et al., 2020). La principal consecuencia inmediata de estos episodios intermitentes de apnea es la hipoxia intermitente crónica (HIC; Dempsey et al., 2010; Labarca et al., 2019). Los pacientes con SAOS presentan una variedad de síntomas/signos negativos que disminuyen su calidad de vida, como ronquidos, fragmentación del sueño, dolores de cabeza, hipersomnolencia durante el día e hiposmia, entre otras (Sforza & Roche, 2016; Laczay & Faulx, 2021). Asimismo, estos pacientes también presentan alteraciones cognitivas, inflamación sistémica, hiperexcitabilidad neuronal y alteraciones estructurales en el cerebro, así como un mayor riesgo de desarrollar patologías cardiovasculares y metabólicas (Gale & Hopkins, 2003; Morrel et al., 2003; Canessa et al., 2012; Mei et al., 2012; Rosenzweig et al., 2014a; Lin et al., 2016; Sforza & Roche, 2016; Kheirandish-Gozal & Gozal 2019; Wang et al., 2021; Laczay & Faulx, 2021).

El SAOS se presenta como comorbilidad en diversas patologías neurológicas, incluyendo a las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, así como en la epilepsia (Malow et al., 2000; Vaughn & D'Cruz, 2003; Höllinger et al., 2006; Yeh et al., 2016; Liguori et al., 2017; Kuo et al., 2021). En cuanto a esta última, la presencia del SAOS es más común en pacientes con epilepsia que en sujetos sanos, presentándose entre el 5 y el 89 % de los pacientes con epilepsia (Malow et al., 2000; Manni et al., 2003; Vaughn & D'Cruz, 2003; Höllinger et al., 2006; Chihorek et al., 2007; Vendrame et al., 2014; Maurousset et al., 2017; McCarter et al., 2018; Söylemez et al., 2020). La presencia del SAOS y de epilepsia resulta en un agravamiento progresivo de ambas patologías, incrementando la frecuencia y la severidad de las crisis epilépticas y los signos/síntomas asociados al SAOS, así como el riesgo de sufrir muerte súbita (Malow et al., 2000; Chihorek et al., 2007).

Asimismo, los pacientes con el SAOS, sin diagnóstico previo de epilepsia, presentan hiperexcitabilidad en el registro electroencefalográfico (Milano et al., 2009), sugiriendo que el SAOS podría incrementar la excitabilidad cerebral y precipitar el desarrollo de epilepsia (Höllinger et al., 2006; Chihorek et al., 2007). Por otro lado, la aplicación de tratamientos terapéuticos enfocados en el SAOS en pacientes con epilepsia, como la presión positiva continua de aire en las vías respiratorias (CPAP, por sus siglas en inglés) o las intervenciones quirúrgicas en las vías respiratorias superiores (como la tonsilectomía, la adenoidectomía y la uvuloplastía) e inferiores (como la traqueostomía), resulta en una disminución de la frecuencia y la severidad de las crisis epilépticas (Devinsky et al., 1994; Koh et al., 2000; Malow et al., 2000; Höllinger et al., 2006; Chihorek et al., 2007; Milano et al., 2009; Segal et al., 2012; Vendrame et al., 2014; Liu & Wang, 2017; Marousset et al., 2017; Shirani et al., 2017; Somboon et al., 2019; Jaseja et al., 2020). Lo anterior, corrobora que la presencia del SAOS favorece a las crisis epilépticas en pacientes con epilepsia y sugiere que los efectos inducidos por el SAOS sobre la epilepsia son reversibles tras el restablecimiento de la respiración “normal”.

A pesar de las múltiples evidencias que asocian al SAOS con la epilepsia, aún no ha sido posible, primero, demostrar de forma experimental que la HIC, que es la principal consecuencia inmediata del SAOS (Dempsey et al., 2010; Labarca et al., 2019), favorezca la generación de hiperexcitabilidad neuronal y, segundo, esclarecer el mecanismo por el que el SAOS incrementa la excitabilidad cerebral y las crisis epilépticas. En cuanto a este último punto, diversas evidencias clínicas y experimentales han sugerido que la neuroinflamación y la activación microglial son factores comunes para el desarrollo del SAOS y de la epilepsia (Vezzani & Granata, 2005; Fabene et al., 2010; Smith et al., 2013; Gorter et al., 2015; Sapin et al., 2015; Alyu & Dikmen, 2016; Eyo et al., 2016; Khaspekov & Frumkina, 2017; Webster et al., 2017; Hiragi et al., 2018; Liu et al., 2020). El papel de la neuroinflamación en la generación de hiperexcitabilidad es claro, puesto que la administración de moléculas proinflamatorias exacerba la excitabilidad neuronal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental (Vezzani et al., 1999; Zheng et al., 2010; Zhao et al., 2018). Sin embargo, el papel de la activación microglial en la excitabilidad

neuronal y en la inducción experimental de hiperexcitabilidad aún no es concluyente, debido a la inespecificidad celular de las estrategias farmacológicas clásicamente utilizadas para manipular a estas células, como el lipopolisacárido (LPS) y la minociclina (Tikka et al., 2001; Möller et al., 2016). El uso de ambas estrategias farmacológicas para activar o inhibir, respectivamente, a los macrófagos no parenquimales ha arrojado resultados contradictorios sobre la inducción experimental de hiperexcitabilidad (Sayyah et al., 2003a; 2003b; Rodgers et al., 2009; Abraham et al., 2012; Nasr et al., 2013; Ahmadi et al., 2013; Ahmadi et al., 2014; Wang et al., 2015; Eslami et al., 2015; Kolosowska et al., 2016). Por lo anterior, se plantea como necesario el uso de estrategias experimentales que permitan manipular de forma selectiva a la microglía y a los macrófagos no parenquimales, para evaluar el papel específico de estas células en la inducción experimental de hiperexcitabilidad.

La optogenética y la quimiogenética son dos estrategias experimentales de manipulación celular específica ampliamente utilizadas en las neurociencias (Forcelli et al., 2017; Vlasov et al., 2018). La optogenética consiste en la expresión selectiva de canales iónicos activados por luz, llamados rodopsinas, en la membrana celular de poblaciones celulares específicas, lo que permite controlar la despolarización o la hiperpolarización del potencial de membrana celular al ser activados (Boyden et al., 2005; Deisseroth, 2011; 2015). Por otro lado, la quimiogenética consiste en la expresión de receptores diseñados para responder exclusivamente a fármacos diseñados (DREADDs, por sus siglas en inglés) en la membrana celular de poblaciones celulares específicas (Urban & Roth, 2007; Ben-Shanan et al., 2016; Dobrzanski & Kossut, 2017; Goutaudier et al., 2019). La aplicación de estrategias experimentales de manipulación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, como la optogenética y la quimiogenética, ha permitido evaluar el papel específico de estas células en distintos procesos fisiológicos y patológicos, a través de la modulación de la liberación de moléculas proinflamatorias provenientes de los macrófagos cerebrales (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Grace et al., 2016; 2018; Binning et al., 2020; Saika et al.,



2020; Coleman et al., 2020; Klawonn et al., 2021; Saika et al., 2021; Laprell et al., 2021; Yi et al., 2021a; 2021b). No obstante, estas estrategias experimentales no han sido utilizadas para evaluar el papel específico de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, o de la inhibición de su activación, en la excitabilidad neuronal del hipocampo y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.

Por lo anterior, en esta tesis, nos planteamos investigar, primero, si la HIC modula la excitabilidad neuronal del hipocampo y la hiperexcitabilidad inducida con 4-aminopiridina (4-AP), así como la posible reversibilidad de sus efectos después de un periodo de reoxigenación (ReOx). Asimismo, nos propusimos investigar el papel específico de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en la excitabilidad neuronal del hipocampo y la inducción experimental de hiperexcitabilidad, al comparar los efectos del LPS para manipular de forma no selectiva a la microglía y a los macrófagos no parenquimales; con los de la optogenética y la quimiogenética para manipular de forma selectiva a estas células.

## **ANTECEDENTES**

### **El síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) en pacientes con epilepsia.**

#### **Definición del SAOS.**

El SAOS es uno de los trastornos del sueño más comunes en el mundo, con una prevalencia de entre el 6 y el 32 % de la población adulta (Young et al., 1993; Piccirillo, 2000; Young et al., 2002; Pujabi et al., 2008; Dashzeveg et al., 2021; Guerrero-Zúñiga et al., 2022). El SAOS es causado por episodios repetitivos de obstrucción total o parcial de las vías respiratorias superiores, debido al colapso recurrente de los músculos de la faringe, teniendo como resultado episodios intermitentes de apnea durante el sueño (Chiang, 2006; Dempsey et al., 2010; Rosenzweig et al., 2014a; Sforza & Roche, 2016; Thorpy, 2012; Sateia, 2014; Akashiba et al., 2020). La principal consecuencia inmediata de estos episodios intermitentes de apnea es la HIC (Dempsey et al., 2010; Labarca et al., 2019). Los pacientes con SAOS comúnmente presentan síntomas/signos negativos que disminuyen sustancialmente su calidad de vida, como ronquidos, fragmentación del sueño, dolores de cabeza, hipersomnolencia durante el día, hiposmia, incapacidad laboral y un aumento en el riesgo de sufrir muerte por accidentes vehiculares e industriales (Young et al., 1993; Piccirillo, 2000; Canessa et al., 2011; Thorpy, 2012; Sforza & Roche, 2016; Magliulo et al., 2018; Dashzeveg et al., 2021; Riha et al., 2021; Agrafiotis et al., 2022; Dong et al., 2022). Aunado a esto, los pacientes con SAOS presentan mayor riesgo de desarrollar patologías cardiovasculares y metabólicas como la hipertensión, las arritmias cardíacas, los accidentes cerebrovasculares y la diabetes tipo 2 (Laczay & Faulx, 2021). Los pacientes con SAOS también presentan alteraciones cognitivas, hiperexcitabilidad neuronal, inflamación sistémica y alteraciones estructurales en el cerebro, incluido el hipocampo (Gale & Hopkins, 2003; Morrel et al., 2003; Milano et al., 2009; Canessa et al., 2012; Mei et al., 2012; Rosenzweig et al., 2014a; Lin et al., 2016; Kheirandish-Gozal & Gozal 2019; Wang et al., 2021). Por otro lado, se ha reportado que el SAOS es una comorbilidad con patologías neurológicas, incluidas las enfermedades de

Alzheimer y de Parkinson, así como la epilepsia (Malow et al., 2000; Vaughn & D'Cruz, 2003; Höllinger et al., 2006; Yeh et al., 2016; Liguori et al., 2017; Kuo et al., 2021).

### **La hiperexcitabilidad neuronal y la epilepsia.**

La actividad eléctrica del tejido nervioso es el resultado de un balance delicado entre la excitación y la inhibición de los circuitos neuronales, que regula la excitabilidad neuronal y la sincronización entre los elementos de los circuitos neuronales (Buzsáki et al., 2012). En condiciones fisiológicas, la excitabilidad neuronal y la sincronización de los circuitos neuronales permiten el procesamiento e intercambio apropiado de la información entre estructuras neuronales (Buzsáki et al., 2012), como en el caso de las estructuras cerebrales sensoriales (por ejemplo, el bulbo olfatorio; Hernández-Soto et al., 2022), y son regulados por mecanismos homeostáticos que permiten el restablecimiento de la actividad fisiológica (Buzsáki et al., 2012). Sin embargo, cuando la excitabilidad y la sincronización neuronal ocurren de forma desregulada e impredecible, e incluso crónicamente, se da lugar a la hiperexcitabilidad y la hipersincronización de los circuitos neuronales, resultando en una condición patológica (Badawy et al., 2009a; 2009b; Buzsáki et al., 2012). Por ejemplo, la presencia de hiperexcitabilidad e hipersincronización neuronal es una condición característica de una patología neurológica llamada epilepsia (Fisher et al., 2005; Badawy et al., 2009a; 2009b), aunque también es común en una variedad de padecimientos neurológicos, incluyendo la esquizofrenia, las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, entre otras (Heckers et al., 2015; Busche et al., 2015; Palop & Mucke, 2016; Campanelli et al., 2022).

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica que afecta aproximadamente a 50 millones de personas, es decir, al 1 % de la población mundial (Organización Panamericana de la Salud, 2011; Fisher et al., 2014; Organización Mundial de la Salud, 2019), siendo uno de los problemas de salud pública más relevantes del mundo. La incidencia y prevalencia de la epilepsia en países en vías de desarrollo, entre los que se incluye México, es mayor comparado con países desarrollados (Diagana et al., 2010), en gran medida, por la inaccesibilidad económica a los

tratamientos antiepilépticos, así como por la existencia de infecciones parasitarias endémicas presentes en estos países, como la cisticercosis (Avanzini & de Boer, 2010; Valdes-Galvanet al., 2019). La epilepsia se caracteriza por la propensión duradera para generar crisis epilépticas (Berg et al., 2010; Fisher et al., 2014; Devinsky et al., 2018), cuyas manifestaciones electrofisiológicas y clínicas dependen de los circuitos neuronales implicados en su generación, del patrón de propagación de la actividad ictal y del grado de sincronización neuronal (Fisher et al., 2005; Berg, 2010; Fisher et al., 2014). Las crisis epilépticas son signos y/o síntomas transitorios e impredecibles que emergen como resultado de la hiperexcitabilidad y la hipersincronización de los circuitos neuronales (Fisher et al., 2005; 2017). De acuerdo con la clasificación vigente de las crisis epilépticas de la liga internacional contra la epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés), las crisis epilépticas pueden clasificarse determinando si las manifestaciones iniciales son focales, generalizadas o desconocidas y subclasificadas dependiendo de si las crisis tienen o no signos motores (Fisher et al., 2017). Es por ello, que el uso de técnicas de registro electrofisiológico de la actividad cerebral, como el electroencefalograma o los registros intracraneales, es necesario para el diagnóstico de la epilepsia y la correcta clasificación de las crisis epilépticas (Berg, 2010; Fisher et al., 2005; 2014; 2017; Devinsky et al., 2018). Adicionalmente, en el caso de las crisis de inicio focal, también pueden subclasificarse dependiendo de la preservación o alteración de la conciencia durante la crisis epiléptica (Fisher et al., 2017). Mediante el uso de diversas técnicas, como el registro electroencefalográfico, el registro con electrodos intracraneales, la resonancia magnética funcional y la tomografía computarizada por emisión de fotón único, se ha podido observar que los sitios más comunes en donde se originan las crisis epilépticas de inicio focal se encuentran en estructuras del lóbulo temporal (en el 30-80 % de los pacientes con epilepsia; Rektor et al., 2002; Blumenfeld et al., 2009; Téllez-Zenteno & Ladino, 2013; Abel et al., 2018), siendo el hipocampo una de las estructuras más frecuentes (en el 50-70 % de los pacientes con epilepsia de origen focal; Engel, 1996; Blumenfeld et al., 2009; Abel et al., 2018; Nakai et al., 2018). El desarrollo de la epilepsia, también llamado epileptogénesis (Pitkänen et al., 2007;

2015), se lleva a cabo típicamente en 3 fases: 1) una fase aguda, en donde ocurre una lesión cerebral epileptogénica o bien, existe la presencia de un factor predisponente de naturaleza estructural, genética o metabólica; 2) una fase latente, en donde no hay crisis epilépticas espontáneas, pero existe hiperexcitabilidad e hipersincronización neuronal subclínica; y 3) una fase crónica, en donde existe la presencia de crisis epilépticas espontáneas y recurrentes (Pitkänen et al., 2007; 2015). Con respecto a la fase aguda de la epileptogénesis, entre las causas que pueden precipitar el desarrollo de las epilepsias sintomáticas se encuentran las crisis febriles neonatales, las infecciones cerebrales, los traumatismos craneoencefálicos, los accidentes cerebrovasculares, las intoxicaciones, los tumores cerebrales, las malformaciones congénitas cerebrales, el *status epilepticus*, las mutaciones genéticas, las enfermedades neurodegenerativas, las alteraciones inmunológicas cerebrales, entre otras (Verhaert & Scott, 2010; Shorvon, 2011). La fase latente de la epileptogénesis involucra una cascada de eventos neurobiológicos que resultan en un incremento gradual de la excitabilidad neuronal hasta la aparición de la primera crisis convulsiva espontánea (Pitkänen et al., 2007; 2015). Entre estos eventos neurobiológicos se puede destacar la neurodegeneración, la reconfiguración sináptica de los circuitos neuronales, la neurogénesis aberrante y la neuroinflamación (Vezzani et al., 2002; 2011; Pitkänen et al., 2007; 2015; 2016; Engel et al., 2013). Finalmente, en la fase crónica de la epileptogénesis, las crisis convulsivas espontáneas surgen de forma recurrente a lo largo de la vida de los pacientes (Pitkänen et al., 2007; 2015; 2016), pero, cuando no existe un tratamiento adecuado, las crisis convulsivas espontáneas tienden a aumentar gradualmente en frecuencia y severidad (Piskorska et al., 2013).

### **Modelos experimentales de hiperexcitabilidad neuronal y de epilepsia.**

El estudio de los mecanismos neuropatológicos que subyacen al desarrollo de la hiperexcitabilidad, llamado ictogénesis (Badawy et al., 2009a; 2009b), así como al desarrollo de la epilepsia, llamado epileptogénesis (Pitkänen et al., 2007; 2015), se ha abordado de forma experimental mediante el uso de modelos animales, en donde es posible inducir hiperexcitabilidad neuronal y/o epilepsia, a través de la

estimulación eléctrica de estructuras cerebrales, o bien, a través de la administración tópica o sistémica de fármacos convulsivantes, tanto en preparaciones *in vitro* como *in vivo* (Fisher, 1989; Velisek, 2006; Zavala-Tecuapetla & López-Meraz, 2011; Lévesque & Avoli, 2013 Löscher, 2011; 2016; Wang et al., 2022). Los modelos experimentales de hiperexcitabilidad y de epilepsia logran reproducir, en gran medida, las características observadas en los pacientes con epilepsia, incluidas las características electrofisiológicas y conductuales de las crisis epilépticas, las alteraciones histopatológicas observadas en tejidos *postmortem* de pacientes con epilepsia y la neuroinflamación observada en estos pacientes, entre otras (Beach et al., 1995; Fisher, 1989; Velisek, 2006; ; Lang & Hart, 2010; Butler et al., 2011; Zavala-Tecuapetla & López-Meraz, 2011; Löscher, 2011; 2016; Wang et al., 2022). Ejemplos de modelos experimentales de hiperexcitabilidad ampliamente utilizados en la literatura son la administración de 4-AP y de pentilenetetrazol (PTZ; Velisek, 2006; Zavala-Tecuapetla & López-Meraz, 2011; Löscher, 2011; 2016; Avoli & Jefferys, 2106). Uno de los modelos experimentales más utilizados en la literatura para estudiar los mecanismos fisiopatológicos de la generación de actividad epileptiforme es la aplicación de 4-AP en preparaciones *in vitro* e *in vivo* (Perrault & Avoli, 1991; Psarropoulou & Avoli, 1996; Barbarosie & Avoli, 1997; Peña & Tapia, 2000; Peña et al., 2002; Velisek, 2006; Peña & Alavez-Pérez, 2006; Heinemann, Kann & Schuchmann, 2006; Peña & Alavez-Pérez, 2006; Avoli & Jefferys, 2016; Alcantara-Gonzalez et al., 2019; Villasana-Salazar et al., 2020; Martínez-García et al., 2021). El 4-AP es un fármaco convulsivante cuyo mecanismo de acción es el bloqueo de varios tipos de canales de potasio activados por voltaje (Gustafsson et al., 1984; Peña & Alavez-Pérez, 2006), es decir, que la 4-AP induce sus efectos a través de un incremento directo de la excitabilidad y la consecuente liberación de neurotransmisores en los circuitos neuronales (Peña & Tapia, 1999; 2000). En preparaciones *in vitro*, la administración de 4-AP induce la aparición de descargas epileptiformes de alto voltaje con un patrón electrofisiológico que se asemeja al de las espigas interictales observadas en pacientes con epilepsia (Dinkelacker et al., 2016; Avoli et al., 2013; Reyes-Garcia et al., 2018), así como actividad epileptiforme cuyo patrón electrofisiológico se asemeja al de un *ictus* (Peña & Alavez-Pérez, 2006;

Avoli et al., 2013; Reyes-Garcia et al., 2018). En preparaciones *in vivo*, la administración sistémica o intracerebral de 4-AP induce actividad epileptiforme, crisis convulsivas y, dependiendo de la dosis utilizada, la muerte de los animales (Mihaly et al., 1990; Peña & Tapia, 1999; 2000; Hewapathirane et al., 2008; Chiang et al., 2013; Alcantara-Gonzalez et al., 2019). Otro de los modelos experimentales más utilizados para estudiar los mecanismos celulares de la hiperexcitabilidad, así como tratamientos enfocados en abolir esta actividad, es la administración de PTZ, principalmente en preparaciones *in vivo* (Fisher, 1989; Velisek et al., 1992; Velisek, 2006; Zavala-Tecuapetla & López-Meraz, 2011; Löscher, 2011; 2016). El PTZ es un fármaco convulsivante que ejerce sus efectos a través del antagonismo no competitivo de los receptores GABA<sub>A</sub> (Squires et al., 1984; Velisek, 2006; Luszcki & Czuczwar, 2005; Wang et al., 2022). Es decir, que el PTZ induce hiperexcitabilidad neuronal a través de la desinhibición de los circuitos neuronales. En preparaciones *in vivo*, la aplicación sistémica de PTZ induce de forma aguda hiperexcitabilidad generalizada y actividad convulsiva, que, dependiendo de la dosis, puede ocasionar la muerte de los animales (Lüttjohann et al., 2009; Wang et al., 2022). La aplicación *in vitro* de PTZ ha sido poco utilizada, probablemente debido a que la hiperexcitabilidad que induce es transitoria y necesita de la presencia de condiciones que favorezcan la excitabilidad neuronal, como el alto K<sup>+</sup> o la ausencia de Mg<sup>2+</sup> en la solución de registro (Raza et al., 2002; Chang et al., 2014; Hann & Burrell, 2015). Adicionalmente, el PTZ también se ha utilizado como modelo de epileptogénesis, debido a que su administración repetida resulta en un aumento gradual y duradero de la susceptibilidad para presentar hiperexcitabilidad neuronal y actividad convulsiva (Fisher, 1989; Velisek et al., 1992; Velisek, 2006; Zavala-Tecuapetla & López-Meraz, 2011; Löscher, 2011; 2016). La epileptogénesis también puede ser modelada a través de la estimulación eléctrica de forma repetitiva de una estructura cerebral, principalmente de la amígdala o del hipocampo (McIntyre et al., 2002; Morimoto et al., 2004; Zavala-Tecuapetla & López-Meraz, 2011; Valdés-Cruz et al., 2019). Este modelo, llamado *kindling* eléctrico, ha sido ampliamente utilizado en la literatura para inducir un aumento progresivo y duradero de la susceptibilidad para producir hiperexcitabilidad neuronal y actividad convulsiva

(McIntyre et al., 2002; Morimoto et al., 2004; Zavala-Tecuapetla & López-Meraz, 2011; Valdés-Cruz et al., 2019). Asimismo, el modelo de *kindling* eléctrico también puede ser aplicado para inducir actividad convulsiva espontánea y recurrente (Morimoto et al., 2004), de esta forma, permitiendo también estudiar el desarrollo de la epilepsia. Los modelos de epilepsia, es decir, aquellos modelos experimentales en donde se induce actividad convulsiva espontánea y recurrente (Pitkänen et al., 2007; 2015), consisten principalmente en la aplicación sistémica o intracerebral de fármacos convulsivantes como la pilocarpina o el ácido kaínico (Cavalheiro, 1995; Müller et al., 2009; Lévesque & Avoli, 2013), aunque también pueden ser inducidos a través de estimulación eléctrica (Nissinen et al., 2000). En general, en los modelos de epilepsia, se induce un *status epilepticus* de forma aguda con la aplicación de los fármacos convulsivantes antes mencionados o de la estimulación eléctrica y, días después, se observa el desarrollo de crisis convulsivas espontáneas y recurrentes (Fisher, 1989; Velisek et al., 1992; Velisek, 2006; Zavala-Tecuapetla & López-Meraz, 2011).

Con los modelos experimentales se ha podido observar que existen múltiples mecanismos neurofisiológicos responsables de la generación de hiperexcitabilidad, que parecieran alterar el balance entre la excitación y la inhibición de los circuitos neuronales (Avoli & Williamson, 1996; Engel & Schwartzkroin, 2006; Badawy et al., 2009a; 2009b; Ackerman & Moshé, 2010; Wang et al., 2022). De forma simplificada, se ha propuesto que la hiperexcitabilidad puede ser generada a partir del incremento de la excitabilidad, así como mediante la desinhibición de los circuitos neuronales (Avoli & Williamson, 1996; Engel & Schwartzkroin, 2006; Badawy et al., 2009a; 2009b; Ackerman & Moshé, 2010; Wang et al., 2022).

### **Comorbilidad entre el SAOS y la epilepsia.**

La presencia del SAOS es dos veces más común en pacientes con epilepsia que en sujetos sanos, presentándose entre el 5 y el 89 % de los pacientes con epilepsia (Malow et al., 2000; Manni et al., 2003; Vaughn & D’Cruz, 2003; Höllinger et al., 2006; Chihorek et al., 2007; Vendrame et al., 2014; Maurousset et al., 2017; McCarter et al., 2018; Söylemez et al., 2020). En algunos casos, el diagnóstico de



epilepsia es posterior al diagnóstico del SAOS (Höllinger et al., 2006; Chihorek et al., 2007). De hecho, Milano y colaboradores (2009) reportaron la presencia de actividad electroencefalográfica paroxística, similar a la actividad interictal observada en los pacientes con epilepsia (Dinkelacker et al., 2016; Avoli et al., 2013; Reyes-Garcia et al., 2018), en el 14 % de los sujetos estudiados de una población pediátrica con el SAOS que no tenían historial de crisis epilépticas, mientras que ninguno de los sujetos sin SAOS presentó esta actividad. Lo anterior sugiere que la presencia del SAOS podría inducir hiperexcitabilidad y precipitar el desarrollo de epilepsia. No obstante, es más común observar que el diagnóstico de epilepsia preceda al diagnóstico del SAOS (Malow et al., 2000; Manni et al., 2003; Vaughn & D'Cruz, 2003; Höllinger et al., 2006; McCarter et al., 2018). De hecho, la resolución de la epilepsia, mediante cirugía resectiva del foco epiléptico, podría también resolver el SAOS (Foldvary-Schaefer et al., 2008), sugiriendo que la epilepsia podría ser un factor de riesgo para el desarrollo del SAOS. Los pacientes con epilepsia que presentan el SAOS exhiben una mayor frecuencia y severidad de las crisis epilépticas, comparados con pacientes con epilepsia que no presentan el SAOS (Chihorek et al., 2007; Shaheen et al., 2012; Scharf et al., 2020), así como un agravamiento en los signos/síntomas asociados al SAOS (Malow et al., 2000; Chihorek et al., 2007). La presencia del SAOS en pacientes con epilepsia incrementa el riesgo de sufrir muerte súbita y disminuye de forma importante la calidad de vida de estos pacientes (Piperidou et al., 2008; Andersen et al., 2012; Hashim et al., 2013; McCarter et al., 2018). Juntas, estas evidencias muestran que la coexistencia del SAOS y la epilepsia exacerba el deterioro progresivo de ambas patologías.

La aplicación de tratamientos terapéuticos enfocados en el SAOS en pacientes con epilepsia, como la presión positiva continua de aire en las vías respiratorias (CPAP, por sus siglas en inglés) o las intervenciones quirúrgicas en las vías respiratorias superiores (como la tonsilectomía, la adenoidectomía y la uvuloplastía) e inferiores (como la traqueostomía), resulta en una disminución de la frecuencia y la severidad de las crisis epilépticas (Devinsky et al., 1994; Koh et al., 2000; Malow et al., 2000; Höllinger et al., 2006; Chihorek et al., 2007; Milano et al., 2009; Segal et al., 2000;

Vendrame et al., 2014; Liu & Wang, 2017; Marousset et al., 2017; Shirani et al., 2017; Somboon et al., 2019; Jaseja et al., 2020), sugiriendo que los efectos que induce el SAOS sobre la epilepsia son reversibles tras el restablecimiento de la respiración “normal”.

## **La neuroinflamación y su asociación con la epilepsia y el SAOS.**

### **La neuroinflamación.**

La inflamación es un proceso fisiológico llevado a cabo por el sistema inmunológico que ocurre cuando el organismo es expuesto a estímulos nocivos, como las infecciones o el daño tisular, y que tiene como finalidad la eliminación del agente patogénico, el restablecimiento de la homeostasis tisular y la facilitación de la recuperación del daño causado (Nathan, 2002; Kindt et al., 2007; DiSabato et al., 2016; Shabab et al., 2017). En este sentido, la neuroinflamación es la respuesta inmunológica llevada a cabo en el sistema nervioso central (DiSabato et al., 2016; Shabab et al., 2017). Este proceso es mediado por el reconocimiento del estímulo nocivo, la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias, la fagocitosis del agente patogénico y/o de las células dañadas y por la resolución de la inflamación (Nathan, 2002; Kindt et al., 2007; DiSabato et al., 2016; Shabab et al., 2017). El reconocimiento del estímulo nocivo es llevado a cabo a través de la activación de receptores especializados expresados en la membrana celular de las células inmunes, llamados receptores de reconocimiento de patrones (RRP), que, dependiendo de si la molécula que los activa se asocia a daño celular (DAM, por sus siglas en inglés) o a patógenos (PAM, por sus siglas en inglés), inducirán la activación de factores de transcripción, principalmente del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras K de las células B activadas (NFkB, por sus siglas en inglés), que, a su vez, resultará en la producción de moléculas proinflamatorias y/o en la inducción de piroptosis (Kindt et al., 2007; Kigerl et al., 2014; Kabba et al., 2018). La síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias en el cerebro es llevada a cabo principalmente por la microglía, que son células inmunitarias residentes en el sistema nervioso central (Kettenmann et al., 2011; 2012), y, en menor medida, por otros tipos celulares que residen en el tejido

nervioso, como los astrocitos, las neuronas, los oligodendrocitos y las células endoteliales, así como por los macrófagos no parenquimales asociados a las meninges, a los espacios perivasculares y a los plexos coroideos, como las células dendríticas, los macrófagos perivasculares y los mastocitos (Delhayé et al., 2006; Sayed et al., 2010; Skaper et al., 2012; DiSabato et al., 2016; Goldman et al., 2016; Shabab et al., 2017; Kabba et al., 2018; Arcuri et al., 2019; Verhoog et al., 2020; Boccazzi et al., 2021). En este proceso, es común observar gliosis reactiva, que consiste en un aumento de la proliferación de la microglía y de los astrocitos, así como en la transición morfológica de estas células hacia una forma hipertrófica, y que da cuenta de la “activación” inmune de estas células (Kreutzberg, 1996; Jonas et al., 2012; Gao et al., 2013; Sierra et al., 2016; Verhoog et al., 2020). Entre las moléculas producidas durante la neuroinflamación se incluyen las citocinas proinflamatorias, principalmente la interleucina (IL) 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), la IL6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , por sus siglas en inglés), así como las moléculas quimioatrayentes, llamadas quimiocinas, y las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Nathan, 2002; Kindt et al., 2007). El objetivo de la producción local de moléculas proinflamatorias es eliminar el estímulo nocivo mediante la activación proinflamatoria de las células circundantes, la invasión de células inmunes a la zona afectada y la inducción de toxicidad al agente patogénico y/o a las células dañadas (Nathan, 2002; Delhayé et al., 2006; Kindt et al., 2007). Finalmente, ante la ausencia del estímulo nocivo, la inflamación local es resuelta a través de una retroalimentación negativa que inducen las moléculas proinflamatorias y que conlleva a la producción y liberación de moléculas antiinflamatorias, como la IL10, la IL4, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ , por sus siglas en inglés) y la proteína antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL1Ra, por sus siglas en inglés), provocando una disminución de la síntesis de moléculas proinflamatorias (Nathan, 2002; Cervantes-Villagrán et al., 2014; Zhao et al., 2015). A su vez, las moléculas antiinflamatorias inducen la resolución de la inflamación a través de la disminución de la proliferación y maduración de células inmunes, la inducción de apoptosis y de fagocitosis de las células dañadas, así como la inhibición de la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias (Nathan, 2002; Cervantes-

Villagrán et al., 2014). Como se puede apreciar, la neuroinflamación aguda desencadenada por un estímulo nocivo es un fenómeno reversible que concluye cuando el agente patogénico es removido (Nathan, 2002; Kettenmann et al., 2011; 2013; Jonas et al., 2012; Verkhratsky & Noda, 2014; Cervantes-Villagrán et al., 2014; Ziebell et al., 2015). Sin embargo, cuando el estímulo nocivo no puede ser removido o eliminado ocurre neuroinflamación crónica, proceso que se ha observado en una variedad de patologías cerebrales (Ziebell et al., 2015; Colonna & Butovski, 2017), entre las que se encuentra la epilepsia (Vezzani & Granata, 2005; Vezzani et al., 2011; Karlstetter et al., 2014; Ziebell et al., 2015; Bloomfield et al., 2016; Selvaraj et al., 2017; Colonna & Butovski, 2017).

### **Neuroinflamación en la epilepsia.**

La presencia de neuroinflamación en pacientes con epilepsia es un fenómeno ampliamente descrito en la literatura (Vezzani & Granata, 2005; Aronica & Gorter, 2007; Aronica & Crino, 2011; Vezzani et al., 2011; Aronica et al., 2012; Alyu & Dikmen, 2016; Rana & Musto, 2018). Diversos reportes han evidenciado la presencia de niveles elevados de moléculas proinflamatorias en tejido reseco de pacientes con epilepsia farmacorresistente, que incluyen a citocinas proinflamatorias, a quimiocinas y a especies reactivas de nitrógeno (Vezzani & Granata, 2005; Aronica & Gorter, 2007; Fabene et al., 2010; Aronica & Crino, 2011; Vezzani et al., 2011; Aronica et al., 2012; Rana & Musto, 2018). Por ejemplo, Leal y colaboradores (2017a) analizaron la expresión de moléculas proinflamatorias en muestras de hipocampo y de corteza temporal obtenidas de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente al tratamiento farmacológico y las compararon con muestras *postmortem* de hipocampo y corteza temporal de sujetos sin epilepsia. En este trabajo, los autores observaron una sobreexpresión de la citocina proinflamatoria IL1 $\beta$  (Leal et al., 2017a). En el mismo sentido, Mercado-Gómez y colaboradores (2018) observaron un aumento en la expresión de las citocinas proinflamatorias IL1 $\beta$ , IL6 y TNF $\alpha$ , además de un aumento en la expresión de la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1, por sus siglas en inglés), que promueve la síntesis de citocinas proinflamatorias a través de la activación de los

receptores tipo *Toll* (TLR) (Aronica & Crino, 2011), y del factor de transcripción RELA, que forma parte del factor de transcripción NF $\kappa$ B (Echeverri & Mockus, 2008), en el bulbo olfatorio obtenido de pacientes con epilepsia del lóbulo frontal farmacorresistente. Resultados similares han sido observados por Teocchi y colaboradores (2013) en tejido hipocampal resecado de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente a fármacos, en donde los autores reportaron una sobreexpresión de TNF $\alpha$ , de NF $\kappa$ B y de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés), que se sobrerregula en astrocitos reactivos (Verhoog et al., 2020). Adicionalmente, Kan y colaboradores (2012), observaron que en tejido hipocampal y cortical obtenido de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente se expresan niveles elevados de varias moléculas proinflamatorias, entre las que se encontraron citocinas proinflamatorias, como la IL1 $\beta$ , la IL6, la IL17 y el interferón (IFN)  $\alpha$ , entre otras, y de citocinas antiinflamatorias, como la IL4, la IL10, la IL25 y la proteína IL1Ra, además de algunas quimiocinas, como la CCL2, la CCL3 y la CCL4. Asimismo, también se ha observado una mayor inmunorreactividad de la citocina proinflamatoria IL1 $\alpha$ , así como una sobreexpresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2), que promueve la síntesis de moléculas proinflamatorias llamadas prostaglandinas (Kindt et al., 2007), en tejido hipocampal y cortical extraído de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente a farmacoterapia (Sheng et al., 1994; Desjardins et al., 2003). En otro estudio más reciente (Castañeda-Cabral et al., 2020), los autores observaron que, además de una mayor cantidad de las citocinas proinflamatorias IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , ocurre un incremento del receptor de necrosis tumoral (TNFR, por sus siglas en inglés) tipo 1 y de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, por sus siglas en inglés), la cual media la producción de la especie reactiva de nitrógeno óxido nítrico (Aktan, 2004), en la microvasculatura de la corteza temporal obtenida de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente, advirtiendo que las células endoteliales también modulan el estado proinflamatorio en la epilepsia. Estas evidencias han sido confirmadas con el análisis de la expresión de genes, mediante microarreglos, de muestras de hipocampo obtenidas de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente, en donde se ha observado una

sobreexpresión de la IL1 $\alpha$ , la IL1 $\beta$ , la IL6, la IL18, el TNF $\alpha$  y el TGF $\beta$ , además del dominio de la familia del receptor tipo NOD que contiene pirina tipo 1 (NLRP1, por sus siglas en inglés; Aronica & Gorter, 2007; Lachos et al., 2011; Dixit et al., 2016), que forma parte del complejo multiproteico que media la maduración de la IL1 $\beta$  y la IL18, llamado inflamasoma NLRP1 (Gabay et al., 2010; Alberts et al., 2015). De forma adicional a la sobreexpresión de moléculas proinflamatorias, también se ha observado la presencia de células gliales y vasculares “activadas” en el tejido de pacientes con epilepsia, que se ha relacionado estrechamente con neurodegeneración (Beach et al., 1995; Cornford et al., 1998; Doherty et al., 2007; Lang & Hart, 2010; Kettenmann et al., 2011; Lachos et al., 2011; Dixit et al., 2016; Leal et al., 2017a; Klement et al., 2018; Altmann et al., 2021). En tejido cerebral *postmortem* y en tejido obtenido de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, se ha observado la presencia y proliferación de células gliales con morfología hipertrófica, principalmente microglía y astrocitos, en el hipocampo y en la corteza cerebral (Beach et al., 1995; Love et al., 2004; Lang & Hart, 2010; Butler et al., 2011; Klement et al., 2018; Altmann et al., 2021). Adicionalmente, se ha observado hipertrofia y proliferación de células que componen la vasculatura cerebral, como los pericitos y las células endoteliales (Cornford et al., 1998; Klement et al., 2018). Estas evidencias sugieren que estas células participan activamente en el proceso neuroinflamatorio crónico observado en pacientes con epilepsia. A este respecto, recientemente, mediante tomografía por emisión de positrones (TEP) con un radioligando que se acopla a la proteína translocadora mitocondrial (TSPO, por sus siglas en inglés), presente principalmente en la microglía activada (Karlstetter et al., 2014; Scott et al., 2017) y en menor medida en los astrocitos activados (Lavisse et al., 2012; Scott et al., 2017), se ha observado un aumento de este marcador de neuroinflamación en el cerebro de pacientes con epilepsia (Butler et al., 2011; 2016). Los autores observaron que el aumento de este marcador de neuroinflamación se encontró de forma generalizada en un paciente con epilepsia frontal, inclusive en áreas cerebrales lejanas al foco epiléptico (Butler et al., 2016). Adicionalmente, los niveles de este marcador de neuroinflamación aumentaron aún más en el foco epiléptico aproximadamente 36 horas después de haber ocurrido una crisis

epiléptica (Butler et al., 2016), mostrando que las crisis epilépticas modulan de forma positiva a la neuroinflamación, posiblemente a través de la activación de las células microgliales. Asimismo, es importante resaltar que prácticamente todas las etiologías asociadas con el desarrollo de la epilepsia involucran procesos inflamatorios en el cerebro (Aarli, 2000; Love et al., 2004; Lang & Hart, 2010; Cederberg & Siesjö, 2010; Butler et al., 2011; Gorter et al., 2015; Butler et al., 2016; Webster et al., 2017; Xu et al., 2017). Ejemplos claros son las encefalopatías inducidas por virus (p. ej. el Herpes simple tipo 1; Love et al., 2004), por bacterias (Maganti et al., 2008), por neurocisticercosis (Chauhan et al., 2015), por enfermedades autoinmunes (p. ej. la encefalitis de Rasmussen; Lang & Hart, 2010; Fabene et al., 2010), por traumatismos craneoencefálicos (Cederberg & Siesjö, 2010; Webster et al., 2017; Xu et al., 2017), por enfermedades priónicas (p. ej. la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; Krbot et al., 2018), así como las encefalopatías inducidas por crisis sintomáticas agudas (p. ej. las causadas por intoxicación, por tumores cerebrales, por trastornos metabólicos o por un *status epilepticus*; Butler et al., 2011; Gorter et al., 2015; Xu et al., 2017; Leal et al., 2017a). Juntas, estas evidencias indican que la neuroinflamación no sólo es inducida de forma aguda en respuesta a eventos ictales, sino que se encuentra crónicamente activa durante el desarrollo de la epilepsia, advirtiendo que la neuroinflamación podría estar promoviendo la evolución y el mantenimiento de la epilepsia (Vezzani & Granata, 2005; Gorter et al., 2015; Ziebell et al., 2015; Eyo et al., 2016; Vezzani et al., 2019). Asimismo, como se detallará más adelante, las moléculas proinflamatorias involucradas en la neuroinflamación crónica, como la IL1 $\beta$ , la IL6 y el TNF $\alpha$ , entre otras, incrementan la excitabilidad neuronal e incluso, son capaces de inducir hiperexcitabilidad (Vezzani et al., 2002; 2004; 2008; Vezzani & Viviani, 2015).

### **Neuroinflamación en el SAOS.**

Nada se ha investigado sobre la presencia de neuroinflamación en pacientes con el SAOS. Sin embargo, existe evidencia de procesos inflamatorios sistémicos en estos pacientes (Daulatzai, 2012; Lin et al., 2016; Kheirandish-Gozal & Gozal, 2019; Liu et al., 2020; Wang et al., 2021). Tal vez, el primer indicio de la participación de

procesos inflamatorios en el SAOS es la mejoría de los signos/síntomas de este síndrome tras el tratamiento con fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, principalmente en pacientes pediátricos (Kheirandish-Gozal et al., 2014; Kuhle et al., 2020). Aunado a esto, múltiples reportes han hecho evidente la presencia crónica de inflamación local y sistémica en pacientes con el SAOS (Daulatzai, 2012; Lin et al., 2016; Kheirandish-Gozal & Gozal, 2019; Liu et al., 2020; Wang et al., 2021). En un metaanálisis realizado por Nadeem y colaboradores (2013), los autores revisaron la literatura publicada entre los años 1968 y 2011, y analizaron los niveles de la expresión de moléculas proinflamatorias en el suero de pacientes con el SAOS (n = 2952) y de pacientes “sanos” (n = 2784). Estos autores encontraron que las moléculas proinflamatorias que mayormente se sobreexpresan en el suero de los pacientes con el SAOS son el TNF $\alpha$ , la IL6, la IL8 y la proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés), que es un mediador de la activación del sistema inmune a través del sistema del complemento (Kindt et al., 2007; Nadeem et al., 2013). Otros estudios también han reportado una sobreexpresión de las citocinas proinflamatorias IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en el suero de pacientes con el SAOS (Alberti et al., 2003). Estos resultados se han corroborado en investigaciones más recientes (Motamedi et al., 2018; Reale et al., 2020), en donde se ha observado un incremento de las citocinas proinflamatorias IL6 e IL17 en el suero de los pacientes con el SAOS, además de una disminución del TGF $\beta$ , que es una molécula antiinflamatoria (Kindt et al., 2007). De forma consistente, también se han observado marcadores de inflamación en las vías respiratorias de pacientes con el SAOS (Sekosan et al., 1996; Payne et al., 2006). Sekosan y colaboradores (1996) reportaron leucocitosis en la úvula palatina extraída quirúrgicamente de pacientes con el SAOS. El mismo resultado fue obtenido en tejido nasal y bronquial de pacientes con el SAOS (Rubistein, 1995; Lacedonia et al., 2011). En el mismo sentido, Payne y colaboradores (2006) observaron marcadores macroscópicos de inflamación en la laringe del 90 % de los pacientes con el SAOS, que incluyeron eritema, hipertermia, edema difuso e hipertrofia del tejido. Curiosamente, el tratamiento del SAOS mediante la aplicación de CPAP o a través de las intervenciones quirúrgicas de las vías respiratorias superiores (como la tonsilectomía y la uvulopalatoplastía), revierte



la sobreexpresión de estos marcadores de inflamación sistémica (Lacedonia et al., 2011; Macey, 2012; Mutlu et al., 2017; Kheirandish-Goza & Gozal 2019; Wang et al., 2021). Como se mencionó anteriormente, si bien, a la fecha no existen evidencias clínicas del efecto del SAOS sobre la inflamación cerebral, estudios experimentales han demostrado que la HIC, la principal consecuencia inmediata del SAOS (Dempsey et al., 2010; Labarca et al., 2019), es capaz de inducir neuroinflamación (Row et al., 2003; Smith et al., 2013; Dumitrascu et al., 2013; Liu et al., 2018; Wu et al., 2021). Estas evidencias experimentales serán discutidas a continuación.

## **Mecanismos de neuroinflamación inducidos por la hiperexcitabilidad y la hipoxia intermitente crónica (HIC).**

### **Neuroinflamación en modelos experimentales de hiperexcitabilidad y de epilepsia.**

En los pacientes con epilepsia y en los modelos experimentales de hiperexcitabilidad y de epilepsia se ha descrito ampliamente la presencia de marcadores de neuroinflamación (Vezzani & Granata, 2005; Fabene et al., 2010; Gorter et al., 2015; Alyu & Dikmen, 2016; Eyo et al., 2016; Khaspekov & Frumkina, 2017; Webster et al., 2017; Hiragi et al., 2018). De forma general, en los modelos experimentales de hiperexcitabilidad, por ejemplo, con la estimulación eléctrica del hipocampo, la inducción de crisis febriles o la administración de ácido kaínico o de pilocarpina, se ha observado un aumento en la expresión y liberación de moléculas proinflamatorias, como las citocinas IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL12 e IFN $\beta$ ; las quimiocinas CCL2 y su receptor CCR2; y las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e iNOS, respectivamente (Vezzani et al., 1999; De Simoni et al., 2000; Hailer et al., 2005; Ravizza et al., 2008; Fabene et al., 2010; Benson et al., 2015; Álvarez-Croda et al., 2015; Zhuang et al., 2016; Sabilallah et al., 2016; Vinet et al., 2016; Gross et al., 2017; Pardo-Peña et al., 2018a; Altmann et al., 2021). En el mismo sentido, se ha observado una sobreexpresión de marcadores de activación microglial y astrogial, como la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1, por sus siglas en inglés), la proteína TSPO, el CD11b

y la GFAP (Vezzani et al., 1999; De Simoni et al., 2000; Ravizza et al., 2008; Amhaoul et al., 2015; Sabilallah et al., 2016; Zhuang et al., 2016; Wyatt-Johnson et al., 2017; Advic et al., 2018; Klement et al., 2018; Pardo-Peña et al., 2018a; Altmann et al., 2021). De forma consistente, también se ha observado la presencia de microgliosis y de astrogliosis hipocampal, así como de pericitosis (De Simoni et al., 2000; Voutsinos-Porche et al., 2004; Hailer et al., 2005; Ravizza et al., 2008; Eyo et al., 2014; Avignone et al., 2015; Amhaoul et al., 2015; Kosonowska et al., 2015; Vinet et al., 2016; Sabilallah et al., 2016; Wyatt-Johnson et al., 2017; Klement et al., 2018; Shapiro et al., 2018; Altmann et al., 2021). Adicionalmente, estos marcadores proinflamatorios se han asociado con neurodegeneración y se ven más incrementados en animales que tienen crisis convulsivas más severas (Ravizza et al., 2008; Benson et al., 2015; Sabilallah et al., 2016; Álvarez-Croda et al., 2015; Pardo-Peña et al., 2018a; Altmann et al., 2021). Por otro lado, la inducción de hiperexcitabilidad en condiciones *in vitro* ejerce efectos sobre la fisiología de las células microgliales, produciendo un aumento sustancial de la convergencia entre los procesos microgliales con las dendritas neuronales y de la velocidad con la que se mueven estos procesos (Eyo et al., 2015). Esta convergencia entre los procesos microgliales y las dendritas neuronales fue reproducida por la administración de IL1 $\beta$  y bloqueada por la proteína IL1Ra *in vitro* (Eyo et al., 2015). Adicionalmente, resultados similares han sido observados en animales sometidos a *status epilepticus* inducido con ácido kaínico (Eyo et al., 2014). En este mismo sentido, utilizando modelos experimentales de epileptogénesis y de epilepsia, como el *kindling* eléctrico amigdalino, la inducción de traumatismo craneoencefálico, la estimulación eléctrica del hipocampo o la administración de ácido kaínico o de pilocarpina, se ha observado un incremento gradual y sostenido de los mismos marcadores de neuroinflamación (Vezzani & Granata, 2005; Ravizza et al., 2008; Fabene et al., 2010; Gorter et al., 2015; Alyu & Dikmen, 2016; Eyo et al., 2016; Khaspekov & Frumkina, 2017; Webster et al., 2017; Hiragi et al., 2018). Particularmente, cuando los animales han desarrollado crisis convulsivas espontáneas y recurrentes, se ha observado una sobreexpresión de diferentes marcadores de neuroinflamación como la IL1 $\beta$ , la IL6, el TNF $\alpha$ , la iNOS, el CD11b,

la Iba1 y la GFAP, así como de microgliosis, astrogliosis, pericitosis y neurodegeneración (Vezzani et al., 1999; De Simoni et al., 2000; Ravizza et al., 2008; Voutsinos-Porche et al., 2004; Aalbers et al., 2014; Kosonowska et al., 2015; Benson et al., 2015; Amhaoul et al., 2015; Vinet et al., 2016; Sabilallah et al., 2016; Wyatt-Johnson et al., 2017; Xu et al., 2017; Bertani et al., 2017; Avdic et al., 2018; Brackhan et al., 2018; Shapiro et al., 2018; Klement et al., 2018; Altmann et al., 2021). Asimismo, se ha demostrado que el tratamiento de los animales con la proteína IL1Ra es capaz de prevenir la neuroinflamación producida por la inducción experimental de epilepsia, así como de disminuir la actividad convulsiva inducida de forma aguda y de reducir las crisis convulsivas espontáneas y recurrentes (Vezzani et al., 2000; De Simoni et al., 2000; Hailer et al., 2005; Ravizza et al., 2008; Bertani et al., 2017). Finalmente, de forma similar a lo reportado en pacientes con epilepsia (Butler et al., 2011; 2016), Brackhan y colaboradores (2018), utilizando la TEP con un radioligando que se acopla a la proteína TSPO, describieron el patrón de activación microglial a lo largo de la epileptogénesis inducida por la administración de litio/pilocarpina, mostrando que la activación microglial incrementa de forma gradual y generalizada durante el curso de la epileptogénesis, pero con mayor intensidad en el hipocampo, en donde también observaron microgliosis y astrogliosis en asociación con neurodegeneración.

En conjunto, la inducción experimental de hiperexcitabilidad y de epilepsia, resulta en un aumento de la neuroinflamación que involucra principalmente la participación de la microglía y de los astrocitos, sugiriendo que la “activación” proinflamatoria de estos tipos celulares podría estar promoviendo y sosteniendo la hiperexcitabilidad neuronal característica de estos modelos experimentales.

### **Neuroinflamación inducida por la HIC.**

En cuanto a la inducción experimental de HIC, que es la principal consecuencia inmediata del SAOS (Dempsey et al., 2010; Labarca et al., 2019), recientemente se ha observado que induce un aumento de marcadores proinflamatorios en el cerebro (Liu et al., 2020). La HIC puede ser inducida de diferentes maneras, con la finalidad de modelar los eventos intermitentes de apnea que se observan en los pacientes

con el SAOS (Sforza & Roche, 2016). La forma más común de inducir HIC en animales es mediante el uso de cámaras de plexiglás equipadas con inyectores de O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, así como con sensores de O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, humedad y temperatura, permitiendo el control y el registro de la cantidad de oxígeno dentro de las cámaras (Zoccal et al., 2008; Moraes & Machado, 2015; Villasana-Salazar et al., 2020; Hernández-Soto et al., 2021). Para inducir la HIC, los animales son sometidos a episodios recurrentes y breves de hipoxia moderada (3-8 % de O<sub>2</sub> inspirado), alternados con episodios de normoxia, por varias horas durante el día a lo largo de varios días o semanas (Zoccal et al., 2008; Moraes & Machado, 2015; Sforza & Roche, 2016; Villasana-Salazar et al., 2020; Hernández-Soto et al., 2021). Otros modelos experimentales de HIC incluyen la obstrucción mecánica o quirúrgica de las vías aéreas superiores (Almendros et al., 2007; Sforza & Roche, 2016; Tarasiuk & Segev, 2018), así como el uso de animales que espontáneamente desarrollan episodios de apnea durante el sueño, como los perros *bulldog* ingleses o los cerdos miniatura de Yucatán (Sforza & Roche, 2016). Similar a lo observado en pacientes con el SAOS, la inducción experimental de HIC resulta en alteraciones patológicas, incluyendo hipertensión, fallas cardíacas, diabetes, déficit cognitivo y olfatorio, además de alteraciones estructurales en el cerebro (Row et al., 2003; Zoccal et al., 2008; Dumitrascu et al., 2013; Sharpe et al., 2013; Smith et al., 2013; Wang et al., 2015; Goussakov et al., 2019; Labarca et al., 2020; Zhang et al., 2020; Hernández-Soto et al., 2021). Aunado a lo anterior, recientemente se ha descrito la presencia de neuroinflamación en animales expuestos a HIC (Liu et al., 2020). Particularmente, se ha observado un aumento gradual de citocinas proinflamatorias en el hipocampo y la corteza cerebral de animales expuestos a HIC, incluyendo a la IL1 $\beta$ , al TNF $\alpha$  y a la IL6, así como un aumento de quimiocinas como la CCL2 y la CCL5, y de marcadores de estrés oxidativo como la enzima COX2, el malondialdehído y la enzima iNOS (Smith et al., 2103; Sapin et al., 2015; Zhang et al., 2015; Gong et al., 2020; Wu et al., 2021). Este efecto proinflamatorio inducido por la HIC parece estar mediada por la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B (Oliver et al., 2009; Murugan et al., 2011; Korbecki et al., 2021). En el mismo sentido, estos marcadores de neuroinflamación se han asociado con astrogliosis, microgliosis, declive cognitivo

y con neurodegeneración en el hipocampo (Row et al., 2003; Murugan et al., 2011; Baronio et al., 2013; Zhang et al., 2015; Liu et al., 2018; Gong et al., 2020). Es importante mencionar, que estos marcadores de neuroinflamación aumentan en una forma dependiente de la duración de la HIC, es decir, que entre más tiempo de exposición tengan los animales a la HIC, más severa será la neuroinflamación (Smith et al., 2013; Sapin et al., 2015). Por otra parte, algunas investigaciones han reportado que la inducción experimental de HIC incrementa la excitabilidad hipocampal (Goussakov et al., 2019; 2021). En un modelo de hipoxia intermitente neonatal, Goussakov y colaboradores (2019; 2021) observaron que la exposición a hipoxia intermitente durante 5 días en animales neonatos resulta en una potenciación de la transmisión sináptica de las colaterales de Schaffer en el hipocampo. Adicionalmente, se observó que esta potenciación inducida por la hipoxia intermitente ocluyó la inducción de potenciación a largo plazo con estimulación eléctrica, efecto que incluso se acentuó 6 días después del último día de hipoxia (Goussakov et al., 2019). Posteriormente, estos mismos autores observaron que estos efectos se encontraron mediados por el receptor glutamatérgico tipo NMDA (Goussakov et al., 2021). Otros autores también han observado este efecto oclusivo de la potenciación a largo plazo hipocampal como resultado de la HIC en animales adultos (Khuu et al., 2019; Arias-Cavieres et al., 2021), sugiriendo que la HIC podría estar generando potenciación sináptica también en animales adultos. Este efecto es similar al observado en animales en el periodo crónico de la epileptogénesis, en donde se ha observado una potenciación sináptica a largo plazo como resultado de la epileptogénesis y que ocluye parcialmente la inducción de potenciación a largo plazo con estimulación eléctrica, en comparación con animales control (Suárez et al., 2012), sugiriendo que la oclusión de la potenciación a largo plazo observada en animales sometidos a HIC pudiera estar reflejando un estado crónico de hiperexcitabilidad. Aunado a lo anterior, el efecto de la hipoxia sobre la excitabilidad neuronal y la actividad epileptiforme ha sido ampliamente caracterizado (Jensen et al., 1991; 1992; 1998; Wais et al., 2009; Bjorkman et al., 2010; Rakhade et al., 2011, 2012; Rodriguez-Alvarez et al., 2015). De hecho, pareciera que la inducción de hipoxia, ya sea en animales neonatos o

adultos, resulta en un aumento duradero de la susceptibilidad para presentar actividad epileptiforme, e incluso es capaz de inducir epileptogénesis (Jensen et al., 1991; 1992; 1998; Owens et al., 1997; Wais et al., 2009; Bjorkman et al., 2010; Rakhade et al., 2011, 2012; Rodriguez-Alvarez et al., 2015), sugiriendo que la HIC podría también exacerbar la inducción de hiperexcitabilidad neuronal.

En suma, se puede apreciar que la neuroinflamación es un factor común entre la epilepsia experimental y la HIC, y que la activación proinflamatoria de la glía podría participar en el desarrollo de ambos procesos patológicos. Sin embargo, a pesar de las múltiples evidencias que asocian a la hipoxia con el desarrollo de hiperexcitabilidad, hasta esta tesis, no se había investigado el efecto de la HIC sobre la inducción de hiperexcitabilidad, así como tampoco su posible permanencia o reversibilidad.

### **Efecto de las moléculas proinflamatorias sobre la actividad neuronal y su hiperexcitabilidad.**

Con el objetivo de ahondar en el posible rol de la neuroinflamación como mecanismo precipitador de la hiperexcitabilidad neuronal observada en la epilepsia y en el SAOS, a continuación, se describirá el efecto de algunas moléculas proinflamatorias sobre la excitabilidad neuronal y la inducción experimental de hiperexcitabilidad, principalmente de las citocinas mayormente expresadas en ambas patologías, incluyendo a la IL1 $\beta$ , al TNF $\alpha$  y a la IL6, entre otras. De forma general, la administración de moléculas proinflamatorias en el tejido nervioso promueve la hiperexcitabilidad y el desarrollo de epilepsia (Vezzani et al., 2002; 2008; 2011; 2019; Vezzani & Viviani, 2015), sugiriendo que las manipulaciones que inducen un aumento en la síntesis de estas moléculas proinflamatorias influenciarán de forma positiva a la generación de hiperexcitabilidad.

#### **La interleucina (IL) 1 $\beta$ (IL1 $\beta$ )**

La IL1 $\beta$  es una citocina cuyo potencial proinflamatorio ha sido descrito desde su descubrimiento (Rothwell & Luheshi, 2000; Gabay et al., 2010; Liu et al., 2018; Van Den Eeckhout et al., 2021). En el cerebro, esta citocina es producida principalmente por la microglía, aunque también puede ser producida por otros tipos celulares en

el cerebro como los astrocitos, las neuronas, los oligodendrocitos, las células endoteliales y los macrófagos no parenquimales (Rotwell & Luheshi, 2000; Gabay et al., 2010; Krasnow et al., 2017; Liu et al., 2018; Van Den Eeckhout et al., 2021). La síntesis de IL1 $\beta$  es llevada a cabo por la transcripción del gen *il1 $\beta$* , a través de la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B por estímulos inmunógenos del tipo DAMs y PAMs, cuyo transcrito da lugar a un péptido inmaduro biológicamente inactivo llamado pro-IL1 $\beta$  (Gabay et al., 2010). La maduración del péptido pro-IL1 $\beta$  es llevada a cabo por la activación del inflamasoma, que es un complejo multiproteico cuyos elementos proteicos son sintetizados también a través de la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B (Lamkanfi & Dixit, 2008; Krasnow et al., 2017; Van Den Eeckhout et al., 2021). En particular, la caspasa 1, que es una caspasa efectora asociada al inflamasoma (Gabay et al., 2010; Lopez-Castejon & Brough, 2011; Van Den Eeckhout et al., 2021), realiza la hidrólisis de la pro-IL1 $\beta$  y se ha propuesto que también media la liberación al espacio extracelular de la IL1 $\beta$  en su forma madura y biológicamente activa (Gabay et al., 2010; Lopez-Castejon & Brough, 2011; Van Den Eeckhout et al., 2021). La acción biológica de la IL1 $\beta$  es llevada a cabo principalmente a través del receptor de la interleucina 1 (IL1R) tipo 1, que se encuentra expresado en la membrana celular de distintos tipos celulares en el cerebro, principalmente en las neuronas (Rotwell & Luheshi, 2000; Gabay et al., 2010; Van Den Eeckhout et al., 2021). Asimismo, la IL1 $\beta$  también tiene afinidad por los receptores “señuelo” IL1R tipo2 y tipo 3, que no ejercen señalización intracelular, por lo que su acoplamiento con la IL1 $\beta$  actúa como un mecanismo limitante de la señalización de esta citocina con el receptor IL1R tipo 1 (Rotwell & Luheshi, 2000; Van Den Eeckhout et al., 2021). Al acoplarse con la IL1 $\beta$ , la señalización intracelular inducida por el IL1R tipo 1 conlleva a la transcripción de moléculas proinflamatorias a través de la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B (figura 1; Rotwell & Luheshi, 2000; Gabay et al., 2010; Van Den Eeckhout et al., 2021). Esta cascada de señalización comienza con el reclutamiento y la activación de moléculas accesorias, como la proteína accesoria del IL1R (IL1RAP, por sus siglas en inglés) y el factor diferenciador mieloide 88 (MYD88, por sus siglas en inglés; figura 1; Rotwell & Luheshi, 2000; Gabay et al., 2010; Van Den Eeckhout

et al., 2021). Asimismo, MYD88 recluta y activa al complejo de cinasas asociadas al IL1R tipo 1 y 2 (IRAK1 e IRAK2, por sus siglas en inglés), que, a su vez, reclutan y activan al factor asociado al receptor de TNF tipo 6 (TRAF6, por sus siglas en inglés), que es una proteína adaptadora con actividad ubiquitina-ligasa (figura 1; Rotwell & Luheshi, 2000; Gabay et al., 2010; Pontreilli et al., 2019; Van Den Eeckhout et al., 2021). La activación de TRAF6 desencadena la ubiquitinación de las cinasas IRAK1 e IRAK2, del modulador esencial de NFκB (NEMO, por sus siglas en inglés) y de sí mismo (figura 1; Rotwell & Luheshi, 2000; Gabay et al., 2010; Pontreilli et al., 2019; Van Den Eeckhout et al., 2021). Una vez ubiquitinado, el factor TRAF6 es reconocido por la proteína de unión a la cinasa activada por el TGFβ 1 (TAK1, por sus siglas en inglés) tipo 2 (TAB2, por sus siglas en inglés), cuya interacción activa a la cinasa TAK1, que, a su vez, activa a la cinasa de la proteína inhibidora de NFκB (IKB, por sus siglas en inglés) subunidad β (IKKβ, por sus siglas en inglés; Rotwell & Luheshi, 2000; Gabay et al., 2010; Pontreilli et al., 2019; Van Den Eeckhout et al., 2021). La activación de la cinasa IKKβ activa a la proteína IKB y promueve su ubiquitinación, permitiendo la liberación de las subunidades p50 y p65 del factor de transcripción NFκB, también llamadas NFκB1 y RELA, respectivamente (figura 1; Rotwell & Luheshi, 2000; Gabay et al., 2010; Pontreilli et al., 2019; Van Den Eeckhout et al., 2021). La liberación de las subunidades p50 y p65 que conforman al factor de transcripción NFκB conlleva a la translocación de estas subunidades al núcleo y a la posterior transcripción de moléculas proinflamatorias, en donde se incluyen el TNFα, la IL6 y la misma IL1β, así como de moléculas antiinflamatorias como la proteína IL1Ra (figura 1; Rotwell & Luheshi, 2000; Gabay et al., 2010; Pontreilli et al., 2019; Van Den Eeckhout et al., 2021). Asimismo, también se ha descrito que la IL1β puede producir efectos a través de vías no transcripcionales (Balosso et al., 2008). Asimismo, la IL1β es considerada como un factor maestro de la reacción inflamatoria, debido a que su presencia induce la transcripción de moléculas proinflamatorias, incluida ella misma, así como de moléculas antiinflamatorias, como la proteína IL1Ra, por lo que los efectos de la IL1β son directamente inhibidos por los productos que ella induce (figura 1; Rothwell



& Luheshi, 2000; La & Fischer, 2001; Gabay et al., 2010; Krasnow et al., 2017; Liu et al., 2018; Van Den Eeckhout et al., 2021).

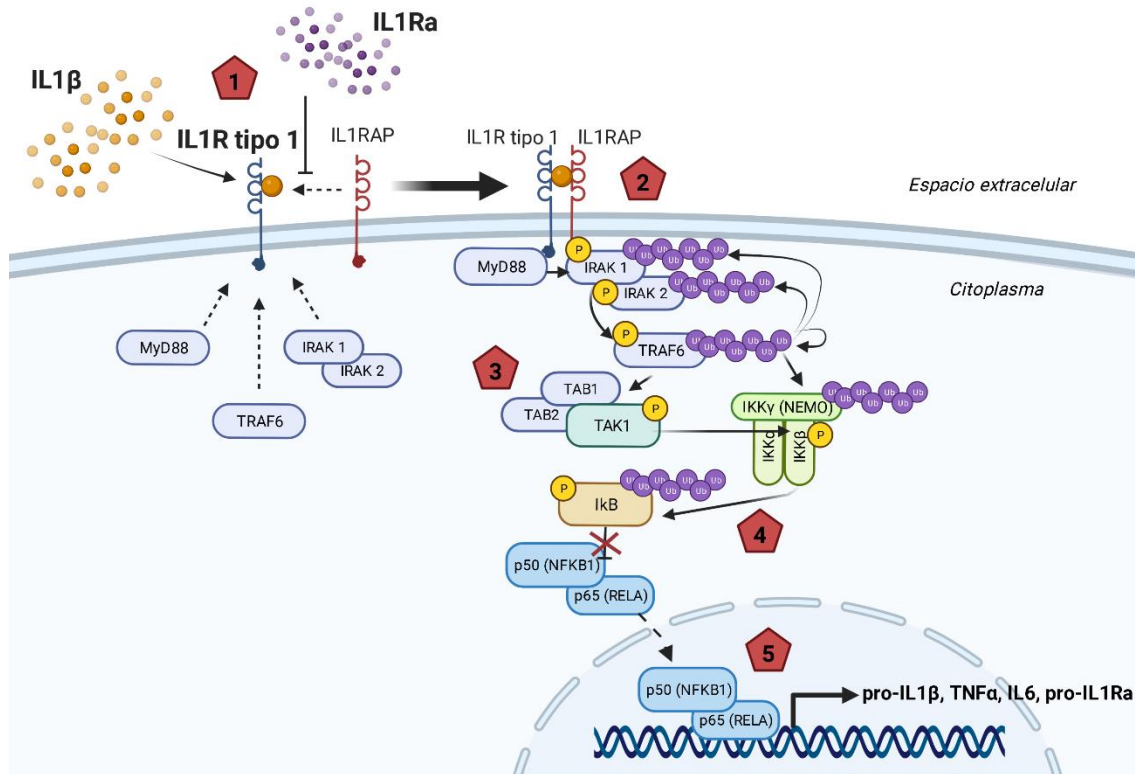


Figura 1. Esquema de la señalización intracelular del receptor de la interleucina 1 (IL1R, por sus siglas en inglés) tipo 1. 1) En el espacio extracelular, la interleucina 1  $\beta$  (IL1 $\beta$ ) se acopla con el receptor IL1R tipo 1, lo que induce el reclutamiento intracelular de proteínas accesorias, como la proteína accesoria del IL1R (IL1RAP, por sus siglas en inglés), el factor diferenciador mieloide 88 (MYD88, por sus siglas en inglés), a las cinasas asociadas al IL1R tipo 1 y 2 (IRAK1 e IRAK2, por sus siglas en inglés) y al factor asociado al receptor de TNF tipo 6 (TRAF6, por sus siglas en inglés). Adicionalmente, se muestra que el acoplamiento de la proteína antagonista del IL1 (IL1Ra) con el receptor IL1R tipo 1 evita el reclutamiento de IL1RAP. De esta forma, impidiendo la cascada de señalización del receptor IL1R tipo 1. 2) El reclutamiento de IL1RAP desencadena la activación de MYD88 y de las cinasas IRAK1 e IRAK2, promoviendo la activación de TRAF6, que es una proteína con actividad ubiquitina-ligasa. Los blancos de ubiquitinación de TRAF6 incluyen a las cinasas IRAK1 e IRAK2, al modulador esencial de NFKB (NEMO, por sus siglas en inglés) y a sí mismo. 3) La ubiquitinación de TRAF6 es reconocida por la proteína de unión a la cinasa activada por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 (TAK1, por sus siglas en inglés) tipo 2 (TAB2, por sus siglas en inglés), cuya interacción activa a la cinasa TAK1, que, a su vez, activa a la cinasa de la proteína inhibidora de NFKB (IKB, por sus siglas en inglés) subunidad  $\beta$  (IKK $\beta$ , por sus siglas en inglés). 4) La cinasa IKK $\beta$  activada promueve la activación y ubiquitinación de la proteína IKB, permitiendo la

desinhibición de las subunidades del factor de transcripción NFκB p50 y p65, también llamados NFκB1 y RELA, respectivamente, por los genes que transcriben a estas subunidades. 5) La liberación de las subunidades p50 y p65 que conforman al factor de transcripción NFκB permite su translocación al núcleo y la posterior transcripción de moléculas proinflamatorias, como pro-IL1β, IL6 y TNFα, así como antiinflamatorias, como pro-IL1Ra.

Utilizando preparaciones *in vitro*, diversas investigaciones sugieren que la IL1β es capaz de regular la excitabilidad neuronal (Brady et al., 1994; Chao et al., 1995; Viviani et al., 2003; Kawasaki et al., 2008; Stemkowski et al., 2017; Clarkson et al., 2017). Viviani y colaboradores (2003) observaron que la administración de IL1β exacerbó el incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular producido por la aplicación de NMDA en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Adicionalmente, estos autores observaron que la aplicación de IL1β indujo la fosforilación de la subunidad NR2A/B del receptor glutamatérgico tipo NMDA y la síntesis de IL6, así como excitotoxicidad (Viviani et al., 2003). Otros autores han mostrado que estos efectos inducidos por la aplicación de IL1β sobre los receptores glutamatérgicos tipo NMDA son exacerbados por la presencia de otras moléculas proinflamatorias como el TNFα en cultivos de neuronas humanas (Chao et al., 1995). En este mismo sentido, Brady y colaboradores (1994) observaron que después de administrar IL1β aumentó la expresión de *c-fos*, un marcador de actividad neuronal, en diferentes estructuras cerebrales. Por otro lado, Kawasaki y colaboradores (2008) observaron que la administración de IL1β induce un aumento en la frecuencia y en la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas y las inducidas por la aplicación de NMDA en neuronas de la médula espinal *in vitro*, así como una disminución en la frecuencia y la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas y las inducidas por la aplicación de GABA y de glicina, sugiriendo que la IL1β promueve la excitabilidad neuronal a través de la modulación de receptores glutamatérgicos y GABAérgicos. Adicionalmente, Clarkson y colaboradores (2017) mostraron que la aplicación de IL1β induce un incremento en la excitabilidad y la sincronización de neuronas corticales *in vitro*. Curiosamente, la aplicación de GABA o de midazolam, que es un agonista de los receptores GABA<sub>A</sub> (Evans & Viola-McCabe, 1996), no redujo la excitabilidad y la sincronización de las neuronas

tratadas con IL1 $\beta$  (Clarkson et al., 2017). Sin embargo, la aplicación de GABA o de midazolam redujo la excitabilidad y la sincronización neuronal en neuronas control, sugiriendo que la IL1 $\beta$  incrementa la excitabilidad y la sincronización neuronal a través de una reducción en la actividad y/o la expresión de los receptores GABA<sub>A</sub> (Clarkson et al., 2017). Juntas, estas evidencias sugieren que la IL1 $\beta$  incrementa la excitabilidad neuronal probablemente a través de la modulación de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA y GABAérgicos tipo GABA<sub>A</sub>. Adicionalmente, otras evidencias indican que la IL1 $\beta$  también podría incrementar la excitabilidad neuronal a través de la reducción de la recaptura de glutamato llevada a cabo por los astrocitos (Ye & Sontheimer, 1996).

Con respecto al rol de la IL1 $\beta$  en la inducción experimental de hiperexcitabilidad, se ha evidenciado que la administración intracerebroventricular de esta citocina potencia la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (Tao et al., 2015), así como el *status epilepticus* inducido con una inyección intrahipocampal de ácido kaínico (Vezzani et al., 1999; 2002). Adicionalmente, la administración intracerebral de IL1 $\beta$  acelera la epileptogénesis inducida con *kindling* eléctrico rápido en el hipocampo (Tao et al., 2015; Kolosowska et al., 2014; 2016) y aumenta la muerte neuronal en el hipocampo inducida por el *status epilepticus* (Medel-Matus et al., 2014). De forma consistente, la inhibición de la expresión de la IL1 $\beta$ , así como la administración intracerebroventricular de la proteína IL1Ra es capaz de disminuir la actividad epileptiforme (Vezzani et al., 1999; 2002; Pascoal et al., 2022). En suma, la IL1 $\beta$  favorece la excitabilidad neuronal, así como la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.

### **El factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ )**

El TNF $\alpha$  es una citocina proinflamatoria con múltiples funciones, entre las que destacan su acción inmunológica, la promoción de la proliferación y la diferenciación celular, así como de la apoptosis (Zelová & Hošek, 2013; Frago et al., 2014). La síntesis de TNF $\alpha$  es estimulada rápidamente por la activación de RRP's ante la presencia de estímulos inmunógenos del tipo DAMs y PAMs en el medio extracelular y por la consecuente activación de diferentes factores de transcripción,

como el NF $\kappa$ B, las proteínas activadoras (Aps, por sus siglas en inglés) 1 y 2, y el elemento de respuesta al adenosín monofosfato (AMP, por sus siglas en inglés) cíclico (CRE, por sus siglas en inglés) que, a su vez, promueven la transcripción del gen *TNFA* (Zelová & Hošek, 2013; Fragoso et al., 2014). El TNF $\alpha$  es producido primeramente como una proteína transmembranal y, posteriormente, es liberado en su forma soluble al espacio extracelular a través de la enzima convertidora del TNF $\alpha$  (TACE, por sus siglas en inglés), también llamada enzima desintegrina y metaloproteasa 17 (ADAM17, por sus siglas en inglés) (Zelová & Hošek, 2013; Fragoso et al., 2014). Ambas isoformas del TNF $\alpha$ , transmembranal y soluble, tienen actividad biológica principalmente a través de su acoplamiento con el TNFR tipo 1 y, en menor medida, con el TNFR tipo 2 con el que tiene menor afinidad (Zelová & Hošek, 2013; Fragoso et al., 2014). Ambos receptores son expresados principalmente de forma transmembranal en todas las células, aunque también pueden generarse una forma soluble a través de la enzima TACE (Zelová & Hošek, 2013; Fragoso et al., 2014). El acoplamiento del TNF $\alpha$  con su receptor TNFR tipo 1 conlleva una cascada de señalización celular que involucra el reclutamiento y la activación de moléculas señalizadoras, incluyendo dominios de muerte celular asociados al TNFR tipo 1, proteínas que interactúan con el receptor tipo 1 (RIP1, por sus siglas en inglés), el factor asociado al TNFR tipo 2 (TRAF2, por sus siglas en inglés) y proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés), que conllevan a la transcripción de citocinas proinflamatorias, como la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL6, a través de la activación de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y AP1 (Zelová & Hošek, 2013; Fragoso et al., 2014). En el sistema nervioso central, el TNF $\alpha$  es sintetizado principalmente por la microglía y los astrocitos, aunque en menor medida también por las neuronas (Balzano et al., 2020). Por lo anterior, se considera que el TNF $\alpha$  es una citocina que amplifica la inflamación, promoviendo la síntesis de moléculas proinflamatorias, principalmente a través de la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B (Zelová & Hošek, 2013; Fragoso et al., 2014).

El TNF $\alpha$  es capaz de exacerbar la excitabilidad neuronal en preparaciones *in vitro* e *in vivo* a través de diferentes mecanismos (Kawasaki et al., 2008; Chen et al., 2015 Shim et al., 2018). Kawasaki y colaboradores (2008) observaron que la

administración de TNF $\alpha$  induce un aumento en la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas y las inducidas por la aplicación de NMDA y de AMPA en neuronas de la médula espinal *in vitro*. Chen y colaboradores (2015) observaron que la aplicación de TNF $\alpha$  en un cultivo primario de neuronas corticales cerebelares incrementó la amplitud de las corrientes de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje en una forma dependiente de la concentración de la citocina. Este resultado se acompañó de un incremento de la expresión de las subunidades Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.6 de los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje, pero no se observaron diferencias en cuanto a la expresión del receptor TNFR tipo 1, sugiriendo que el TNF $\alpha$  podría influir en la excitabilidad neuronal a través de la sobreexpresión de canales iónicos de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje y no a través del aumento del receptor TNFR tipo 1 (Chen et al., 2015). En el mismo sentido, Shim y colaboradores (2018) mostraron que la aplicación del TNF $\alpha$  incrementó la excitabilidad intrínseca de las células de Purkinje cerebelares *in vitro*, observando un incremento progresivo de la tasa de disparo de estas neuronas, que fue dependiente de la activación receptor TNFR tipo 1. En otro estudio se observó que la aplicación de TNF $\alpha$  en cultivos de neuronas corticales favoreció la excitabilidad y la sincronización neuronal (Clarkson et al., 2017). La aplicación de GABA o de midazolam, que es un agonista del receptor GABA<sub>A</sub> (Evans & Viola-McCabe, 1996), abolió la actividad y la sincronización neuronal en las rebanadas control, mientras que en las rebanadas tratadas con TNF $\alpha$  abolió la sincronización de las neuronas corticales, pero no su excitabilidad individual (Clarkson et al., 2017). Lo anterior sugiere que el TNF $\alpha$  podría inducir excitabilidad y sincronización neuronal a través de la disminución de la actividad o la expresión de los receptores GABA<sub>A</sub>. A este respecto, en otro estudio se observó que la aplicación *in vitro* de TNF $\alpha$  disminuyó la expresión del receptor GABA<sub>A</sub> en neuronas hipocámpales, fenómeno que se asoció con una disminución de la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias miniatura en estas células y que mostró ser dependiente de la expresión del receptor TNFR tipo 1 en las neuronas (Pribiag & Stellwagen, 2013). Adicionalmente, Shandra y colaboradores (2002) mostraron que 24 horas después de la aplicación sistémica de TNF $\alpha$  se observó la aparición de actividad epileptiforme de tipo interictal en

estructuras corticales y subcorticales *in vivo*, evidenciando el efecto potenciador de la excitabilidad neuronal que induce esta citocina proinflamatoria.

La administración de TNF $\alpha$  también ha demostrado efectos proepileptiformes en modelos experimentales de hiperexcitabilidad y de epilepsia (Shandra et al., 2002; Riazi et al., 2008; Weinberg et al., 2013). Shandra y colaboradores (2002) observaron que la administración sistémica de TNF $\alpha$  resulta en un aumento en la duración de las crisis convulsivas inducidas con *kindling* eléctrico amigdalino. Un efecto similar fue reportado por Riazi y colaboradores (2008), quienes observaron un incremento en la severidad de las crisis convulsivas inducidas con PTZ. Asimismo, Weinberg y colaboradores (2013) observaron que el número y la duración de las crisis convulsivas incrementa una semana después de sobreexpresar TNF $\alpha$  humano en el hipocampo de animales previamente tratados con ácido kaínico en la amígdala. Así mismo, estos autores reportaron una reducción en el número de estimulaciones necesarias para inducir actividad epileptiforme generalizada con el modelo de *kindling* eléctrico amigdalino (Weinberg et al., 2013).

En conjunto, las evidencias descritas anteriormente muestran que el TNF $\alpha$  es capaz de incrementar la excitabilidad neuronal y de fomentar la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.

### **La IL6**

La IL6 es una citocina con propiedades proinflamatorias que es codificada por el gen *il6* y que es sintetizada a través de la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B (Heinrich et al., 2003; Brasier, 2010; Rose-John, 2018). En el sistema nervioso, la IL6 es sintetizada de forma ubicua por prácticamente todas las células del sistema nervioso central, incluyendo a las neuronas, a la microglía, a los astrocitos, a las células endoteliales y a los macrófagos no parenquimales (Schöbitz et al., 1992; 1993; März et al., 1998; Donegan et al., 2014; Blecharz-Lang et al., 2018). La IL6 induce sus efectos a través de su acoplamiento con el receptor de la IL6, que se expresa de forma transmembranal y soluble (Brasier, 2010). De forma similar al receptor TNFR tipo 1, el receptor transmembranal de la IL6 es escindido por la

enzima ADAM17, produciendo la isoforma soluble del receptor de la IL6 (Brasier, 2010). En el cerebro, el receptor de la IL6 es expresado de forma ubicua principalmente por las neuronas, los oligodendrocitos y las células endoteliales y, en menor medida, por los astrocitos y la microglía (Schöbitz et al., 1992; 1993; Heinrich et al., 2003; Brasier, 2010; Burton et al., 2011; Anesten et al., 2016; Hasegawa-Ishii et al., 2016; Rose-John, 2018). Al acoplarse la IL6 con su receptor, induce el reclutamiento de la glicoproteína de membrana 130 (gp130), con lo que inicia una cascada de señalización intracelular que involucra el reclutamiento y la activación de la cinasa *Janus* 1 (JAK1, por sus siglas en inglés) y del complejo transductor de señal y activador de la transcripción tipo 3/5 (STAT3/5, por sus siglas en inglés) que, a su vez, son capaces de inducir la activación del factor de transcripción NFκB y la consecuente transcripción de citocinas proinflamatorias como la IL1β, el TNFα y la IL6, entre otras (Heinrich et al., 2003; Brasier, 2010; Rose-John, 2018).

Al igual que la IL1β y el TNFα, también se ha reportado que la IL6 favorece la excitabilidad neuronal (Kawasaki et al., 2008; Anesten et al., 2016; König et al., 2016; Mirabella et al., 2021). Por ejemplo, Anesten y colaboradores (2016) mostraron que la aplicación de IL6 produce un incremento transitorio del Ca<sup>2+</sup> intracelular en neuronas del núcleo del tracto solitario *in vitro*. Los autores observaron que este efecto fue llevado a cabo a través de los receptores de la IL6 y que fue ocluido a través de la disminución de la concentración del Ca<sup>2+</sup> extracelular, sugiriendo que el incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular ocasionado por la administración de IL6 probablemente está mediado por la activación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Anesten et al., 2018). En este sentido, König y colaboradores (2016) observaron que la aplicación intratecal de IL6 exacerbó la actividad neuronal medular que resulta de la estimulación mecánica de la pata de los roedores. Asimismo, observaron que este efecto fue mediado por el receptor de la IL6 y está asociado con un aumento de la citocina proinflamatoria TNFα (König et al., 2016). Adicionalmente, Mirabella y colaboradores observaron un incremento en la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura espontáneas, un aumento del transportador vesicular de glutamato y un incremento en la

conectividad intrahipocampal en animales adultos expuestos prenatalmente a la IL6. Resultados similares fueron reportados por Wei y colaboradores (2012) quienes observaron que la sobreexpresión de IL6 en el cerebro resulta en un aumento sustancial de la expresión del transportador vesicular de glutamato tipo 1, así como una disminución de la expresión del transportador vesicular de GABA en el hipocampo y en la corteza cerebral, sugiriendo que la IL6 causa un desbalance entre la excitación y la inhibición neuronal. Por otro lado, Kawasaki y colaboradores (2008) observaron que la IL6 induce una disminución en la frecuencia de las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas y las inducidas por la aplicación de GABA y de glicina en neuronas de la médula espinal *in vitro*. Estas evidencias muestran que la IL6 promueve la excitabilidad neuronal a través del aumento de la neurotransmisión glutamatérgica y la disminución de la neurotransmisión GABAérgica.

Asimismo, la IL6 ha mostrado tener efectos favorecedores de la inducción experimental de hiperexcitabilidad (Kalueff et al., 2004; De Sarro et al., 2004). Kalueff y colaboradores (2004) observaron que la administración de IL6 resulta en un incremento de la severidad y la duración de la actividad convulsiva inducida con PTZ, así como la mortalidad asociada a las crisis (Kalueff et al., 2004). En el mismo sentido, en ratones deficientes de IL6, se ha observado una disminución de la severidad de la actividad convulsiva inducida por la administración intracerebroventricular de diferentes fármacos convulsivantes, como el PTZ, el NMDA, el ácido kaínico y la 4-AP (De Sarro et al., 2004).

### **Otras moléculas proinflamatorias**

Se ha evidenciado que la administración de otras moléculas proinflamatorias tiene el mismo efecto favorecedor de la excitabilidad y de la hiperexcitabilidad neuronal que las citocinas antes mencionadas (Frantseva et al., 1998; Patankar et al., 2014; Gross et al., 2017; Käufer et al., 2018). Por ejemplo, la administración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que es una especie reactiva de oxígeno (Finkel, 2011), produce actividad epileptiforme en rebanadas de cerebro y crisis convulsivas en humanos irrigados de forma epidural (Frantseva et al., 1998; Patankar et al., 2014). Asimismo, otras moléculas



que participan en la inflamación, como las quimiocinas CCL2 y CX3CL1, han demostrado tener un efecto proepileptiforme, ya que en animales que carecen de sus receptores (CCR2 y CX3CR1, respectivamente) presentan actividad convulsiva con menor severidad y una disminución de la neurodegeneración inducida por la administración intracerebral del virus de *Theiler*, que induce epileptogénesis (Käufer et al., 2018). Estos resultados refuerzan la noción de que las moléculas proinflamatorias promueven la excitabilidad neuronal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.

### **Moléculas proinflamatorias provenientes de la microglía**

Algunas investigaciones han sugerido que las moléculas proinflamatorias provenientes específicamente de la microglía podrían favorecer la excitabilidad neuronal y la actividad epileptiforme inducida de forma experimental (Zheng et al., 2010; Zhao et al., 2018). Zhao y colaboradores (2018) administraron de forma intracerebroventricular medio condicionado de microglía previamente activada en cultivo con el fármaco convulsivante coriaria lactona. Dicho medio condicionado contenía altas concentraciones de moléculas proinflamatorias derivadas de la microglía, como la IL1 $\beta$  y el TNF $\alpha$ , y observaron que, minutos después de la administración del medio condicionado, los animales desarrollaron hiperexcitabilidad en el hipocampo y crisis convulsivas, además de un aumento del glutamato extracelular, también en el hipocampo (Zhao et al., 2018). Resultados similares fueron observados por Zheng y colaboradores (2010), quienes, aplicando de forma intracerebroventricular medio condicionado de microglía previamente activada en cultivo con ácido kaínico, observaron que aumentó la actividad sináptica excitatoria y la expresión de receptores glutamatérgicos tipo NMDA en el hipocampo. Juntas, estas evidencias indican que las moléculas proinflamatorias derivadas de la microglía activada exacerban la actividad neuronal y favorecen el establecimiento de la hiperexcitabilidad.

En suma, las moléculas proinflamatorias, particularmente las que provienen de la microglía, inducen efectos que favorecen la excitabilidad neuronal y la inducción experimental de hiperexcitabilidad.

## **Papel de la manipulación farmacológica de la microglía en los efectos inducidos por la HIC y en la inducción experimental de hiperexcitabilidad.**

Antes de mencionar la evidencia experimental que da cuenta del efecto de la manipulación microglial sobre los efectos inducidos por la HIC y la inducción experimental de hiperexcitabilidad, se hará una breve descripción de este tipo celular.

### **La microglía.**

La microglía es un grupo de células inmunitarias residentes en el parénquima del sistema nervioso central, cuya función primordial es mediar la respuesta inflamatoria en el tejido nervioso (Verkhatsky & Butt, 2007). Estas células comprenden del 10 al 20 % de las células gliales en el sistema nervioso central, en donde se encuentran de forma ubicua y distribuidas heterogéneamente (Río-Hortega, 1919a; 1921; Lawson et al., 1990; Mittelbronn et al., 2000; Verkhatsky & Butt, 2007; Sierra et al., 2010; 2016; Pintado et al., 2011; Doorn et al., 2015; Ribeiro-Xavier et al., 2015; Grosselin et al., 2017). La microglía en condiciones fisiológicas se caracteriza por tener un soma pequeño de aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  de largo, situado preferencialmente en la sustancia gris, que emite largos y tortuosos apéndices filiformes, también llamados ramificaciones, guarnecidos de múltiples excrescencias laterales llamadas filipodias (Río-Hortega, 1919a; Sierra et al., 2016; Bernier et al., 2019; Alekseeva et al., 2019). Esta caracterización morfológica de la microglía fue realizada a principios del siglo XX por Pío del Río-Hortega, quien fue un científico español que describió y nombró por primera vez a la microglía como un tipo de neuroglia (Río-Hortega, 1919a; Sierra et al., 2016; 2019; Del Río-Hortega Bereciartu, 2020), en oposición al mal llamado “tercer elemento” o “células apolares” de Santiago Ramón y Cajal, que no diferenciaba a los oligodendrocitos de la microglía (Ramón y Cajal, 1913; García-Marín et al., 2007; Sierra et al., 2019; Del Río-Hortega Bereciartu, 2020). La similitud de la morfología microglial en condiciones fisiológicas con la morfología de las células dendríticas de la piel (Río-Hortega, 1919b; Lawson et al., 1990; Sierra et al., 2016), junto con la observación

de la capacidad fagocítica de la microglía en condiciones patológicas (Río-Hortega, 1919d; Sierra et al., 2016), permitió que Pío del Río-Hortega hipotetizara que la microglía proviene de un linaje mesodérmico (Río-Hortega, 1919c; 1921; Sierra et al., 2016; Del Río-Hortega Bereciartu, 2020). Esta cuestión fue demostrada posteriormente por Ginhoux y colaboradores (2010), quienes concluyeron que la microglía proviene de macrófagos primitivos del saco vitelino que invaden el cerebro en etapas embrionarias. Inclusive, Pío del Río-Hortega fue capaz de describir la distribución de la microglía durante el desarrollo embrionario, proponiendo a las meninges y a los vasos sanguíneos como las rutas de invasión de las células progenitoras microgliales en el cerebro en desarrollo (Del Río-Hortega, 1921). En las últimas dos décadas se ha evidenciado que, además de su función inmunológica, la microglía tiene un rol activo en la fisiología de los circuitos neuronales (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Kettenmann et al., 2011; 2012; Ekdahl, 2012; Ferrini & De Koninck, 2013; Colonna & Butovsky, 2017; Akiyoshi et al., 2018; Stratoulis et al., 2019). Los estudios pioneros de Costero (1930), mediante microscopía óptica, demostraron que las células de la microglía tienen procesos altamente móviles y que estas células presentan actividad migratoria y proliferativa, permitiendo proponer que la microglía tiene una naturaleza dinámica. Más recientemente, utilizando microscopía de dos fotones en condiciones *in vivo*, Davalos y colaboradores (2005), así como Nimmerjahn y colaboradores (2005), de forma independiente, corroboraron que los procesos de las células microgliales son altamente dinámicos en condiciones fisiológicas, elongándose y retrayéndose a una velocidad de 1.5  $\mu\text{m}$  por minuto, dando la impresión de que “vigilan” o “monitorean” constantemente el microambiente neuronal, por lo que a la microglía en estado fisiológico se le denominó como “vigilante” (Verkhatsky & Butt, 2007; Kettenmann et al., 2011; 2012; Arcuri et al., 2017; Augusto-Olivera et al., 2019). Esta “vigilancia” que ejercen los procesos microgliales es consecuencia principalmente de la activación de receptores purinérgicos tipo P2Y<sub>12</sub> (P2Y<sub>12</sub>R, por sus siglas en inglés) y glutamatérgicos tipo NMDA en la membrana de estas células, lo que atrae a los procesos microgliales hacia la fuente de adenosín trifosfato (ATP) y de glutamato, respectivamente, resultando en un contacto entre el proceso

microglial y varios dominios neuronales, en una forma dependiente de la concentración de estas moléculas (Davalos et al., 2005; Koizumi et al., 2013; Eyo et al., 2014; 2016; Peng et al., 2019; Cserép et al., 2020), así como también en una forma dependiente de la actividad neuronal (Li et al., 2012; Eyo et al., 2015; Pfeiffer et al., 2016; Liu et al., 2017; Nebeling et al., 2019). Aunado a lo anterior, recientemente Liu y colaboradores (2019), así como Stowell y colaboradores (2019), de forma independiente, demostraron que la “vigilancia” de los procesos microgliales es modulada por el estado fisiológico del organismo, teniendo menor actividad en estado de vigilia y mayor actividad en estado de anestesia. Mediante farmacología y herramientas de manipulación celular selectiva, como la optogenética y la quimiogenética, ambos grupos de investigación observaron que varios parámetros de la “vigilancia” de los procesos microgliales, como la velocidad, la extensión y la territorialidad de los procesos microgliales, son modulados por el estado fisiológico del organismo a través de receptores adrenérgicos tipo  $\beta 2$  en la microglía, activados por la noradrenalina proveniente de las neuronas del *locus coeruleus* (Liu et al., 2019; Stowell et al., 2019). Lo anterior, permite concluir que un incremento de la actividad neuronal del *locus coeruleus* durante el estado de vigilia resulta en la inhibición de la “vigilancia” de los procesos microgliales *in vivo*. En el mismo sentido, también hay evidencia que sugiere que la “vigilancia” de los procesos microgliales modula la actividad neuronal (Li et al., 2012; Akiyoshi et al., 2018; Nebeling et al., 2019). El registro simultáneo de la actividad neuronal y de la microglía, mediante microscopía de dos fotones *in vivo*, ha permitido observar que el contacto de los procesos microgliales con los botones sinápticos correlaciona con una disminución de la sincronización de la actividad de las neuronas contactadas (Li et al., 2012; Akiyoshi et al., 2018; Nebeling et al., 2019). Esta modulación de la actividad neuronal por parte de la microglía se ha explicado por la fagocitosis de botones sinápticos altamente activos (Li et al., 2012; Antonucci et al., 2012; Luo et al., 2016) o por la liberación de mediadores microgliales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) o el ATP (Trang et al., 2009; Ferrini & De Koninck, 2013; Shinozaki et al., 2014; Huang et al., 2021), lo que contribuye a reestablecer la homeostasis en el microcircuito neuronal (Shinozaki et

al., 2014; Leal et al., 2017b; Peng et al., 2019). Juntos, estos trabajos evidencian una regulación recíproca entre la actividad de los circuitos neuronales y la dinámica microglial en condiciones fisiológicas, tanto en la micro como en la mesoescala. Además, también recientemente, se ha consolidado el hecho de que la microglía está involucrada en una serie de procesos fisiológicos durante el desarrollo (Kettenmann et al., 2012; Wolf et al., 2017; Sierra et al., 2019; Augusto-Olivera et al., 2019), como la sinaptogénesis (Paolicelli et al., 2011; Miyamoto et al., 2016), la poda sináptica (Färber et al., 2009; Paolicelli et al., 2011), la neurogénesis (Walton et al., 2006), la vasculogénesis (Dudvarski-Stankovic et al., 2016), la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Dudvarski-Stankovic et al., 2016) y la plasticidad sináptica (Kyrargyri et al., 2015), así como en procesos fisiológicos complejos como la respiración y el miedo (Lorea-Hernández et al., 2016; Peng et al., 2019; Camacho-Hernández et al., 2019; 2022). A pesar de los múltiples procesos fisiológicos en los que la microglía participa (Kettenmann et al., 2013; Wolf et al., 2017; Sierra et al., 2019; Augusto-Olivera et al., 2019), es en el contexto de la patología en donde más se ha estudiado a estas células (Verkhatsky & Butt, 2007; Kettenmann et al., 2011; 2013; Taylor et al., 2014; Wolf et al., 2017; Sierra et al., 2019; Augusto-Olivera et al., 2019). Desde las descripciones pioneras de las células gliales en el siglo XIX (Kettenmann et al., 2011; Taylor et al., 2014; Wolf et al., 2017; Sierra et al., 2019), hechas por Rudolf Virchow, Franz Nissl, Alois Alzheimer y Nicolás Achúcarro, entre otros, fue evidente que en el tejido cerebral *postmortem* de personas con patologías neurodegenerativas abundaba la presencia de células con forma redondeada y alargada, presumiblemente microglía, a las que se les nombró células abastoadas (*Stäbchenzellen*, en alemán) o también cuerpos granulo-adiposos (*Körnchenzellen*, en alemán), debido a la presencia de cuerpos granulosos, semejantes a las vacuolas, dentro de su citoplasma (Graeber, 2010; Kettenmann et al., 2011; Taylor et al., 2014; Ezpeleta et al., 2019). Años más tarde, Pío del Río-Hortega (1919d; Sierra et al., 2016) y posteriormente Blinzinger y Kreutzberg (1968), describieron metódicamente que la microglía se transforma morfológica y funcionalmente tras ocurrir una lesión cerebral, pasando de un fenotipo ramificado y “quiescente” hacia un fenotipo con forma redondeada y con capacidad fagocítica, migratoria y

proliferativa. Actualmente, es sabido que, en condiciones patológicas, la presencia extracelular de estímulos inmunógenos del tipo MADs o de MAPs activa a receptores RRP expresados en la membrana celular de la microglía (Verkhatsky & Butt, 2007; Kettenmann et al., 2011; 2013; Verkhatsky & Noda, 2014; Arcuri et al., 2017). La activación de los RRP microgliales induce modificaciones transcripcionales en la microglía, que resultan en la reorganización de su citoesqueleto, contribuyendo a la adquisición de una morfología tipo ameboide, a la orientación quimiotáctica hacia las zonas afectadas y a la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias al espacio extracelular, con la finalidad de eliminar el agente patogénico (Hetier et al., 1988; Kreutzberg, 1996; Kettenmann et al., 2011; 2013; Freilich et al., 2013; Verkhatsky & Noda, 2014; Sierra et al., 2016; Arcuri et al., 2017; Liu & Quan, 2018; Bowyer et al., 2020). Con esto, se puede concluir que la activación proinflamatoria de la microglía consiste en la transición de un fenotipo “vigilante” hacia un fenotipo tipo macrófago proinflamatorio, también conocido como fenotipo M1 (Kreutzberg, 1996; Verkhatsky & Noda, 2014; Ransohoff, 2016; Arcuri et al., 2017).

### **Manipulación farmacológica de la microglía.**

Clásicamente, la modulación farmacológica de la microglía hacia un fenotipo proinflamatorio se ha llevado a cabo mediante la administración de LPS (Buttini et al., 1995; Palsson-McDermott & O'Neill, 2004; Kigerl et al., 2014; Peña-Ortega, 2016; Batista et al., 2019; Bowyer et al., 2020). El LPS es un componente de la pared celular externa de las bacterias Gram negativas que induce un potente efecto inmunogénico sobre la microglía (Palsson-McDermott & O'Neill, 2004; Qin et al., 2005; Pintado et al., 2011; Fricker et al., 2012; Peña-Ortega, 2016; Batista et al., 2019). La administración de LPS en cultivos primarios de microglía induce la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias, la reorganización del citoesqueleto microglial hacia una morfología ameboide e incluso la promoción de su actividad fagocítica (Qin et al., 2005; Lund et al., 2006; Fricker et al., 2012). Principalmente, el LPS induce sus efectos inmunogénicos debido a su acoplamiento con los receptores TLR4 (Poltorak et al., 1998; Palsson-McDermott & O'Neill, 2004; Pintado

et al., 2011; Peña-Ortega, 2016; Batista et al., 2019). Sin embargo, se ha descrito que en cultivos de microglía que carece del receptor TLR4 aún es posible inducir activación proinflamatoria de estas células como resultado de la aplicación del LPS (Qin et al., 2005). Lo anterior puede ser explicado por la afinidad del LPS hacia otros receptores presentes en la microglía, como los receptores CD14, los *scavenger* y los de complemento (Poltorak et al., 1998; Kaya et al., 2005; Kigerl et al., 2014; Bodea et al., 2014; Tarassishin et al., 2014; Peña-Ortega, 2016). También, la caspasa 11 es capaz de detectar el LPS en el citosol y de desencadenar procesos proinflamatorios (Yang et al., 2015). A pesar de que clásicamente se ha considerado que el LPS es un potente modulador exclusivo de la microglía, es importante resaltar que su aplicación también puede tener efectos sobre otros tipos celulares, pues sus blancos farmacológicos se encuentran expresados en células distintas a la microglía (Kigerl et al., 2014; Peña-Ortega et al., 2016). Por ejemplo, los receptores TLR4, los *scavenger* y los de complemento, a los que se acopla el LPS, también son expresados en astrocitos, oligodendrocitos, neuronas y células endoteliales, así como en macrófagos no parenquimales (Husemann et al., 2002; Maroso et al., 2010; Veerhuis et al., 2011; Godoy et al., 2012; Kremer et al., 2013; Peña-Ortega et al., 2016; Morita-Takemura et al., 2019). De hecho, la aplicación de LPS en cultivos primarios de estos tipos celulares también es capaz de producir la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias (Gayle et al., 2002; Tarassishin et al., 2014). Con lo anterior, se puede concluir que la aplicación de LPS induce una potente respuesta inmunogénica que involucra a múltiples tipos celulares, es decir, que el LPS es una estrategia experimental para inducir inflamación que carece de especificidad celular.

Por otra parte, la inhibición farmacológica de la activación proinflamatoria de la microglía clásicamente se ha llevado a cabo mediante la aplicación de minociclina, que es un antibiótico sintético de amplio espectro que tiene propiedades antiinflamatorias (Zemke & Majid, 2004; Müller et al., 2016). La aplicación de minociclina en cocultivos de neuronas y microglía (Tikka et al., 2001) y en cultivos primarios de microglía (Kobayashi et al., 2013), inhibe la síntesis y liberación de varias citocinas proinflamatorias como la IL1 $\beta$ , la IL6, la IL8 y el TNF $\alpha$  (Tikka et al.,

2001; Kobayashi et al., 2013), así como de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Tikka et al., 2001; Kobayashi et al., 2013; Pardo-Peña et al., 2018b), inducidas por la administración de inmunógenos como el LPS o de sustancias citotóxicas como el ácido kaínico o el glutamato en altas concentraciones (Tikka et al., 2001; Kobayashi et al., 2013; Pardo-Peña et al., 2018b). Además, la aplicación de minociclina inhibe la migración y la proliferación de la microglía *in vitro* inducidas por la administración de sustancias citotóxicas como el ácido kaínico o el glutamato en altas concentraciones, así como de nucleótidos como el adenosín difosfato (ADP; Tikka et al., 2001; Nutile-McMenemy et al., 2007; Kobayashi et al., 2013). El potencial antiinflamatorio de la minociclina sobre la microglía se ha utilizado como posible tratamiento para una variedad de enfermedades neurológicas, como la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica y las enfermedades de Parkinson, de Huntington y de Alzheimer, con resultados benéficos (Zemke & Majid, 2004). Sin embargo, en una revisión publicada por Möller y colaboradores (2016), se cuestionó el uso de la minociclina como un modulador exclusivo de la activación microglial, principalmente por sus efectos directos sobre los astrocitos, los oligodendrocitos y los macrófagos no parenquimales, e incluso las neuronas, en preparaciones *in vivo* e *in vitro*. Por otro lado, a pesar de los efectos benéficos de la minociclina sobre la inflamación cerebral (Zemke & Majid, 2004; Hanlon et al., 2016), también se ha mostrado que tiene efectos citotóxicos sobre varios tipos celulares (Keller et al., 2011; Arnoux et al., 2014) y que potencia el daño neuronal inducido por la hipoxia (Tsuji et al., 2004). En suma, se puede concluir que a pesar del potente efecto modulador de la inflamación que induce la minociclina sobre la activación microglial, su acción no es exclusiva de estas células. Por lo tanto, la minociclina es una estrategia experimental con inespecificidad celular que inhibe la inducción de inflamación (Tikka et al., 2001; Möller et al., 2016).

### **Manipulación farmacológica de la microglía en los efectos inducidos por la HIC.**

Con respecto a la manipulación farmacológica de la microglía, con LPS o con minociclina, en los efectos inducidos por la HIC, pocas evidencias se han reportado



(Kiernan et al., 2016). Sin embargo, algunos estudios sugieren que la manipulación farmacológica de la microglía es capaz de modular algunas de las consecuencias patológicas inducidas por la HIC (Gölz et al., 2014; Stokes et al., 2017; Camacho-Hernández et al., 2022). En cuanto a la manipulación farmacológica de la microglía con LPS, se ha observado que su aplicación incrementa la inflamación inducida por la HIC. Por ejemplo, Sapin y colaboradores (2015) observaron que la administración de LPS durante la HIC resulta en una exacerbación de la respuesta inflamatoria en el hipocampo. Estos autores observaron que en los animales sujetos a HIC y tratados con LPS la síntesis de la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL6 fue mayor que la de los animales tratados con HIC, es decir, que la administración de LPS potenció la respuesta inflamatoria hipocampal que resulta de la HIC (Sapin et al., 2015). En el mismo sentido, Gölz y colaboradores (2014) mostraron que la inducción *in vitro* de hipoxia intermitente por 48 horas induce un incremento sustancial en la liberación de la especie reactiva de oxígeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un cultivo de células periodontales humanas y que la aplicación de LPS exacerbó la liberación de esta especie reactiva de oxígeno (Gölz et al., 2014).

La inhibición farmacológica de la activación microglial a través de la administración de minociclina reduce los efectos patológicos inducidos por la HIC (Stokes et al., 2017; Camacho-Hernández et al., 2022). Por ejemplo, Stokes y colaboradores (2017) aplicaron minociclina 24 horas antes de la inducción de hipoxia por 7 días y observaron que este fármaco evitó la aclimatación ventilatoria a la hipoxia, que es un incremento en la ventilación observado durante periodos de hipoxia (Powell et al., 1998). Además, la minociclina disminuyó la microgliosis y astrogliosis en el núcleo del tracto solitario (Stokes et al., 2017). Por otro lado, Camacho-Hernández y colaboradores (2022) mostraron que la aplicación *in vitro* de minociclina es capaz de revertir parcialmente los efectos inducidos por la HIC en etapa gestacional sobre la regularidad del ritmo respiratorio generada por el complejo Pre-Bötzinger en animales neonatos.

### **Manipulación farmacológica de la microglía en modelos experimentales de hiperexcitabilidad y de epilepsia.**

En cuanto al efecto de la manipulación farmacológica de la microglía, con LPS y minociclina, sobre la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental, existen resultados contradictorios. Con respecto a la manipulación farmacológica de la microglía con LPS existe evidencia que indica que su administración aumenta la actividad epileptiforme (Sayyah et al., 2003a; Rodgers et al., 2009; Kolosowska et al., 2016), sin embargo, también hay reportes que indican efectos completamente opuestos (Sayyah et al., 2003b; Ahmadi et al., 2013; Eslami et al., 2015), inclusive utilizando la misma metodología experimental (Ahmadi et al., 2013; Kolosowska et al., 2016). Se ha demostrado que la administración tópica de LPS sobre la corteza cerebral es capaz de inducir actividad epileptiforme mediante la liberación de IL1 $\beta$  (Rodgers et al., 2009; Gullo et al., 2014). Por otro lado, la administración intrahipocampal de LPS acelera la epileptogénesis inducida con el modelo de *kindling* eléctrico hipocampal (Kolosowska et al., 2016). También, la administración sistémica de LPS reduce el umbral para exhibir la actividad epileptiforme inducida con PTZ (Sayyah et al. 2003a). Adicionalmente, Kóvacs y colaboradores (2014) reportaron que la administración sistémica de LPS incrementa la cantidad de descargas epileptiformes en tres modelos genéticos de crisis de ausencia. La preexposición al LPS, en etapas postnatales, también tiene efectos sobre la inducción de hiperexcitabilidad, mostrando una reducción en el umbral para desarrollar esta actividad y un incremento en la severidad de la actividad convulsiva y electrofisiológica inducida con ácido kaínico y pilocarpina (Auvin et al., 2007; Riazi et al., 2010). En contraste, existen reportes que muestran que el LPS tiene un efecto antiepileptiforme (Sayyah et al., 2003b; Ahmadi et al., 2013; Eslami et al., 2015). Por ejemplo, Ahmadi y colaboradores (2013), observaron que la administración intrahipocampal de LPS retarda la epileptogénesis y disminuye la severidad de la actividad convulsiva inducida con el modelo de *kindling* eléctrico hipocampal. Resultados similares fueron reportados previamente por Sayyah y colaboradores (2003b), quienes administraron LPS de forma intracerebroventricular y observaron que la administración de este inmunógeno disminuyó la severidad de la actividad

convulsiva y retardó la epileptogénesis inducida con el modelo de *kindling* eléctrico amigdalino. Por otro lado, Eslami y colaboradores (2015) reportaron que la administración sistémica de LPS, 5 días antes de la inducción de un traumatismo craneoencefálico, aumentó el umbral para inducir crisis convulsivas y redujo la severidad de las crisis convulsivas inducidas con la administración repetitiva de PTZ, así como la neurodegeneración y el número de células inmunoreactivas a IL1 $\beta$  y a TNF $\alpha$ , producidos por el traumatismo craneoencefálico (Eslami et al., 2015). Asimismo, también existen reportes que indican que la administración de LPS no tiene efectos sobre la inducción de hiperexcitabilidad (Yuhas et al., 1995; Sayyah et al., 2003b; Mirrione et al., 2010; Akhlaghi et al., 2012; Eslami et al., 2015). Por ejemplo, Yuhas y colaboradores (1995) observaron que administraron sistémica de LPS no afectó la severidad de las crisis convulsivas inducidas con PTZ. Asimismo, Sayyah y colaboradores (2003b) reportaron que la administración intracerebroventricular de LPS cada tercer día no modificó la epileptogénesis inducida con el modelo de *kindling* eléctrico amigdalino. Adicionalmente, estos mismos autores reportaron que la administración intracerebroventricular de LPS no modificó la severidad de las crisis convulsivas ni la duración de la actividad electrofisiológica epileptiforme ya establecida (Sayyah et al., 2003b). Por otro lado, Mirrione y colaboradores (2010) administraron LPS de forma sistémica 24 horas antes de la inducción de *status epilepticus* con pilocarpina y observaron que la severidad de las crisis convulsivas no era significativamente diferente de los animales control. También, Akhlaghi y colaboradores (2012) mostraron que la administración de LPS en la amígdala no afectó el desarrollo de la epileptogénesis inducida con *kindling* eléctrico amigdalino. En el mismo sentido, Eslami y colaboradores (2015) observaron que la administración sistémica de diferentes dosis de LPS, 5 días antes de la administración repetitiva de PTZ, no alteró el umbral para inducir crisis convulsivas. Como se mencionó anteriormente, los blancos farmacológicos del LPS son variados y estos son expresados por múltiples tipos celulares, por lo que su efecto carece de especificidad celular (Kigerl et al., 2014; Peña-Ortega et al., 2016). Lo anterior podría explicar los resultados contradictorios observados en la literatura (Kigerl et al., 2014; Peña-Ortega et al., 2016).

Por otra parte, resultados similares han sido observados con el uso de la minociclina, en donde su aplicación ha mostrado tener efectos benéficos sobre la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental (Abraham et al., 2012; Nasr et al., 2013; Ahmadirad et al. 2014; Wang et al., 2015), así como efectos favorecedores de la inducción de dicha actividad (Nasr et al., 2013; Russman et al., 2106). Por ejemplo, la administración sistémica de minociclina retarda la epileptogénesis inducida con *kindling* eléctrico amigdalino y disminuye la severidad de la actividad convulsiva inducida con PTZ (Nasr et al., 2013; Ahmadirad et al., 2014). También, la administración sistémica de minociclina en animales epilépticos disminuye la frecuencia, la severidad y la duración de las crisis convulsivas espontáneas y recurrentes (Wang et al., 2015). No obstante, de forma similar a lo que ocurre con el LPS, existen reportes que indican que la minociclina favorece al desarrollo de hiperexcitabilidad (Nasr et al., 2013; Russman et al., 2106). Por ejemplo, Nasr y colaboradores (2013), en el mismo trabajo en donde reportan que la epileptogénesis inducida con *kindling* eléctrico amigdalino es retrasada por la administración de minociclina, también observan que la administración de minociclina aumentó la duración de la actividad convulsiva y de la actividad electrofisiológica epileptiforme. Russman y colaboradores (2016) observaron que los animales tratados con minociclina no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo de la actividad convulsiva espontánea ni en la neurodegeneración inducida por esta actividad, en un modelo experimental de epilepsia (Russman et al., 2016). Inclusive, la minociclina tiende a incrementar la frecuencia de las crisis convulsivas espontáneas (Russman et al., 2016). De forma similar al LPS, los resultados contradictorios obtenidos de la administración de minociclina pueden explicarse por su inespecificidad celular, pues se ha reportado que su administración no sólo inhibe la activación de la microglía, sino que también modula la activación de los macrófagos no parenquimales, además de la actividad de otras células gliales y de las neuronas (Tikka et al., 2001; Liu et al., 2015; Möller et al., 2016; Hanlon et al., 2016). Lo anterior, se plantea como necesario el uso de estrategias experimentales que permitan la manipulación selectiva de la microglía, para de esta forma evaluar

su papel en la inducción de la hiperexcitabilidad neuronal y en la hiperexcitabilidad ya inducida.

### **Estrategias experimentales de manipulación selectiva de los macrófagos cerebrales.**

Existen múltiples estrategias experimentales que han sido utilizadas para estudiar el rol específico de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en condiciones fisiológicas y patológicas (Elmore et al., 2014; Grace et al., 2016; 2018; Han et al., 2019; Binning et al., 2020; Saika et al., 2020; Coleman et al., 2020; Klawonn et al., 2021; Yi et al., 2021a; 2021b; Saika et al., 2021; Dumas et al., 2021; Laprel et al., 2021). Es importante resaltar que, a pesar del avance que han tenido las estrategias experimentales actualmente disponibles para manipular de forma selectiva a poblaciones celulares específicas en el sistema nervioso central (Boyden et al., 2005; Urban & Roth, 2007; Deisseroth, 2011; 2015; Ben-Shaan et al., 2016; Dobrzanski & Kossut, 2017; Goutaudier et al., 2019), la manipulación selectiva de la microglía se ha complicado debido a la similitud transcriptómica de estas células con respecto a los macrófagos no parenquimales (Wieghofer & Prinz, 2016; Van Hove et al., 2019; Utz & Greter, 2019; Dumas et al., 2021; Provenzano et al., 2021). No obstante, también es importante resaltar que la aplicación de estas estrategias experimentales resultará en la manipulación exclusiva de los macrófagos cerebrales (Wieghofer & Prinz, 2016; Dumas et al., 2021), proveyendo un avance metodológico con respecto a las aproximaciones farmacológicas (Wieghofer & Prinz, 2016). Asimismo, recientemente se ha reportado un marcador molecular llamado proteína transmembranal 119 (tmem119, por sus siglas en inglés) que, en condiciones fisiológicas, en el sistema nervioso central es expresado exclusivamente por las células microgliales y no por los macrófagos no parenquimales (Sato et al., 2016; Bennet et al., 2016; Vankriekelsvenne et al., 2021), sin embargo, a la fecha, aún no existen trabajos en donde se haya empleado a este marcador para manipular de forma selectiva a las células microgliales (Kaiser & Feng, 2019). A continuación, se detallarán algunas de estas estrategias experimentales, incluyendo a la

manipulación genética, a la depleción farmacológica y genética de los macrófagos cerebrales, así como a la optogenética y a la quimiogenética.

### **Manipulación genética.**

La inserción o el silenciamiento de genes mediante ingeniería genética ha sido una de las herramientas experimentales más utilizadas para manipular la fisiología de los macrófagos cerebrales y estudiar su papel en diversos circuitos neuronales *in vivo* (Wieghofer & Prinz, 2016; Dumas et al., 2021; Provenzano et al., 2021). Gracias a la aplicación de técnicas de secuenciación genómica masiva y de célula única en el sistema nervioso central, fue posible diferenciar una variedad de genes que son exclusivos de los macrófagos cerebrales, por ejemplo, los genes *CD11b*, *Sall1*, *Aif1*, *P2y12r*, *Csf1r*, *Gpr34*, *Hexb* y *Cx3cr1* (Goldman et al., 2016; Shemer et al., 2018; Van Hove et al., 2019; McKinsey et al., 2020; Masuda et al., 2020). Posteriormente, la creación y disponibilidad comercial de animales transgénicos que expresan a la recombinasa Cre bajo el control de los promotores de estos genes, abrió la posibilidad de manipular genéticamente a estas células, mediante la inserción o el silenciamiento de genes en estas poblaciones celulares (Wieghofer & Prinz, 2016; Masuda et al., 2020; Dumas et al., 2021; Provenzano et al., 2021). Por ejemplo, con el objetivo de investigar el papel del BDNF proveniente de los macrófagos cerebrales sobre la plasticidad sináptica inducida por el aprendizaje motor, Parkhurst y colaboradores (2013) cruzaron a ratones que expresaban a la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen *Cx3cr1* (*Cx3cr1<sup>Cre</sup>*), con ratones que tenían floxeado el gen del BDNF (*BDNF<sup>flx/flx</sup>*), con lo que obtuvieron una cepa de animales cuyos macrófagos cerebrales no expresaron al BDNF (*Cx3cr1<sup>Cre</sup>:BDNF<sup>flx/flx</sup>*). Con esta estrategia de manipulación genética, estos autores observaron que el silenciamiento de la transcripción del BDNF en los macrófagos cerebrales disminuyó el desempeño de los animales durante el aprendizaje motor y la generación de espinas dendríticas en la corteza cerebral y en el hipocampo que resulta del aprendizaje motor (Parkhurst et al., 2013). La misma estrategia fue llevada a cabo por Huang y colaboradores (2021) quienes investigaron el papel del BDNF proveniente de los macrófagos cerebrales en la hipersensibilidad producida

por una lesión en un nervio periférico. Estos autores observaron que el silenciamiento de la transcripción del BDN en los macrófagos cerebrales disminuyó la hiperalgesia y la generación de espinas dendríticas en la corteza somatosensorial inducidas por la ligación del nervio ciático (Huang et al., 2021). Por otro lado, con la finalidad de estudiar el papel de los receptores purinérgicos P2Y21R expresados en los macrófagos cerebrales sobre la neurogénesis inducida por las crisis convulsivas, Mo y colaboradores (2019), cruzaron a ratones que expresaban a la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen *Cx3cr1* ( $Cx3cr1^{Cre}$ ), con ratones que tenían floxeado el gen del receptor P2Y12R ( $P2Y12R^{flx/flx}$ ), con lo que obtuvieron una cepa de animales cuyos macrófagos cerebrales no expresaron al receptor P2Y12R ( $Cx3cr1^{Cre}:P2Y12R^{flx/flx}$ ). A través de esta manipulación genética, estos autores observaron que el silenciamiento de la transcripción de los receptores P2Y12R en los macrófagos cerebrales disminuyó la neurogénesis inducida por las crisis convulsivas (Mo et al., 2019). Asimismo, con el objetivo de investigar el papel de la señalización de las proteínas Gi de los macrófagos cerebrales sobre la excitabilidad neuronal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental, Merlini y colaboradores (2021), cruzaron a ratones que expresaban a la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen *Cx3cr1* ( $Cx3cr1^{Cre}$ ), con ratones que expresaron el gen de la subunidad S1 de la toxina pertussis (PTX, por sus siglas en inglés) bajo el control del gen *Rosa26* ( $Rosa26^{PTX/+}$ ), que se encuentra expresado de forma ubicua (Chu et al., 2016), con lo que obtuvieron una cepa de animales que expresaron a la subunidad S1 de la toxina pertussis en los macrófagos cerebrales ( $Cx3cr1^{Cre}:Rosa26^{PTX/+}$ ). Estos autores observaron que la oclusión de la vía de señalización de las proteínas Gi en los macrófagos cerebrales aumentó la excitabilidad y la sincronización neuronal de la corteza cerebral, así como la inducción de crisis convulsivas con pilocarpina (Merlini et al., 2021).

### **Depleción de los macrófagos cerebrales**

Otra estrategia experimental para estudiar el papel de los macrófagos cerebrales en la fisiología de los circuitos neuronales es la depleción farmacológica y genética de estas células (Chitu et al., 2016). La depleción farmacológica de los macrófagos

cerebrales se ha llevado a cabo principalmente mediante la administración sistémica del fármaco plexikon (PLX), que es un inhibidor del receptor del factor estimulador de colonias tipo 1 (CSF1R, por sus siglas en inglés; Elmore et al., 2014; Li et al., 2017; Lei et al., 2020). La activación tónica del receptor CSF1R ejerce una señalización de sobrevivencia en las células de linaje mieloide, incluyendo a la microglía y a los macrófagos no parenquimales (Chitu et al., 2016; Van Hove et al., 2019), por lo que su inhibición, a través de la administración de PLX por 21 días, resulta en la eliminación de hasta el 99 % de la población de estos macrófagos cerebrales (Elmore et al., 2014). La depleción de los macrófagos cerebrales a través de la administración de PLX es transitoria, pues la población de estas células se recupera después de 7 días de haber suspendido el tratamiento con PLX (Elmore et al., 2014), lo que también ha brindado la oportunidad de estudiar la capacidad proliferativa de estas células (Elmore et al., 2014; Barnett et al., 2021). Otra estrategia farmacológica comúnmente utilizada para eliminar a los macrófagos cerebrales es la administración intracerebral o intracerebroventricular de clodronato encapsulado en liposomas (van Rooijen & Hendriks, 2010; Drabek et al., 2012; Wang et al., 2018; Hall et al., 2022). El clodronato es un bifosfonato que no cruza las membranas celulares (van Rooijen & Hendriks, 2010; Wang et al., 2018). Por ello, su encapsulamiento en micelas compuestas de numerosas capas de fosfolípidos de aproximadamente 300 nm, llamados liposomas (van Rooijen & Hendriks, 2010), permite la incorporación del clodronato dentro de las células con capacidad fagocítica, como la microglía y los macrófagos no parenquimales (van Rooijen & Hendriks, 2010; Wang et al., 2018). El clodronato encapsulado, al ser fagocitado por los macrófagos cerebrales, es liberado al citoplasma en donde se acumula y es metabolizado en un análogo del ATP que es citotóxico (Lehenkari et al., 2022), produciendo la inhibición de la proteína transferasa ADP/ATP mitocondrial, lo que resulta en el colapso del potencial de la membrana interna de la mitocondria y en la inducción de muerte celular por apoptosis (van Rooijen & Hendriks, 2010; Wang et al., 2018; Lehenkari et al., 2022). Después de 2-5 días de su administración intracerebral o intracerebroventricular, se puede observar una disminución del ~50 % de la población de macrófagos cerebrales (Hall et al., 2022).



Posteriormente, los macrófagos cerebrales repueblan el tejido cerebral después de ~20 días de la administración de clodronato liposomal (Hall et al., 2022). Asimismo, otras estrategias experimentales han buscado eliminar a los macrófagos cerebrales a través de modificaciones genéticas (Chitu et al., 2016). El silenciamiento genético del gen *Csf1r*, que codifica al receptor CSF1R (Chitu et al., 2016), así como de los genes *Csf1* e *Il34*, que codifican a los agonistas del receptor CSF1R (Chitu et al., 2016), resulta en la disminución del 70-90 % de la población de macrófagos cerebrales (Chitu et al., 2016; Wu et al., 2020). La expresión genética de la toxina diftérica en los macrófagos cerebrales, a través de la recombinasa Cre inducible bajo el control del promotor del gen *Cx3cr1*, ha sido utilizada para eliminar a los macrófagos cerebrales (Parkhurst et al., 2013; Wu et al., 2020), resultando en la eliminación del ~90 % de la población de estas células (Parkhurst et al., 2013; Wu et al., 2020).

### **La optogenética.**

La optogenética consiste en la expresión selectiva de canales iónicos activados por luz, llamados rodopsinas, en la membrana celular de poblaciones celulares específicas, lo que permite controlar la despolarización o la hiperpolarización del potencial de membrana celular al ser activados, dependiendo del tipo de rodopsina expresado (Boyden et al., 2005; Deisseroth, 2011; 2015). Diversas investigaciones han explorado la manipulación de distintas poblaciones gliales mediante optogenética (Tanaka et al., 2012; Sawada, 2012; Pardo-Peña et al., 2018b; Laprell et al., 2021; Yi et al., 2021b), principalmente mediante la expresión de canales catiónicos inespecíficos, permeables a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , que se activan en respuesta a la aplicación de luz azul, llamados canalrodopsina 2 (ChR2, por sus siglas en inglés), induciendo la despolarización del potencial de membrana celular (Cho et al., 2016). En cuanto a la microglía, Tanaka y colaboradores (2012) fueron los primeros en mostrar la expresión estable de ChR2 en estas células *in vitro* y que la estimulación con luz azul induce una despolarización del potencial de membrana y la entrada de corrientes catiónicas a la célula. También, de forma independiente, Sawada (2012) demostró, en un artículo en japonés, que la estimulación de la ChR2

expresada en la microglía incrementó la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular, así como la síntesis de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y de la iNOS *in vitro*. Este efecto es similar a lo reportado en rebanadas de tallo cerebral de ratones que expresan la ChR2 de forma constitutiva en la microglía y los macrófagos no parenquimales, en donde se observó un aumento de la concentración extracelular de la especie reactiva de oxígeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en respuesta a la estimulación con luz azul (Pardo-Peña et al., 2018b). Recientemente, Laprell y colaboradores (2021) demostraron que la modulación optogenética de la microglía y de los macrófagos no parenquimales tuvo poco efecto sobre la motilidad basal de estas células, pero enlenteció la respuesta quimiotáctica microglial ante un daño tisular inducido con láser. También, recientemente se ha reportado que la activación optogenética de la microglía y de los macrófagos no parenquimales de la médula espinal resulta en cambios morfológicos en estas células, reflejado como una disminución del número de procesos microgliales, así como en el incremento de la actividad de las fibras neuronales sensitivas y en la disminución del umbral del dolor térmico y mecánico por varios días (Yi et al., 2021b). Estos autores encontraron que estos efectos fueron mediados por la liberación de IL1 $\beta$  por parte de la microglía y la activación del IL1R tipo 1 en las neuronas (Yi et al., 2021b). En conjunto, estas investigaciones indican que la modulación selectiva de los macrófagos cerebrales mediante optogenética, conlleva a un cambio fenotípico de estas células hacia un estado proinflamatorio.

### **La quimiogenética.**

Otra herramienta experimental para modular selectivamente poblaciones celulares es la quimiogenética, que consiste en la expresión de receptores diseñados para responder exclusivamente a fármacos diseñados (DREADDs, por sus siglas en inglés) (Urban & Roth, 2007; Ben-Shaanan et al., 2016; Dobrzanski & Kossut, 2017; Goutaudier et al., 2019). Los DREADDs son receptores muscarínicos excitatorios (hM3Dq) o inhibitorios (hM4Di) mutados para ser insensibles a la acetilcolina y, en su lugar, reconocer exclusivamente al fármaco sintético e inerte clozapina-N-óxido (CNO) (Urban & Roth, 2007; Ben-Shaanan et al., 2016; Dobrzanski & Kossut, 2017; Goutaudier et al., 2019). Los DREADDs mencionados permiten la manipulación

selectiva de las células a través de la señalización de proteínas Gq o Gi/o, respectivamente (Urban & Roth, 2007; Ben-Shaanan et al., 2016; Dobrzanski & Kossut, 2017; Goutaudier et al., 2019). Diversos estudios han reportado que dependiendo del DREADD expresado en los macrófagos cerebrales, es posible modular la activación de estas células, así como la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias (Grace et al., 2016; 2018; Binning et al., 2020; Saika et al., 2020; Coleman et al., 2020; Klawonn et al., 2021; Yi et al., 2021a; Saika et al., 2021). Grace y colaboradores (2016; 2018) fueron los primeros en expresar a los DREADDs hM3Dq y hM4Di en la microglía y los macrófagos no parenquimales. Estos autores observaron que la activación *in vitro* de los DREADDs hM3Dq, expresados en células microgliales tipo BV2, induce un incremento en la síntesis de citocinas proinflamatorias, como la IL1 $\beta$ , la IL6 y el TNF $\alpha$ , así como de óxido nítrico (Grace et al., 2018). Este efecto ha sido reproducido en investigaciones más recientes *in vivo* (Binning et al., 2020; Saika et al., 2021; Klawonn et al., 2021), en donde además se pudo observar que la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos cerebrales induce una disminución del umbral del dolor térmico y mecánico (Grace et al., 2018; Saika et al., 2021), en una forma dependiente la activación del IL1R tipo 1 (Grace et al., 2018). Asimismo, también se ha reportado que la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en los macrófagos cerebrales induce actividad fagocítica microglial *in vitro* (Binning et al., 2020). Estos resultados sugieren que la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía resulta en la activación proinflamatoria de estas células y que sus efectos son mediados a través de la síntesis y liberación de la IL1 $\beta$  y su acoplamiento con el receptor IL1R tipo 1 en las neuronas. Por otro lado, se ha observado que la activación *in vitro* de los DREADDs hM4Di evita la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias, como la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y el óxido nítrico, inducido por la aplicación de LPS o de la quimiocina CCL2 en células microgliales tipo BV2 (Grace et al., 2016; 2018), efecto que ha sido corroborado por investigaciones más recientes en cultivos organotípicos de hipocampo incubados con un agonista de los receptores TLR7 o con etanol (Coleman et al., 2020). Por otro lado, la activación *in vivo* de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía

y en macrófagos no parenquimales reduce el dolor neuropático y la respuesta inflamatoria en la médula espinal producida por la administración crónica de morfina (Grace et al., 2016; 2018), por la transección de un nervio espinal (Yi et al., 2021 a), por la ligación parcial del nervio ciático y por quimioterapia (Saika et al., 2020). Juntos, estos resultados indican que la activación de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales resulta en la inhibición de la activación proinflamatoria de estas células gliales.

## **Planteamiento del problema de investigación.**

Se ha reportado que el SAOS es altamente prevalente en pacientes con epilepsia (Malow et al., 2000; Manni et al., 2003; Vaughn & D’Cruz, 2003; Höllinger et al., 2006; Chihorek et al., 2007; Vendrame et al., 2014; Maurousset et al., 2017; McCarter et al., 2018; Söylemez et al., 2020). La presencia de ambas patologías agrava la condición clínica de estos pacientes, incrementando la frecuencia y la severidad de las crisis epilépticas, así como agravando los signos/síntomas asociados con el SAOS (Malow et al., 2000; Chihorek et al., 2007; Shaheen et al., 2012; Scharf et al., 2020). Adicionalmente, el uso de tratamientos enfocados en el SAOS, como la CPAP o las intervenciones quirúrgicas en las vías respiratorias superiores (como la tonsilectomía, la adenoidectomía y la uvuloplastía) e inferiores (como la traqueostomía), en pacientes con ambas patologías, ha demostrado disminuir la frecuencia y la severidad de las crisis epilépticas (Devinsky et al., 1994; Malow et al., 2000; Höllinger et al., 2006; Chihorek et al., 2007; Milano et al., 2009; Vendrame et al., 2014; Liu & Wang, 2017; Marousset et al., 2017; Somboon et al., 2019; Jaseja et al., 2020), sugiriendo que los efectos que induce el SAOS sobre la hiperexcitabilidad son reversibles tras el restablecimiento de la oxigenación “normal”. A pesar de los múltiples reportes clínicos que asocian a la epilepsia y al SAOS, aún no ha sido posible, primero, demostrar de forma experimental que la HIC, que es la principal consecuencia inmediata del SAOS (Dempsey et al., 2010; Labarca et al., 2019), favorezca la generación de hiperexcitabilidad neuronal y, segundo, esclarecer el mecanismo por el que el SAOS incrementa la excitabilidad cerebral y las crisis epilépticas. En este sentido, diversas evidencias clínicas y experimentales han resaltado a la neuroinflamación como un factor común en ambas patologías (Vezzani & Granata, 2005; Fabene et al., 2010; Smith et al., 2013; Gorter et al., 2015; Sapin et al., 2015; Alyu & Dikmen, 2016; Eyo et al., 2016; Khaspekov & Frumkina, 2017; Webster et al., 2017; Hiragi et al., 2018; Liu et al., 2020). La inducción experimental de HIC, así como en los modelos experimentales de hiperexcitabilidad y de epilepsia, resulta en un incremento de la expresión de moléculas proinflamatorias y de activación microglial (Vezzani et al., 1999; De Simoni et al., 2000; Ravizza et al., 2008; Row et al., 2003; Baronio et al., 2013;

Zhang et al., 2015; Liu et al., 2018; Gong et al., 2020). Por otro lado, las moléculas proinflamatorias derivadas de la microglía, incluidas la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$ , y la IL6, exacerbaban la excitabilidad neuronal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental (Vezzani et al., 1999; Zheng et al., 2010; Zhao et al., 2018). Sin embargo, el papel de la activación microglial en la excitabilidad neuronal y la inducción experimental de hiperexcitabilidad aún no es concluyente, debido, en gran medida, a la inespecificidad celular de las herramientas experimentales clásicamente usadas hasta el momento, como el LPS y la minociclina (Peña-Ortega, 2016; Möller et al., 2016). La aplicación de estrategias experimentales para modular de forma selectiva a los macrófagos cerebrales, como la optogenética y la quimiogenética, ha permitido evaluar el papel específico de estas células en distintos procesos fisiológicos y patológicos (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Laprell et al., 2021; Yi et al., 2021a; Grace et al., 2016; 2018; Binning et al., 2020; Saika et al., 2020; Coleman et al., 2020; Klawonn et al., 2021; Yi et al., 2021b; Saika et al., 2021). No obstante, estas estrategias experimentales no han sido utilizadas para evaluar el papel específico de la activación de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, o de la inhibición de su activación, en la excitabilidad neuronal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental. Por lo anterior, en esta tesis nos planteamos responder, primero, si la HIC modula la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP, así como la posible reversibilidad de sus efectos después de un periodo de reoxigenación (ReOx). Adicionalmente, nos propusimos investigar el rol específico de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental, utilizando al LPS para manipular a los macrófagos cerebrales de forma no selectiva y a la optogenética y a la quimiogenética para manipular de forma selectiva a estas células.

## **HIPÓTESIS**

1. La HIC exacerbará la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.
2. Los efectos inducidos por la HIC sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental serán revertidos después de un periodo de ReOx.
3. La manipulación de la microglía y de los macrófagos no parenquimales con optogenética y quimiogenética con el DREADD hM3Dq, pero no con LPS, exacerbará la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.
4. La manipulación quimiogenética de la microglía y de los macrófagos no parenquimales con el DREADD hM4Di disminuirá la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general.**

Determinar si la HIC, así como la manipulación no selectiva y selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, modulan la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.

### **Objetivos particulares.**

1. Determinar si la HIC modula la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.
2. Determinar si los efectos de la HIC sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental son reversibles después de un periodo de ReOx
3. Determinar si la manipulación no selectiva de la microglía con LPS modula la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.
4. Caracterizar la expresión de la ChR2 y de los DREADDs hM3Dq y hM4Di en las cepas de animales transgénicos utilizados para manipular de forma selectiva a la microglía y a los macrófagos no parenquimales con optogenética y quimiogenética, respectivamente.
5. Determinar si la manipulación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales con optogenética y quimiogenética modula la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales.

Para los experimentos con HIC, se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* (150-200 g de peso, 6-8 semanas) obtenidas del Bioterio del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Una vez comenzados los experimentos, los animales fueron almacenados en cajas de acrílico (4 ratas por caja) en la Unidad de Análisis Conductual del INB de la UNAM, en condiciones estándar de temperatura e iluminación (22-23 °C, ciclo de luz/oscuridad de 12 horas), con agua y comida *ad libitum*.

Para la administración intracerebroventricular de LPS o de IL1 $\beta$ , se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J (B6J; Stock No: 000664, The Jackson Laboratory, ME, Estados Unidos), obtenidos del Bioterio del INB de la UNAM.

La manipulación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales se llevó a cabo utilizando 4 cepas de ratones transgénicos generadas mediante cruce en la Unidad de Ratones Transgénicos del INB de la UNAM. Las cepas de animales utilizadas fueron las siguientes (figura 2): Cx3cr1/ChR2, Cx3cr1/hM3Dq, Cx3cr1/hM4Di y la cepa control Cx3cr1/Cre. Para la manipulación optogenética se utilizaron ratones transgénicos adultos (25 $\pm$ 2 g de peso, 3-6 meses de edad) de la cepa Cx3cr1/ChR2, los cuales expresan constitutivamente la proteína de fusión ChR2 y la proteína amarilla fluorescente aumentada (eYFP, por sus siglas en inglés). La generación de esta cepa se llevó a cabo mediante la cruce de ratones homocigotos de la cepa Cx3cr1<sup>Cre/Cre</sup> (B6J.B6N(Cg)-Cx3cr1<sup>tm1.1(cre)Jung/J</sup>; Stock No: 025524, The Jackson Laboratory), que expresan constitutivamente a la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen *Cx3cr1*, expresado en el cerebro exclusivamente en la microglía y en los macrófagos no parenquimales (Nishiyori et al., 1998; Shemer et al., 2018; Van Hove et al., 2019), con animales homocigotos que expresan la secuencia genética invertida de la proteína de fusión ChR2-eYFP (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm32<sup>(CAG-COP4\*H134R/EYFP)HZE/J</sup>; Stock No: 012569, The Jackson Laboratory), flanqueada por secuencias lox-P (figura 2A). Para la manipulación quimiogenética se utilizaron ratones transgénicos adultos

(25±2 g de peso, 3-6 meses de edad) de las cepas Cx3cr1/hM3Dq y Cx3cr1/hM4Di, que expresan constitutivamente el DREADD excitatorio hM3Dq y el DREADD inhibitorio hM4Di, respectivamente, además de la proteína fluorescente mCitrina en la microglía y los macrófagos no parenquimales. La generación de estas cepas se llevó a cabo mediante la cruce de animales homocigotos de la cepa Cx3cr1<sup>Cre/Cre</sup> (The Jackson Laboratory), con animales homocigotos que expresan la secuencia genética invertida de las proteínas de fusión hM3Dq-mCitrina (B6N.129-Tg<sup>(CAG-CHRM3\*, -mCitrine)1Ute/J</sup>; Stock No: 026219, The Jackson Laboratory) o hM4Di-mCitrina (B6N.129-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1(CAG-CHRM4\*, -mCitrine)Ute/J</sup>; Stock No: 026220, The Jackson Laboratory), ambas flanqueadas por secuencias lox-P (figuras 2B y 2C). Como grupo control, se utilizaron ratones transgénicos adultos (25 ± 2 g de peso, 3-6 meses de edad) heterocigotos de la cepa Cx3cr1/Cre, que no expresan la ChR2 ni los DREADDs hM3Dq o hM4Di. La generación de esta cepa se llevó a cabo a través de la cruce de animales homocigotos de la cepa Cx3cr1<sup>Cre/Cre</sup> (B6J.B6N(Cg)-Cx3cr1<sup>tm1.1(cre)Jung/J</sup>; Stock No: 025524, The Jackson Laboratory), con animales tipo salvaje (Cx3cr1<sup>+/+</sup>) de la cepa C57BL/6J (Bioterio del INB; figura 2D). Los animales transgénicos se mantuvieron alojados en la Unidad de Ratones Transgénicos del INB de la UNAM en condiciones estándar de temperatura e iluminación (22-23 °C, ciclo de luz/oscuridad de 12 horas) con agua y comida *ad libitum*.



Lox-P. C. Los animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di fueron generados a partir de la cruce de animales homocigotos de la cepa Cx3cr1<sup>Cre/Cre</sup> con animales homocigotos de la cepa B6N.129-Gt(ROSA)26Sortm1(CAG-CHRM4\*, -mCitrine)Ute/J (Rosa26<hM4Di-mCitrina>), que expresan la secuencia genética invertida de la proteína de fusión hM4Di-mCitrina flanqueada por secuencias Lox-P. D. Los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre fueron generados a partir de la cruce de animales homocigotos de la cepa Cx3cr1<sup>Cre/Cre</sup> con animales tipo salvaje (Cx3cr1<sup>+/+</sup>) de la cepa C57BL/6J.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura (SAGARPA NOM-062-ZOO-1999) y fueron aprobados por el Comité de Bioética del INB de la UNAM (protocolo No. 50 con el título “Generación de patrones de actividad rítmica de los circuitos neuronales y sus alteraciones en condiciones patológicas”).

### **Experimentos *in vitro* con rebanadas de hipocampo de animales sometidos a hipoxia intermitente crónica (HIC).**

#### **Protocolo de HIC *in vivo*.**

El protocolo utilizado para inducir la HIC se llevó a cabo como se reportó previamente por Moraes y Machado (2015), pero con ligeras modificaciones (figura 3) (Villasana-Salazar et al., 2020; Hernández-Soto et al., 2021). Brevemente, los animales fueron introducidos con sus cajas de acrílico (4 animales por caja) dentro de una cámara plexiglas (76cm x 51 cm x 51 cm), equipada con inyectores de gas y sensores de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, humedad y temperatura (BioSpherix, NY, Estados Unidos) (figura 3A). La cámara recibió inyecciones intermitentes de N<sub>2</sub> durante 5 minutos para inducir periodos de hipoxia de 40-50 segundos (5-7% de O<sub>2</sub> inspirado) (figura 3B). Después de cada episodio de hipoxia, se inyectó O<sub>2</sub> por 5 minutos para regresar a condiciones de normoxia (21-22% de O<sub>2</sub> inspirado) (Moraes y Machado, 2015; Villasana-Salazar et al., 2020; Hernández-Soto et al., 2021). Los inyectores de gas fueron controlados con un sistema OxyCycler (A42OC, BioSpherix). El protocolo se llevó a cabo diariamente por 8 horas durante la fase de luz (de 10:00 h

a 18:00 h), durante 21 días. Este periodo de HIC se seleccionó debido a que se ha reportado que 21 días de HIC son suficientes para inducir cambios en la excitabilidad neuronal y en la neuroinflamación hipocampal, así como en la activación microglial (Sapin et al., 2015; Dong et al., 2018; Khuu et al., 2019; Gong et al., 2020). Para investigar la reversibilidad de los efectos de la HIC, un grupo independiente de animales fue sujeto al protocolo de HIC por 21 días, seguido de un periodo de 30 días de ReOx, en donde los animales permanecieron en condiciones de normoxia (21-22 % de O<sub>2</sub> inspirado), respirando el aire de la Unidad de Análisis Conductual del INB de la UNAM.

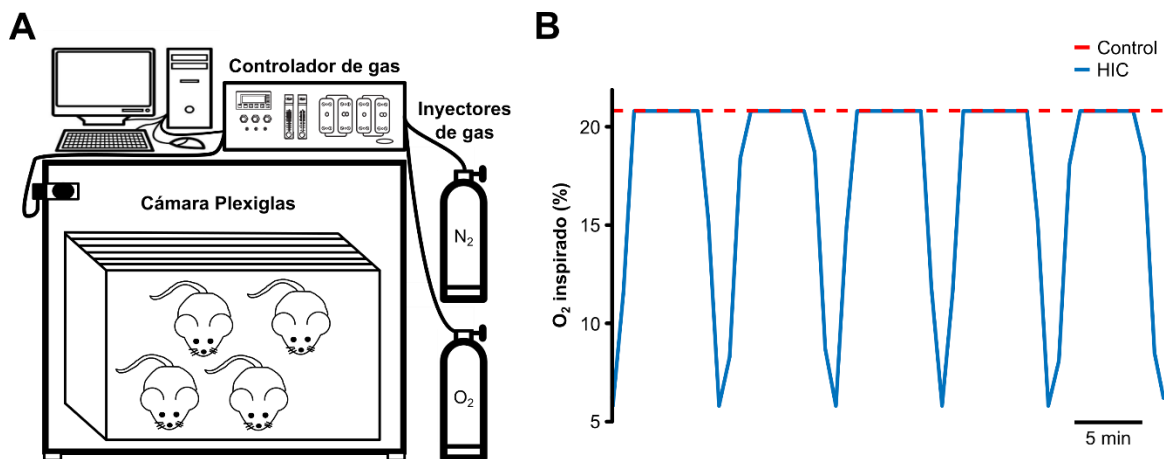


Figura 3. Protocolo de hipoxia intermitente crónica (HIC). A. Esquema del equipamiento requerido para aplicar la HIC dentro de la cámara Plexiglas. La cámara para la condición control de normoxia no se incluyó. Los animales fueron introducidos en las cámaras plexiglas, en donde recibieron HIC o normoxia durante 8 horas al día por 21 días. B. Trazos representativos de los niveles de O<sub>2</sub> inspirado durante la aplicación de los protocolos de HIC (trazo azul) o de normoxia (Control; línea roja punteada). Nótese que la hipoxia intermitente consistió en la inyección intermitente de N<sub>2</sub> por 5 minutos, para inducir episodios de hipoxia de 40-50 segundos (7 % de O<sub>2</sub> inspirado). Después de cada episodio de hipoxia, se inyectó O<sub>2</sub> durante 5 minutos para regresar a condiciones de normoxia (21-22 % de O<sub>2</sub> inspirado). Los niveles de N<sub>2</sub> y de O<sub>2</sub> dentro de las cámaras fueron modulados utilizando un controlador de gas y monitoreados a través de una computadora.

Cada grupo de animales que fue sometido al protocolo de HIC fue pareado con su respectivo grupo de animales control, los cuales fueron introducidos diariamente a una cámara plexiglas (BioSpherix) en condiciones de normoxia (21-22 % de O<sub>2</sub> inspirado; figura 1) por 8 horas (de 10:00 h a 18:00 h), durante 21 días.

Adicionalmente, se monitoreó el peso de los animales y su sobrevivencia al inicio y al final del protocolo de HIC.

### **Extracción de rebanadas de hipocampo.**

Una vez terminado el protocolo de HIC o después de 30 días de ReOx, se obtuvieron rebanadas de hipocampo como se describió previamente (Peña y Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019). Brevemente, los animales fueron eutanizados con una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.; PiSa, México) y perfundidos transcárdicamente con una solución protectora fría de sacarosa (composición: 238 mM de Sacarosa, 3 mM de KCl, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 25 mM de NaHCO<sub>3</sub> y 30 mM de D-glucosa; con pH de 7.4), burbujeado con carbógeno (95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>). Posteriormente, los cerebros fueron removidos y disectados en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa; composición: 119 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1.5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM de NaHCO<sub>3</sub> y 30 mM de D-glucosa; con pH de 7.4), burbujeado con carbógeno. Ambos hemisferios fueron montados en un bloque de agar con 30° de inclinación. Utilizando un vibratomo (Microm HM 650 V, Thermo Scientific, IL, Estados Unidos), se extrajeron rebanadas sagitales (400 µm de grosor) que contenían al hipocampo ventral y la corteza entorrinal. Esta preparación preserva las conexiones de la vía trisináptica, permitiendo la generación y el sostenimiento de la hiperexcitabilidad neuronal reverberante entre la corteza entorrinal y el hipocampo (Perrault y Avoli, 1991; Barbaroise y Avoli, 1997; Panuccio et al., 2010). Las rebanadas fueron colocadas en LCRa a temperatura ambiente y se permitió su recuperación por al menos 60 minutos antes de cualquier manipulación experimental.

### **Registro electrofisiológico de la actividad hipocampal e inducción de hiperexcitabilidad con 4-aminopiridina (4-AP) *in vitro*.**

Las rebanadas de hipocampo fueron transferidas a una cámara sumergida de registro con perfusión continua con LCRa (15-17 ml/min) burbujeado con carbógeno y mantenido a 30-32 °C. Utilizando electrodos de borosilicato (<1 MΩ de resistencia) llenados con LCRa, se registró la actividad de la capa piramidal de la región CA1 del hipocampo por 20-30 minutos. Posteriormente, se aplicó 4-AP (100 µM; Sigma-

Aldrich Inc., MO, Estados Unidos) en la solución de registro y se observaron sus efectos sobre la actividad hipocampal durante 60 minutos. Finalmente, se añadió lidocaína (1 mM; Sigma-Aldrich Inc.) en la solución de registro para verificar la viabilidad de las rebanadas y la naturaleza sináptica de la actividad registrada (Peña y Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019; Villasana-Salazar et al., 2020). La lidocaína es un fármaco anestésico que bloquea a los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Mitchel & Plant, 1988; Josephson, 1988; Raley-Susman et al., 2001; Cummins, 2007; Yang et al., 2020). También, la lidocaína bloquea a los canales de K<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (Josephson, 1988). Estudios *in vitro* en cardiomiocitos han mostrado que la lidocaína bloquea a los canales Na<sup>+</sup>, de K<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje, en concentraciones similares (10 µM – 1 mM), sugiriendo que la lidocaína es un bloqueador inespecífico de estos canales dependientes de voltaje (Josephson, 1998). A su vez, la aplicación *in vitro* de lidocaína en altas concentraciones (100 µM - 3 mM) disminuye las corrientes intracelulares inducidas por la administración de NMDA y de GABA en ovocitos que expresan a los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y a los receptores GABA<sub>A</sub>, respectivamente (Mitchel et al., 1988; Hahnekamp et al., 2006; Yang et al., 2020). Por lo anterior, la administración de lidocaína en el tejido nervioso resulta en la inhibición del potencial de acción, de la liberación de neurotransmisor y, por consiguiente, de la transmisión sináptica y de la excitabilidad neuronal (Wagman et al., 1968; Schurr et al., 1986; Tabatabai et al., 1990; Raley-Susman et al., 2001; Fujii et al., 2012). En este sentido, la lidocaína es utilizada para verificar la viabilidad del tejido nervioso y la naturaleza sináptica de su actividad, pues si su administración disminuye la excitabilidad neuronal sugiere, de forma indirecta, que las neuronas del circuito registrado se encuentran activas (Adaya-Villanueva et al., 2010; Alvarado-Martínez et al., 2013; Alcantara-Gonzalez et al., 2019; Villasana-Salazar et al., 2020).

La señal registrada fue amplificada (7P511L, Grass Instruments Co., MA, Estados Unidos), filtrada (0.3 Hz - 0.3 kHz), digitalizada a 2 kHz (Interfaz TL-2, Axon Instruments Inc., CA, Estados Unidos) y almacenada en una computadora personal para su análisis posterior.

## **Experimentos con animales anestesiados.**

### **Cirugía estereotáxica y registros electrofisiológicos de la actividad hipocampal en animales anestesiados.**

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de uretano (1.5 g/kg; Sigma-Aldrich Inc.) y colocados en un aparato esterotáxico para ratón (Stoelting Co., IL, Estados Unidos). Para registrar la actividad electrofisiológica del hipocampo se implantó un electrodo bipolar de acero inoxidable (100  $\mu\text{m}$  de diámetro; 1-1.2 M $\Omega$  de resistencia) en el hipocampo dorsal izquierdo (AP: -2.8 mm; ML: -2.5 mm; DV: -2.1 mm) y un tornillo de forma epidural sobre el cerebelo (AP: -6.0 mm; ML: 0.0 mm) para aterrizar eléctricamente la preparación, de acuerdo con el atlas estereotáxico de Franklin y Paxinos (2007). La señal electrofisiológica del hipocampo fue amplificada (7P511L, Grass Instruments Co.), filtrada (0.3 Hz - 0.3 kHz) y digitalizada a una frecuencia de 1 kHz (MiniDigi 1B, Molecular Devices, CA, Estados Unidos), utilizando el programa AxoScope (versión 10.7, Molecular Devices), así como almacenada en una computadora personal para su análisis posterior. Debido a la actividad de las células inmunes está regulada por el ciclo circadiano (Keller et al., 2009; Cuesta et al., 2016; Pourcet & Duez, 2020), todos los experimentos con animales anestesiados fueron llevados a cabo en un horario fijo de 9:00 h a 14:00 h.

Para la manipulación optogenética en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2, se implantó una fibra óptica (5 mm de largo y 200  $\mu\text{m}$  de diámetro; Thorlabs Inc., NJ, Estados Unidos) en el hipocampo dorsal derecho (AP: -2.8 mm; ML: +2.5 mm; DV: -2.0 mm), de acuerdo con el atlas estereotáxico de Franklin y Paxinos (2007).

Para la manipulación quimiogénica de la microglía, se implantó un microinyector en el ventrículo lateral derecho (AP: -0.5 mm; ML: +1.2 mm; DV: -2.0 mm), de acuerdo con el atlas estereotáxico de Franklin y Paxinos (2007). El microinyector se fabricó con una aguja dental (450  $\mu\text{m}$  de diámetro, Monoject, COVIDIEN, MA, Estados Unidos), conectada a una jeringa de microinyección (25  $\mu\text{l}$ , Hamilton Company, MA, Estados Unidos), a través de una manguera de plástico.



### **Registro electrofisiológico de la actividad hipocampal e inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP y pentilinetetrazol (PTZ) en animales anestesiados.**

Después de 20 minutos de registro de la actividad electrofisiológica basal, se indujo hiperexcitabilidad neuronal mediante la administración intraperitoneal de 4-AP (20 mg/kg; Sigma-Aldrich Inc.) o de PTZ (200 mg/kg; Sigma-Aldrich Inc.) y se observaron sus efectos durante 40 minutos. En condiciones sin anestesia, las dosis de 4-AP y de PTZ comúnmente utilizadas para inducir actividad epileptiforme se encuentran en el rango de 3-7 mg/kg y 40-120 mg/kg, respectivamente (Mihály et al., 1990; Velisek et al., 1992; 2006). Sin embargo, debido a que la anestesia inducida con uretano inhibe la generación de actividad epileptiforme (Cain et al., 1989; Piña-Crespo & Daló, 1992; Heltovics et al., 1995), se estandarizaron las dosis de 4-AP y de PTZ en 20 mg/kg y 200 mg/kg, respectivamente, con la finalidad de poder inducir actividad epileptiforme hipocampal. Al finalizar los experimentos, los animales fueron eutanizados con una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.; Pisabental, PiSA, México). La respiración fue monitoreada durante los experimentos con un dispositivo piezoeléctrico colocado en el tórax de los animales, para verificar la profundidad de la anestesia (~2-3 respiraciones por segundo).

### **Administración intracerebroventricular de lipopolisacárido (LPS) y de interleucina 1 beta (IL1 $\beta$ ) en animales anestesiados.**

En animales anestesiados de la cepa C57BL/6J, se administró LPS (200  $\mu$ g disueltos en 10  $\mu$ l de solución de buffer de fosfatos; PBS, por sus siglas en inglés; 0.1 M, pH 7.4; Sigma-Aldrich Inc.) o IL1 $\beta$  recombinante de ratón (100 ng disueltos en 2  $\mu$ l de PBS, 0.1 M, pH 7.4; ARP Inc., MA, Estados Unidos), a través del microinyector implantado estereotáxicamente en el ventrículo lateral derecho, utilizando una bomba de infusión (Fusion 200, Chemyx Inc.) con una velocidad constante de 0.5  $\mu$ l por minuto. Ambos fármacos se administraron 10-20 minutos antes o después de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y 10-20 minutos antes de la administración de PTZ (200 mg/kg, i.p.). Los animales control fueron administrados de forma intracerebroventricular con vehículo (PBS).

### **Manipulación optogenética en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2.**

La manipulación optogenética en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 se llevó a cabo a través de la fibra óptica implantada en el hipocampo dorsal derecho (figura 2A). La fibra óptica fue conectada a un LED de luz azul (~470 nm de longitud de onda, modelo M470F1, Thorlabs, Inc.), acoplado a una fuente de poder de alta potencia con modulación de pulsos (DC2100, Thorlabs, Inc.). Con el fin de establecer la duración de la estimulación optogenética requerida para provocar cambios en la actividad electrofisiológica, se realizó una curva de estimulación en donde se aplicaron pulsos de luz azul continua con diferentes duraciones (1, 5, 10 y 20 minutos; ~0.03 mW/mm<sup>2</sup> de intensidad; n = 6) y se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal por 20 minutos (Anexo 1). Estos experimentos mostraron que 20 minutos de estimulación optogenética provocan cambios sustanciales en la actividad electrofisiológica hipocampal (Anexo 1), similar a trabajos previos de nuestro grupo de trabajo (Rojas-García, 2018; Lorea-Hernández, 2020). Con ello, se aplicó un pulso de luz continua en el hipocampo con duración de 20 minutos (~0.03 mW/mm<sup>2</sup> de intensidad), 15-20 minutos antes o después de la administración intraperitoneal de 4-AP (20 mg/kg). Los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre también recibieron 20 minutos de estimulación continua con luz azul, 15-20 minutos antes o después de la administración intraperitoneal de 4-AP (20 mg/kg).

### **Manipulación optogenética en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 y registro electrofisiológico de la actividad multiunitaria hipocampal con un arreglo de multielectrodos.**

Animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 fueron anestesiados con uretano (1.5 g/kg, i.p.; Sigma-Aldrich Inc.) y colocados en un aparato esterotáxico para ratón (Stoelting Co.). Mediante coordenadas estereotáxicas, en el HPC dorsal derecho se implantó una fibra óptica (AP: -3.4 mm; ML: -2.5 mm; DV: -2.0 mm; 5 mm de largo y 200 µm de diámetro; Thorlabs, Inc.) y una *silicon probe* con un arreglo lineal de 16 microelectrodos (AP: -2.8 mm; ML: +2.5 mm; DV: -2.0 mm; 5 mm de largo y 15 µm

de diámetro; NeuroNexus, MI, Estados Unidos), con una separación entre electrodos de 50  $\mu\text{m}$ . La fibra óptica se implantó con un ángulo de 30° de inclinación, con el fin de iluminar el tejido registrado por el arreglo de multielectrodos. Adicionalmente, se colocaron dos tornillos de acero inoxidable sobre el cerebelo (AP: -6.0 mm, ML:  $\pm 1.0$  mm; Franklin & Paxinos, 2007), que sirvieron como tierra y referencia, respectivamente. La fibra óptica fue conectada a un LED de luz azul (~470 nm de longitud de onda; modelo M470F1, Thorlabs, Inc.) o roja (~625 nm de longitud de onda; modelo M625F2, Thorlabs, Inc.), acoplado a una fuente de poder de alta potencia con modulación de pulsos (DC2100, Thorlabs, Inc.) y a un estimulador S88 (Grass Instruments Co.), para modular la duración, la frecuencia y la intensidad de los pulsos de luz. Se registró la actividad hipocampal de los 16 sitios de registro durante la estimulación con un pulso de luz azul o roja (10 s de duración, 2 min de intervalo interestímulo, 0.03  $\text{mW}/\text{mm}^2$  de intensidad). Adicionalmente, se estimuló con trenes de 4 Hz (10 ms de duración del pulso, 2 min de intervalo interestímulo, ~0.03  $\text{mW}/\text{mm}^2$  de intensidad). Las señales fueron preamplificadas y digitalizadas a una frecuencia de 40 kHz utilizando el sistema Omniplex (Plexon, TX, Estados Unidos) y almacenadas en una computadora personal para su análisis posterior. Al finalizar los experimentos, los animales fueron eutanizados con una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p., Pisabental).

### **Manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en animales anestesiados.**

La manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales se llevó a cabo a través de la administración intracerebroventricular de CNO, agonista exclusivo de los DREADDs (Urban & Roth, 2007; Ben-Shaanan et al., 2016; Dobrzanski & Kossut, 2017; Goutaudier et al., 2019), en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/hM3Dq y Cx3cr1/hM4Di. En animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, se realizó una curva de estimulación con diferentes dosis de CNO (10 ng, 100 ng, 1  $\mu\text{g}$  y 10  $\mu\text{g}$  de CNO, disueltos en 5  $\mu\text{l}$  de PBS, 0.1 M, pH 7.4; Tocris Bioscience, MN, Estados Unidos), en diferentes animales y, posteriormente, se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica del

hipocampo por 30-40 minutos, con el fin de establecer la dosis óptima de CNO para provocar cambios en la actividad electrofisiológica hipocampal (n = 6; Anexo 4). Una vez establecida la dosis de CNO (10 µg disueltos en 5 µl de PBS), se administró CNO de forma intracerebroventricular 10-15 minutos antes o 15-20 minutos después de la administración de 4-AP (20 mg/kg) y 10-15 minutos antes de la administración de PTZ (200 mg/kg), utilizando una bomba de infusión (Fusion 200, Chemyx Inc., TX, Estados Unidos) con una velocidad constante de 0.5 µl por minuto. Los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre fueron administrados con CNO (10 µg disueltos en 5 µl de PBS) de forma intracerebroventricular 10-15 minutos antes o 15-20 minutos después de la administración de 4-AP (20 mg/kg) y 10-15 minutos antes de la administración de PTZ (200 mg/kg).

**Coadministración intracerebroventricular de la proteína antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL1Ra) y de clozapina-N-óxido (CNO) en animales anestesiados.**

En animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, se coadministró la proteína IL1Ra (5 µg disueltos en 5 µl de PBS, 0.1 M, pH 7.4; rHuIL-1ra, Prospec-Tany Technogene, Ness-Ziona, Israel) de forma intracerebroventricular junto con CNO (10 µg disueltos en 5µl de PBS; Tocris Bioscience), utilizando una bomba de infusión con una velocidad constante de 0.5 µl por minuto (Fusion 200, Chemyx Inc.) y se observaron sus efectos durante 30-40 minutos. La administración intracerebroventricular de la combinación de la proteína IL1Ra y de CNO se realizó 20 minutos antes o después de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y 20 minutos antes de la administración de PTZ (200 mg/kg, i.p.). Los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre fueron administrados de forma intracerebroventricular con la combinación de la proteína IL1Ra (5 µg disueltos en 5 µl de PBS) y de CNO (10 µg disueltos en 5 µl de PBS) 20 minutos antes o después de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y 20 minutos antes de la administración de PTZ (200 mg/kg, i.p.).

## **Grupos experimentales.**

### **Experimentos *in vitro* con rebanadas de hipocampo.**

#### ***Efecto de la HIC sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP in vitro.***

- Grupo Control (n = 14 rebanadas de 5 animales): Rebanadas de hipocampo de animales introducidos diariamente a una cámara plexiglas en condiciones de normoxia (21-22 % de O<sub>2</sub> inspirado) por 8 horas, durante 21 días.
- Grupo HIC (n = 18 rebanadas de 8 animales): Rebanadas de hipocampo de animales introducidos diariamente a una cámara plexiglas en donde fueron sujetos a periodos de hipoxia de 40-50 segundos ( 5-7 % de O<sub>2</sub> inspirado) alternados con periodos de normoxia (21-22 % de O<sub>2</sub> inspirado) por 8 horas, durante 21 días.

#### ***Efecto de la reoxigenación (ReOx) sobre la modulación producida por la HIC en la excitabilidad hipocampal y en la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP in vitro.***

- Grupo Control+ReOx (n = 11 rebanadas de 3 animales): Rebanadas de hipocampo de animales introducidos diariamente a una cámara plexiglas en condiciones de normoxia (21-22 % de O<sub>2</sub> inspirado) por 8 horas, durante 21 días, seguido de un periodo de ReOx de 30 días, en donde los animales permanecieron en condiciones de normoxia (21-22 % de O<sub>2</sub> inspirado).
- Grupo HIC+ReOx (n = 13 rebanadas de 4 animales): Rebanadas de hipocampo de animales introducidos diariamente a una cámara plexiglas en donde fueron sujetos a periodos de hipoxia de 40-50 segundos ( 5-7 % de O<sub>2</sub> inspirado) alternados con periodos de normoxia (21-22 % de O<sub>2</sub> inspirado) por 8 horas, durante 21 días, seguido de un periodo de ReOx de 30 días, en donde los animales permanecieron en condiciones de normoxia (21-22 % de O<sub>2</sub> inspirado).

## Experimentos con animales anestesiados.

### ***Manipulación farmacológica de la microglía con LPS en animales anestesiados.***

*Efecto de la manipulación farmacológica de la microglía con LPS sobre la excitabilidad hipocampal en animales anestesiados.*

- Grupo vehículo (n = 6 animales): Animales anestesiados que recibieron una inyección intracerebroventricular de vehículo (PBS) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo LPS (n = 12 animales): Animales anestesiados que recibieron una inyección intracerebroventricular de LPS (200 µg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación farmacológica de la microglía con LPS sobre la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en animales anestesiados.*

- Grupo vehículo (n = 6 animales): Animales anestesiados que recibieron una inyección intracerebroventricular de vehículo (PBS) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo LPS (n = 6 animales): Animales anestesiados que recibieron una inyección intracerebroventricular de LPS (200 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación farmacológica de la microglía con LPS sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP en animales anestesiados.*

- Grupo vehículo (n = 6 animales): Animales anestesiados que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron una inyección intracerebroventricular de

vehículo (PBS) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

- Grupo LPS (n = 6 animales): Animales anestesiados que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron una inyección intracerebroventricular de LPS (200 µg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

### ***Manipulación optogenética en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2.***

*Efecto de la manipulación optogenética sobre la excitabilidad hipocampal en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 7 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron estimulación optogenética en el hipocampo durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/ChR2 (n = 7 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 que recibieron estimulación optogenética en el hipocampo durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación optogenética sobre la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 7 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron estimulación optogenética en el hipocampo y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/ChR2 (n = 7 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 que recibieron estimulación optogenética en el hipocampo y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación optogenética sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron estimulación optogenética en el hipocampo durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/ChR2 (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron estimulación optogenética en el hipocampo durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación optogenética sobre la densidad y morfología de la microglía hipocampal en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 9 muestras de 3 animales): Muestras histológicas de animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron estimulación optogenética en el hipocampo.
- Grupo Cx3cr1/ChR2 (n = 9 muestras de 3 animales): Muestras histológicas de animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 que recibieron estimulación optogenética en el hipocampo.

*Efecto de la manipulación optogenética sobre la actividad multiunitaria hipocampal en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2.*

- Grupo Estimulación con luz roja (n = 3 ensayos de 3 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 que recibieron estimulación optogenética con luz roja en el hipocampo durante el registro electrofisiológico de la actividad multiunitaria hipocampal.



- Grupo Estimulación con luz azul (n = 12 ensayos de 3 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 que recibieron estimulación optogenética con luz azul en el hipocampo durante el registro de la actividad multiunitaria hipocampal.

***Manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.***

*Efecto de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/hM3Dq (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 12 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/hM3Dq (n = 7 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la hiperexcitabilidad inducida con PTZ en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 12 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con PTZ (200 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/hM3Dq (n = 7 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con PTZ (200 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/hM3Dq (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la densidad y morfología de la microglía hipocampal en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 6 muestras de 3 animales): Muestras histológicas de animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ ).
- Grupo Cx3cr1/hM3Dq (n = 6 muestras de 3 animales): Muestras histológicas de animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ ).

*Efecto de la proteína IL1Ra sobre la modulación de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en la excitabilidad hipocampal en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron una inyección intracerebroventricular de la combinación de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/hM3Dq (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq que recibieron una inyección intracerebroventricular de la combinación de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la proteína IL1Ra sobre la modulación de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron una inyección intracerebroventricular de la combinación de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

- Grupo Cx3cr1/hM3Dq (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq que recibieron una inyección intracerebroventricular de la combinación de la proteína IL1Ra (5 µg) y de CNO (10 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la proteína IL1Ra sobre la modulación de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en la hiperexcitabilidad inducida con PTZ en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron una inyección intracerebroventricular de la combinación de la proteína IL1Ra (5 µg) y de CNO (10 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con PTZ (200 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/hM3Dq (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq que recibieron una inyección intracerebroventricular de la combinación de la proteína IL1Ra (5 µg) y de CNO (10 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con PTZ (200 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la proteína IL1Ra sobre la modulación de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron una inyección intracerebroventricular de la combinación de la proteína IL1Ra (5 µg) y

de CNO (10  $\mu$ g) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

- Grupo Cx3cr1/hM3Dq (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron una inyección intracerebroventricular de la combinación de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la IL1 $\beta$  sobre la excitabilidad hipocampal en animales anestesiados.*

- Grupo vehículo (n = 6 animales): Animales anestesiados que recibieron una inyección intracerebroventricular de vehículo (PBS) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo IL1 $\beta$  (n = 6 animales): Animales anestesiados que recibieron una inyección intracerebroventricular de IL1 $\beta$  (100 ng) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la IL1 $\beta$  sobre la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en animales anestesiados.*

- Grupo vehículo (n = 6 animales): Animales anestesiados que recibieron una inyección intracerebroventricular de vehículo (PBS) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo IL1 $\beta$  (n = 6 animales): Animales anestesiados que recibieron una inyección intracerebroventricular de IL1 $\beta$  (100 ng) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la IL1 $\beta$  sobre la hiperexcitabilidad inducida con PTZ en animales anestesiados.*

- Grupo vehículo (n = 6 animales): Animales anestesiados que recibieron una inyección intracerebroventricular de vehículo (PBS) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con PTZ (200 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo IL1 $\beta$  (n = 6 animales): Animales anestesiados que recibieron una inyección intracerebroventricular de IL1 $\beta$  (100 ng) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con PTZ (200 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la IL1 $\beta$  sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.*

- Grupo vehículo (n = 6 animales): Animales anestesiados que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron una inyección intracerebroventricular de vehículo (PBS) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo IL1 $\beta$  (n = 6 animales): Animales anestesiados que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron una inyección intracerebroventricular de IL1 $\beta$  (100 ng) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

***Manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di.***

*Efecto de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

- Grupo Cx3cr1/hM4Di (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 12 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/hM4Di (n = 7 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la hiperexcitabilidad inducida con PTZ en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 12 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con PTZ (200 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/hM4Di (n = 7 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) y que, posteriormente, fueron administrados de forma intraperitoneal con PTZ (200 mg/kg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.
- Grupo Cx3cr1/hM4Di (n = 6 animales): Animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di que fueron administrados de forma intraperitoneal con 4-AP (20 mg/kg) y que, posteriormente, recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg) durante el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal.

*Efecto de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la densidad y morfología de la microglía hipocampal en animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di.*

- Grupo Cx3cr1/Cre (n = 7 muestras de 3 animales): Muestras histológicas de animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg).
- Grupo Cx3cr1/hM4Di (n = 7 muestras de 3 animales): Muestras histológicas de animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di que recibieron una inyección intracerebroventricular de CNO (10 µg).

### **Perfusión y obtención de muestras para análisis histológico.**

Para la corroboración histológica de los sitios de registro, de fotoestimulación y de microinyección, los animales fueron perfundidos transcardiacamente con PBS (20 ml, 0.1 M, pH 7.4) y con paraformaldehído (20 ml, PFA al 4% diluido en PBS, 0.1 M, pH 7.4; Sigma-Aldrich Inc.). Los cerebros fueron removidos y almacenados por al menos 24 horas en PFA a 4 °C. Posteriormente, los cerebros fueron sumergidos en una solución de sacarosa (30 %, Sigma-Aldrich Inc.) durante 24 horas. Utilizando un vibratomo (Leica CM1850, Wetzlar, Alemania), se obtuvieron rebanadas



coronales de 30-60  $\mu\text{m}$  de espesor de los sitios en donde las trayectorias del electrodo y del microinyector fueran visibles. Las rebanadas extraídas fueron simultáneamente procesadas para la tinción de Nissl y para la inmunofluorescencia.

### Tinción de Nissl.

La tinción de Nissl se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Kreutzberg (1984). Brevemente, las rebanadas fueron montadas en portaobjetos y deshidratadas con alcohol a varias diluciones (95, 70 y 50 %, en  $\text{dH}_2\text{O}$ ). Después, las rebanadas fueron teñidas con una solución de violeta de cresilo acetato, compuesta por ácido acético, acetato sódico y violeta de cresilo al 0.1 %, y posteriormente sumergidas en alcohol a varias diluciones (50, 70 y 95 %, en agua destilada) y en xileno (Sigma-Aldrich Inc.). Finalmente, las rebanadas fueron cubiertas con cubreobjetos utilizando un medio de montaje (DPX, Sigma-Aldrich Inc.), para posteriormente dejarles secar por una noche a temperatura ambiente. Las muestras fueron colocadas en un microscopio de luz (Carl Zeiss Inc., NY, Estados Unidos), con un objetivo de 4x, en donde se observaron los sitios de registro, de fotoestimulación y de microinyección (figura 4).

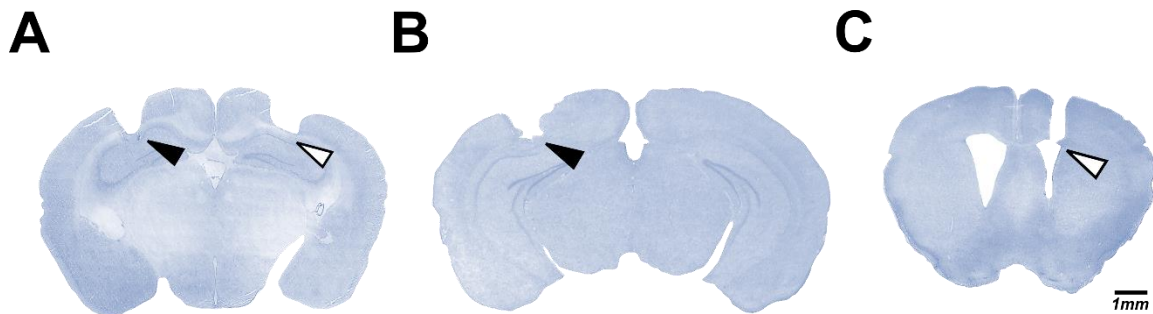


Figura 4. Verificación histológica de los sitios de registro, de fotoestimulación y de microinyección en tejidos teñidos con la técnica de Nissl. Fotomicrografías de tejidos cerebrales teñidos con la técnica de Nissl, en donde se muestran los sitios de registro (flechas negras, A y B), de fotoestimulación (flecha blanca, A) y de microinyección (flecha blanca, C). Nótese que los sitios de registro y de fotoestimulación se ubicaron entre el *stratum oriens* y el *stratum pyramidale* del área CA1 del hipocampo dorsal, mientras que el sitio de microinyección se ubicó en el ventrículo lateral.

## **Inmunofluorescencia.**

Para la inmunofluorescencia, las rebanadas fueron incubadas en una solución bloqueadora (0.1% de Triton X-100 y 10% de suero de burro en PBS 0.1 M) e incubadas durante la noche con el anticuerpo primario de conejo anti-Iba1 (1:1000; Wako Pure Chemical Co., VA, Estados Unidos), como un marcador de células microgliales (Ito et al., 1998; Lorea-Hernández et al., 2016), que también está presente en macrófagos no parenquimales (Utz & Greter, 2019), o con el anticuerpo primario de ratón anti-ChR2 (1:000; American Research Products, Inc., MA, Estados Unidos). Después de varios lavados, las rebanadas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 568, anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 568; Thermo Fisher Scientific, IL, Estados Unidos) y posteriormente con DAPI (Thermo Fisher Scientific), como marcador nuclear (Kapusinski, 1995). Posteriormente, las rebanadas fueron montadas en portaobjetos y cubiertas con cubreobjetos utilizando un medio de montaje (DPX, Sigma-Aldrich Inc.), para después dejarlas secar por una noche a temperatura ambiente. Las imágenes fueron capturadas usando un microscopio de fluorescencia (Axio Observer A1, Carl Zeiss Inc.), con un objetivo de 40x. Para la corroboración de la colocalización de las proteínas de fusión hM3Dq-mCitrina y hM4Di-mCitrina con la fluorescencia del anticuerpo anti-Iba1, las muestras histológicas fueron visualizadas utilizando un microscopio confocal (LSM 780, Carl Zeiss Inc.). Para ello, se adquirió un bloque de 10-12 imágenes con diferentes planos focales, separados por 0.5  $\mu\text{m}$  de distancia, tomando como referencia el soma de una célula positiva a Iba1. Debido a que la actividad de las células inmunes está regulada por el ciclo circadiano (Keller et al., 2009; Cuesta et al., 2016; Pourcet & Duez, 2020), todas las muestras que se procesaron para inmunofluorescencia se obtuvieron en un horario fijo de 9:00 h a 14:00 h.

## **Genotipificación de animales transgénicos.**

A los 21 días de nacidos, los ratones transgénicos fueron destetados y separados por sexo. Se obtuvo una muestra de tejido (~1 cm de largo de la cola) de cada

animal, utilizando una tijera quirúrgica. Cada muestra fue colocada en un microtubo de 1.5 ml y se almacenaron a una temperatura de 4 °C. Para la genotipificación de los animales transgénicos se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) punto final, de acuerdo con las especificaciones del proveedor (figura 5; The Jackson Laboratory). Primero, cada muestra se incubó por 15 minutos en 500 µl de NaOH (0.05 M), a una temperatura de 95 °C. Después, se agregaron 50 µl de solución STOP (TRIS 1 M, EDTA 10mM, pH 8) a cada muestra, para detener la digestión enzimática. Cada muestra fue luego centrifugada a 10000 rpm durante 1 minuto y se extrajo el sobrenadante. Se utilizaron diferentes secuencias de oligonucleótidos, de acuerdo con el transgén a identificar y las recomendaciones del proveedor (The Jackson Laboratory). Para amplificar la región del transgén Cx3cr1<tm1.1(cre)Jung>, se utilizaron las siguientes secuencias de oligonucleótidos: la secuencia común, 5'-CGA GGG AAA TCT GAT GCAAG-3'; la secuencia mutante, 5'-GAC ATT TGC CTT GCT GGA C-3'; y la secuencia silvestre, 5'-CCT CAG TGT GAC GGA GAC AG-3'. Para amplificar la región del transgén Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP), se utilizaron las siguientes secuencias de oligonucleótidos: las secuencias silvestres, 5'-AAG GCA GCT GCA GTG GAG TA-3' y 3'-CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC-5'; y las secuencias mutantes, 5'-ACA TGG TCC TC TGG AGT TC-3' y 3'-GCC ATT AAA GCA GCG TAT CC-5'. Para amplificar la región del transgén Gt(ROSA)26Sor<tm2(CAG-CHRM3\*, -mCitrine)Ute>, se utilizaron las siguientes secuencias de oligonucleótidos: las secuencias silvestres 5'-AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA-3' y 3'-CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC-5'; y las secuencias mutantes, 5'-CGC CAC CAT GTA CCC ATA C-3' y 3'-GTG GTA CCG TCT GGA GAG GA-5'. Para amplificar la región del transgén Gt(ROSA)26Sor<tm1(CAG-CHRM4\*, -mCitrine)Ute>, se utilizaron las siguientes secuencias de oligonucleótidos: las secuencias silvestres 5'-AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA-3' y 3'-CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC-5'; y las secuencias mutantes, 5'-TCA TAG CGA TTG TGG GAT GA-3' y 3'-CGA AGT TAT TAG GTC CCT CGA C-5'. Por cada muestra, se mezcló el sobrenadante del tejido digerido enzimáticamente, las secuencias de oligonucleótidos correspondientes (10 nM), buffer amortiguador con glicerol (5x, Promega Corp., WI, Estados Unidos),

MgCl<sub>2</sub> (25 nM; Promega Corp.), Taq polimerasa (5 u/μl; Promega Corp.), dNTPs (10 mM; Promega Corp.) y agua libre de nucleasas (Promega Corp.), con un volumen final de 20 μl. Las muestras fueron amplificadas con un termociclador (C1000 Touch, BioRad Laboratory, CA, Estados Unidos), de acuerdo con las especificaciones del proveedor (The Jackson Laboratory). Se programó un paso de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, 48 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a temperaturas decrecientes desde 94 °C hasta 68 °C (decrementos de 0.5 °C / ciclo), 1 minuto a 55 °C de apareamiento, 2 minutos de elongación a 72 °C y, por último, un paso a 12 °C a tiempo infinito. Los productos de la PCR fueron corridos, junto con el marcador de peso molecular, mediante electroforesis en un gel de agarosa (1.5 %; Promega Corp.) con un marcador fluorescente (GelRed 10000x; Biotium Inc., CA, Estados Unidos) y visualizados utilizando un transiluminador de luz UV (Gel Doc EZ Imager, BioRad Laboratory). Finalmente, se corroboró la presencia de cada transgén con la visualización de los productos de la PCR en su respectivo peso molecular (figura 3). Para las muestras obtenidas de animales de las cepas Cx3cr1/ChR2, Cx3cr1/hM3Dq y Cx3cr1/hM3Dq se realizaron genotipificaciones dobles del transgén Cx3cr1<tm1.1(cre)Jung> (figura 5A) y de los transgenes Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP) (figura 5B), Gt(ROSA)26Sor<tm2(CAG-CHRM3\*,-mCitrine)Ute> (figura 5C) y Gt(ROSA)26Sor<tm1(CAG-CHRM4\*,-mCitrine)Ute> (figura 5D), respectivamente, en geles distintos.

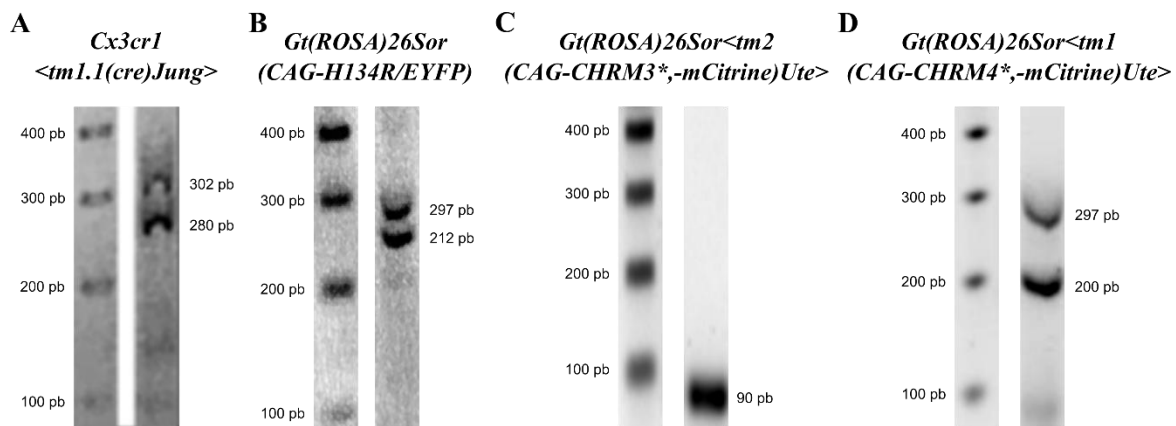


Figura 5. Genotipificación de animales transgénicos. Geles de agarosa con una escalera molecular de 100 pares de bases (pb, carril izquierdo) y los productos amplificados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas

en inglés; carril derecho), correspondientes a muestras obtenidas de animales transgénicos que expresan los transgenes Cx3cr1<tm1.1(cre)Jung> (A), Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP) (B), Gt(ROSA)26Sor<tm2(CAG-CHRM3\*, -mCitrine)Ute> (C) y Gt(ROSA)26Sor<tm1(CAG-CHRM4\*, -mCitrine)Ute> (D), respectivamente, en geles distintos. En A, se muestran los productos amplificados de la PCR que demuestran la heterocigosidad con respecto al gen Cx3cr1 (280 pb) y la secuencia transgénica Cx3cr1<tm1.1(cre)Jung> (~302 pb). En B, se muestran los productos amplificados de la PCR que muestran la heterocigosidad con respecto al gen Rosa26 (297 pb) y la secuencia transgénica Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP) (212 pb). En C, se muestra el producto amplificado de la PCR que muestra la presencia de la secuencia transgénica Gt(ROSA)26Sor<tm2(CAG-CHRM3\*, -mCitrine)Ute> (90 pb). En D, se muestran los productos amplificados de la PCR que muestran la heterocigosidad con respecto al gen Rosa26 (297 pb) y la secuencia transgénica Gt(ROSA)26Sor<tm1(CAG-CHRM4\*, -mCitrine)Ute> (200 pb).

### **Cuantificación de la expresión proteica de IL1 $\beta$ hipocampal.**

Se cuantificó la expresión proteica de IL1 $\beta$  del hipocampo de ratones anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq y de la cepa control Cx3cr1/Cre, previamente administrados con CNO (10  $\mu$ g) de forma intracerebroventricular. Para ello, los animales fueron perfundidos transcárdicamente con PBS (20 ml, 0.1 M, pH 7.4, 4°C). Después, se extrajo el cerebro de los animales y se disecó el hipocampo (Mondragón-Rodríguez et al., 2018). El tejido hipocampal fue colocado en hielo seco, pesado y almacenado a -30 °C. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de proteínas a través de la homogeneización del tejido hipocampal en 100  $\mu$ l de buffer de lisis (deoxicalato de Na<sup>+</sup> al 1 %, Triton x-100 al 1 %, SDS-PAGE al 0.1 %, 0.15 M de NaCl, 0.01 M de fosfato de Na<sup>+</sup>, 2 mM de EGTA, 0.2 mM de ortovanadato de Na) adicionado con un inhibidor de proteasas (aprotinina; 100 U/ml; Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos). Los homogenados de hipocampo fueron centrifugados a 11000 rpm por 5 minutos a 4°C, de donde se extrajo el sobrenadante. La cuantificación de la expresión proteica de IL1 $\beta$  se llevó a cabo en duplicados de las muestras utilizando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) tipo sándwich (IL1 $\beta$  de ratón, Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los homogenados fueron incubados en la placa de ELISA con el anticuerpo anti-IL1 $\beta$  en agitación por 3 horas a temperatura ambiente. Después de 3 lavados, las muestras fueron incubadas con la solución substrato TMB por ~15 minutos, seguido de la adición de la solución

STOP. Finalmente, los niveles de absorbancia en la placa de ELISA fueron leídos en un espectrofotómetro (620 nm, Varioskan, Thermo Scientific). Para obtener los niveles de IL1 $\beta$  por cada muestra, se corrió una curva de diluciones de IL1 $\beta$  y se graficó con su respectivo valor de absorbancia, mostrando un ajuste de  $r^2 = 0.99$ . Posteriormente, los valores de absorbancia fueron ajustados con respecto al peso del tejido, de esta forma, representando la expresión proteica de IL1  $\beta$  como ng /mg de tejido.

## **Análisis de datos.**

### **Actividad electrofisiológica.**

La actividad electrofisiológica del hipocampo fue analizada mediante la transformada rápida de Fourier (FFT, por sus siglas en inglés), utilizando el programa Clampfit (versión 10.6, Molecular Devices; Alcantara-Gonzalez et al., 2019; Villasana-Salazar et al., 2020; Hernández-Soto et al., 2021; Martínez-García et al., 2021). Se tomaron 3 ventanas de 20 segundos, libres de artefactos, en cada una de las condiciones experimentales. Se realizó la FFT a cada uno de los trazos seleccionados con una ventana *Hamming* y una resolución espectral de 0.24 Hz. Los valores numéricos de cada espectro de potencia fueron promediados en las siguientes bandas de frecuencia: banda ancha (1-115 Hz), delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-120 Hz). Se excluyeron del análisis los valores numéricos de la potencia en la banda de frecuencia relacionada con la corriente alterna (55-65 Hz), debido al uso de un filtro *notch*. Para analizar la actividad electrofisiológica basal, se calculó la potencia relativa, en la banda ancha de 1-115 Hz, para cada una de las bandas de frecuencia analizadas y sus valores fueron expresados como % de la potencia (Villasana-Salazar et al., 2020; Hernández-Soto et al., 2021; Martínez-García et al., 2021). Para obtener el porcentaje de cambio de la actividad electrofisiológica de cada condición experimental con respecto a su respectiva actividad basal, los valores promedio de la potencia absoluta fueron normalizados, en cada banda de frecuencia, con respecto a la potencia absoluta de la actividad basal, establecida como el 100 por ciento (% del basal). De la misma forma, para obtener el porcentaje de cambio de la hiperexcitabilidad neuronal

después de la manipulación microglial, los valores promedio de la potencia absoluta fueron normalizados, en cada banda de frecuencia, con respecto a la potencia absoluta de la hiperexcitabilidad neuronal previa a la manipulación microglial, establecida como el 100 por ciento (% de 4-AP).

### **Actividad multiunitaria hipocampal.**

La actividad multiunitaria hipocampal de los 16 sitios de registro se obtuvo utilizando el programa *Offline Sorter* (versión 4.4.2, Plexon). Para ello, se aplicó un filtro pasa altas de 750 Hz (filtro Butterworth de 8 polos) y se detectaron las espigas (multiunidades) que superaron 4 veces la desviación estándar de la señal de cada electrodo (Nieto-Posadas et al., 2014). Posteriormente, las multiunidades detectadas fueron exportadas al programa NeuroExplorer (versión 5.205, Nex Technologies, CO, Estados Unidos), en donde se graficó el *raster plot* de las multiunidades registradas y se calculó la frecuencia de disparo de cada multiunidad hipocampal en bins de 100  $\mu$ s. La actividad multiunitaria asociada a la estimulación optogenética se verificó visualmente mediante el pulso de sincronía emitido por el estimulador S88 (Grass Instruments Co.) y registrado por el Omniplex (Plexon). Finalmente, se promedió, por cada ensayo, la tasa de disparo de las multiunidades registradas utilizando una ventana de análisis de 10 s y se compararon sus valores entre la actividad basal previa a la estimulación optogenética y la actividad evocada durante la estimulación optogenética.

### **Análisis morfológico de la microglía y cuantificación de núcleos celulares.**

El análisis morfológico de la microglía se llevó a cabo de forma manual utilizando los protocolos descritos por Young & Morrison (2018) y Heindl y colaboradores (2018), con ligeras modificaciones. Las micrografías de la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 fueron importadas a Image J (versión 1.53f51, National Institutes of Health, MD, Estados Unidos) en formato TIFF, en donde fueron transformadas a imágenes de 8 bits. Primero, se alisó la imagen, se substrajo la fluorescencia inespecífica de fondo (radio de bola rodante = 5 píxeles con una paraboloides deslizante) y se utilizó un filtro pasa banda (Min = 1 píxel, Max = 200

pixeles, tolerancia = 5 %). Posteriormente, se extrajo la media de la fluorescencia total de la imagen y se ajustó el brillo y el contraste hasta observar claramente el soma y los procesos microgliales. Después, se ajustó el umbral de binarización de la imagen utilizando el valor medio de la fluorescencia de la imagen y se eliminaron las marcas de fluorescencia inespecífica que no pertenecieran a los cuerpos celulares microgliales utilizando las opciones *despeckle* y *remove outliers* (Radio = 2.0, Umbral = 50). Para aislar a los cuerpos microgliales de la fluorescencia inespecífica que no pudo ser removida en el paso anterior, se utilizó un análisis de partículas (tamaño de las partículas = desde 100-250 pixeles hasta infinito, circularidad = 0.0 – 1.0) excluyendo a los cuerpos microgliales de las orillas que no mostraran su morfología completa. Una vez obtenida la imagen binarizada con los cuerpos microgliales, se cuantificó el número de microglías por cada micrografía, así como el área y el perímetro de los cuerpos microgliales utilizando un análisis de partículas con los mismos parámetros que en el paso anterior. Posteriormente, se obtuvo el esqueleto de cada célula utilizando la opción *skeletonize* y se cuantificó el número de terminaciones utilizando el análisis *skeleton*. Finalmente, los datos numéricos de la morfología microglial fueron exportados a Excel (versión 365, Microsoft, TX, Estados Unidos), en donde se calculó la densidad microglial (células / mm<sup>2</sup>), el área microglial (mm<sup>2</sup>), el número de ramificaciones secundarias y el índice de circularidad. El índice de circularidad se calculó utilizando la siguiente fórmula  $4\pi[\text{área celular}]/[\text{perímetro celular}]^2$  (Heindl, 2018). Asimismo, se cuantificó la densidad de núcleos celulares (núcleos / mm<sup>2</sup>) marcados con DAPI. Para ello, se substrajo la fluorescencia inespecífica de fondo a cada imagen (radio de bola rodante = 20 pixeles con una paraboloides deslizante), se extrajo la media de la fluorescencia total de la imagen y se ajustó el brillo y el contraste hasta observar claramente los núcleos celulares. Posteriormente, se ajustó el umbral de binarización de la imagen utilizando el valor medio de la fluorescencia de la imagen y se eliminaron las marcas de fluorescencia inespecífica que no pertenecieran a los núcleos celulares utilizando las opciones *despeckle* y *remove outliers* (Radio = 2.0, Umbral = 50). Finalmente, sobre la imagen binarizada, se utilizó un análisis de partículas (tamaño de las partículas = desde 100-250 pixeles hasta infinito,



circularidad = 0.0 – 1.0) para cuantificar el número de núcleos celulares por cada micrografía.

### **Análisis estadístico.**

Los datos se analizaron con estadística paramétrica o no paramétrica de acuerdo con su distribución normal o no normal, respectivamente. Para evaluar la normalidad de la distribución de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para el análisis de la actividad electrofisiológica, de acuerdo con la naturaleza de la distribución de los datos, estos fueron analizados con la prueba paramétrica ANOVA de una vía o con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En ambos casos se utilizó una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, utilizando la prueba paso a paso de dos etapas de Benjamini, Krieger y Yekutieli (2006). En la sección de resultados se señalará la prueba estadística que fue utilizada para realizar las comparaciones entre los grupos experimentales de cada experimento. Para comparar los cambios en el peso de los animales y la mortalidad durante el protocolo de HIC se utilizó la prueba de Mann-Whitney y la prueba exacta de Fisher, respectivamente. También se utilizó la correlación de Spearman para correlacionar la potencia relativa de la actividad hipocampal basal en la banda de frecuencia gamma con la potencia normalizada de la actividad epileptiforme inducida con 4-AP de los experimentos *in vitro*. La tasa de disparo de la actividad multiunitaria hipocampal en los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 se comparó con la prueba de Wilcoxon. Para el análisis de la densidad y morfología microglial, así como de la densidad de núcleos celulares, de acuerdo con la naturaleza de la distribución de los datos, se utilizó la prueba t de Student o la prueba de Mann-Whitney. En la sección de resultados se señalará la prueba estadística que fue utilizada para realizar las comparaciones entre los grupos de cada experimento. Para analizar los niveles de IL1 $\beta$ , se utilizó la prueba t de Student. Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico Prism (versión 8, GraphPad Software Inc.) y se graficaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Se consideraron significativas las diferencias con  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### **La HIC incrementa la actividad hipocampal en la banda de frecuencia gamma y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP *in vitro*.**

Con la finalidad de investigar los efectos de la HIC sobre la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad, se sometió a un grupo de animales a HIC por 21 días y posteriormente se evaluó su efecto sobre la actividad electrofisiológica y la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP en rebanadas de hipocampo.

#### **Peso de los animales y mortalidad después del protocolo de HIC.**

A pesar de que los animales de ambos grupos comenzaron con el mismo peso (Control =  $155.6 \pm 3.7$  g; HIC =  $154.2 \pm 5.2$  g;  $p > 0.1$ ; prueba de Mann-Whitney; tabla 1), los animales que fueron sometidos al protocolo de HIC por 21 días ganaron menos peso corporal al final del protocolo ( $258.0 \pm 3.0$  g; 167.3 % del día 1; tabla 1), comparados con los animales control mantenidos en condiciones de normoxia ( $273.9 \pm 4.1$  g; 176 % del día 1;  $p < 0.01$ ; prueba de Mann-Whitney; tabla 1). Resultados similares han mostrado que la HIC resulta en una disminución de la ganancia de peso corporal en los animales (Siqués et al., 2006; Zoccal et al., 2008; Jun et al., 2010; Rodriguez-Alvarez et al., 2015; Huanhuan et al., 2021), asociando este fenómeno a una disminución en la ingesta de comida (Jun et al., 2010). Por otro lado, el 15 % de los animales que fueron sometidos a HIC murieron durante el protocolo (2/14 animales; tabla 1), mientras que ninguno de los animales del grupo control murió (0/8 animales;  $p < 0.001$ ; prueba exacta de Fisher; tabla 1). En la literatura se ha reportado una tasa de mortalidad similar, tanto en animales neonatos y adultos expuestos a periodos breves de hipoxia (Jensen et al., 1992; Owens et al., 1997; Rodriguez-Alvarez et al., 2015), como en animales expuestos a hipoxia hipobárica intermitente crónica (Siqués et al., 2006). A pesar de que no se estudiaron específicamente las causas de muerte en los animales expuestos a HIC, ésta podría estar relacionada con la inducción de hiperexcitabilidad durante los periodos de hipoxia (Wais et al., 2009; Rodriguez-Alvarez et al., 2015), y/o con arritmias ventriculares y muerte cardiaca súbita (Monrad et al., 2018).

Tabla 1. Efecto de la hipoxia intermitente crónica (HIC) sobre el peso corporal y la mortalidad. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para comparar los cambios en el peso corporal y la prueba exacta de Fisher para comparar la mortalidad entre los grupos experimentales. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$ EEM.

	Control	HIC	Valor de p
<b>Peso corporal inicial</b>	155.6 $\pm$ 3.7 g	154.2 $\pm$ 5.2 g	0.24
<b>Peso corporal final</b>	273.9 $\pm$ 4.1 g (176 % del día 1)	258.0 $\pm$ 3.0 g (167.3 % del día 1)	< 0.01
<b>Mortalidad</b>	0 % (0/8 animales)	15 % (2/14 animales)	< 0.001

**La HIC aumenta la actividad electrofisiológica basal del hipocampo en la banda de frecuencia gamma *in vitro*.**

Después de 21 días de HIC o de normoxia, se extrajeron rebanadas de hipocampo y se registró la actividad electrofisiológica de la capa piramidal del área CA1 *in vitro* (figura 4A). El análisis de la potencia absoluta de la actividad electrofisiológica basal, en la banda de frecuencia de 1-115 Hz, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Control = 32.2  $\pm$  10.0 nV<sup>2</sup>/Hz, n = 14 rebanadas de 5 animales; HIC = 22.6  $\pm$  8.0 nV<sup>2</sup>/Hz, n = 18 rebanadas de 8 animales; p>0.1; prueba de Kruskal-Wallis; figura 6B), demostrando que la HIC no produce un cambio generalizado en la actividad del circuito hipocampal. Sin embargo, el análisis del espectro de potencia relativa mostró un incremento significativo de la potencia relativa en la banda de frecuencia gamma en el grupo sometido a HIC (16.8  $\pm$  3.6 % de la potencia; figuras 4C y 4D), en comparación con el grupo control (5.7  $\pm$  0.4 % de la potencia; p<0.05; prueba de Kruskal-Wallis; figuras 6C y 6D). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las bandas de frecuencia delta (Control = 49.3  $\pm$  5.3 % de la potencia; HIC = 35.1  $\pm$  5.2 % de la potencia; p>0.1; prueba de Kruskal-Wallis; figura 6D), theta (Control = 19.2  $\pm$  2.3 % de la potencia; HIC = 25.6  $\pm$  2.7 % de la potencia; p>0.1; prueba de Kruskal-

Wallis; figura 6D) y beta (Control =  $23.4 \pm 3.9$  % de la potencia; HIC =  $29.4 \pm 2.2$  % de la potencia;  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figura 6D).

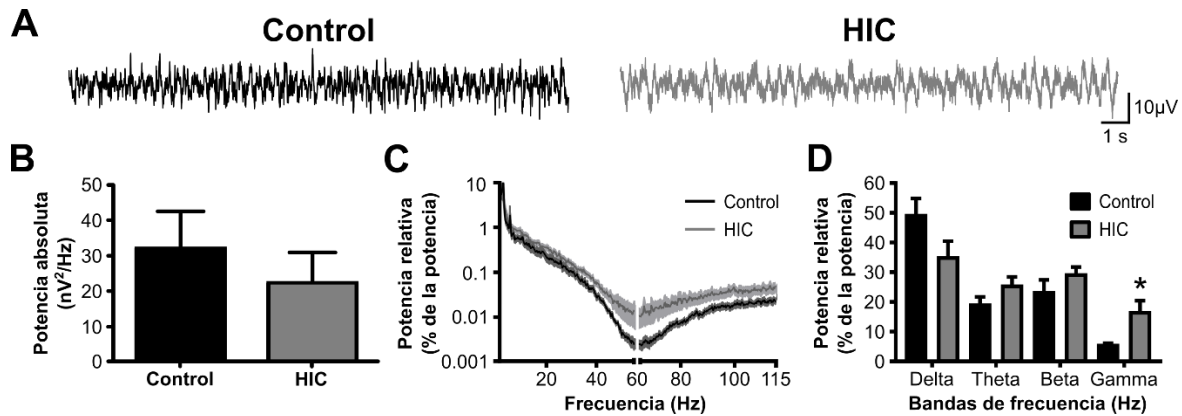


Figura 6. Efecto de la hipoxia intermitente crónica (HIC) sobre la actividad electrofisiológica basal del hipocampo *in vitro*. A. Trazos representativos de la actividad electrofisiológica basal del hipocampo de animales tratados con HIC o con normoxia (Control). B. Potencia absoluta promedio de la actividad electrofisiológica basal, en la banda de frecuencia de 1-115 Hz, de animales tratados con HIC (n = 18 rebanadas de 8 animales) o con normoxia (n = 14 rebanadas de 5 animales). C. Espectrogramas de la potencia relativa (% de la potencia) de la actividad electrofisiológica basal del hipocampo de animales tratados con HIC o con normoxia. D. Cuantificación de la potencia relativa (% de la potencia) de la actividad electrofisiológica basal del hipocampo en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz), de animales control (barras negras) y de animales tratados con HIC (barras grises). Nótese que la HIC aumentó significativamente la potencia relativa en la banda de frecuencia gamma. \* denota una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con  $p < 0.05$ . Los grupos experimentales fueron comparados estadísticamente con la prueba de Kruskal-Wallis y se realizó una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

### La HIC exacerba la hiperexcitabilidad hipocampal inducida con 4-AP *in vitro*.

La aplicación de 4-AP (100  $\mu$ M) en la solución de registro indujo hiperexcitabilidad en las rebanadas de hipocampo (figura 5A). En rebanadas obtenidas de animales control, la aplicación de 4-AP indujo actividad epileptiforme de tipo interictal, caracterizada por la presencia de espigas paroxísticas de alta amplitud y recurrencia que se mantienen a lo largo del registro (figuras 7A y 7B; Perrault y Avoli, 1991; Barbaroise y Avoli, 1997; Panuccio et al., 2010). En contraste, la aplicación de 4-AP

en rebanadas de hipocampo obtenidas de animales sometidos a HIC, indujo actividad epileptiforme de tipo interictal en el 67 % de las rebanadas registradas (12 / 18 rebanadas; figura 7B) , provenientes del 37 % de los animales sometidos a HIC (3 / 8 animales; figura 7Bi), así como un patrón de actividad epileptiforme exacerbado conocido como actividad epileptiforme de tipo ictal, caracterizado por descargas recurrentes de espigas paroxísticas de alta amplitud y frecuencia, seguidas por un periodo de depresión postictal (figura 7A; Perrault y Avoli, 1991; Barbaroise y Avoli, 1997; Panuccio et al., 2010). La actividad epileptiforme de tipo ictal inducida por la aplicación de 4-AP sólo se observó en rebanadas provenientes de animales sometidos a HIC ( $p < 0.05$ ; prueba exacta de Fisher; figura 7B), observándose en el 33 % de las rebanadas registradas (6 / 18 rebanadas; figura 7B), provenientes del 63 % de los animales sometidos a HIC (5 / 8 animales; figura 7Bi). El análisis de la potencia de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP, incluyendo ambos tipos de actividad epileptiforme, mostró un incremento significativo de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (figuras 7C y 7D), incluyendo la banda ancha (Control =  $2175.0 \pm 605.2$  % del basal, HIC =  $99459.0 \pm 64468.0$ ;  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figura 7C) y las bandas delta (Control =  $5717.0 \pm 2062.0$  % del basal, HIC =  $167666.0 \pm 113159.0$  % del basal;  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figura 7C), theta (Control =  $5761.0 \pm 2835.0$  % del basal, HIC =  $236687.0 \pm 133345.0$  % del basal;  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figura 7C), beta (Control =  $2364.0 \pm 1024.0$  % del basal, HIC =  $82990.0 \pm 37545.0$  % del basal;  $p < 0.01$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figura 7C) y gamma (Control =  $285.6 \pm 70.1$  % del basal, HIC =  $1661.0 \pm 672.0$  % del basal;  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figura 7C). Finalmente, con el objetivo de investigar la posible relación entre la actividad electrofisiológica basal y la hiperexcitabilidad inducida con 4AP, realizamos una correlación entre la potencia relativa de la actividad basal en la banda de frecuencia gamma (% de la potencia) y la potencia normalizada de la actividad epileptiforme en la banda ancha (% del basal; figura 7E). El análisis mostró una correlación positiva entre la potencia relativa de la actividad basal en la banda de frecuencia gamma y la magnitud de la potencia de la actividad epileptiforme de los grupos control e HIC ( $r = 0.42$ ;  $p < 0.01$ ; correlación de Spearman; figura 7E).

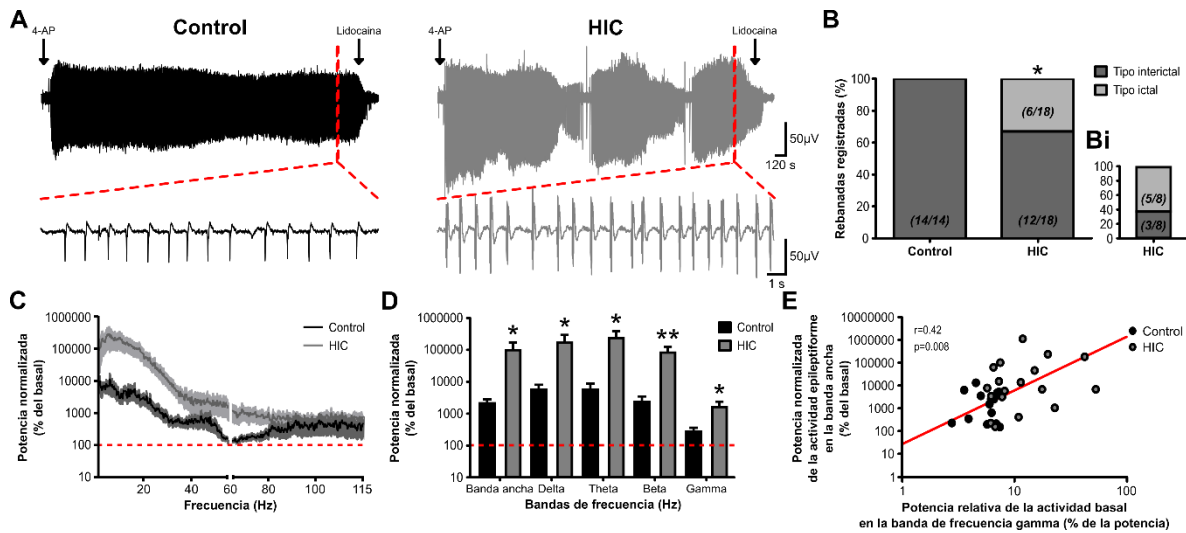


Figura 7. Efecto de la HIC sobre la hiperexcitabilidad hipocampal inducida con 4-aminopiridina (4-AP) *in vitro*. A. Trazos representativos de larga duración de la hiperexcitabilidad hipocampal inducida con 4-AP (100  $\mu$ M) en rebanadas de animales control o sometidos a HIC. Las flechas indican el inicio de la aplicación de 4-AP (100  $\mu$ M) o de lidocaína (1 mM). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad epileptiforme delimitada por la línea roja punteada. Nótese que las rebanadas obtenidas de animales sometidos a HIC exhiben actividad epileptiforme de tipo ictal, en contraste con las rebanadas obtenidas de animales control que solamente muestran actividad epileptiforme de tipo interictal. B. Cuantificación de la proporción de rebanadas registradas que mostraron actividad epileptiforme de tipo ictal e interictal inducida con 4-AP (100  $\mu$ M) en los grupos control ( $n = 14$  rebanadas de 5 animales) e HIC ( $n = 18$  rebanadas de 8 animales). Nótese que sólo las rebanadas obtenidas de animales sometidos a HIC mostraron actividad epileptiforme de tipo ictal. Bi. Proporción de animales sometidos a HIC cuyas rebanadas presentaron actividad epileptiforme de tipo ictal e interictal. C. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (100  $\mu$ M) en los grupos control e HIC. La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para ambos grupos. D. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (100  $\mu$ M) en las rebanadas de hipocampo obtenidas de animales sometidos a HIC es significativamente mayor en todas las bandas de frecuencia analizadas, en comparación con el grupo control. E. Correlación de la potencia relativa de la actividad basal en la banda de frecuencia gamma (% de la potencia) y de la potencia normalizada de la actividad epileptiforme en la banda ancha (% del basal) de los grupos control e HIC. Se ajustó una función no lineal log-log a los datos (línea roja). Nótese que la potencia relativa de la actividad basal en la banda de frecuencia gamma muestra una ligera correlación positiva con la magnitud de la potencia de la

actividad epileptiforme. \* y \*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente. La comparación estadística de la proporción de rebanadas que mostraron actividad ictal e interictal entre los grupos experimentales fue hecha con la prueba exacta de Fisher. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

### **Los efectos de la HIC sobre la actividad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP son revertidos después de un periodo de reoxigenación (ReOx).**

Con la finalidad de investigar la posible reversibilidad de los efectos inducidos por la HIC sobre la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad, un grupo independiente de animales fue sometido a HIC durante 21 días y posteriormente fue sometido a un periodo de ReOx de 30 días, en donde los animales respiraron aire normóxico. Finalizando este periodo, se evaluó la actividad electrofisiológica hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP en rebanadas de hipocampo.

### **Las alteraciones inducidas por la HIC sobre la actividad electrofisiológica hipocampal *in vitro* son revertidas después de un periodo de ReOx.**

Con el objetivo de investigar la persistencia de las alteraciones inducidas por la HIC sobre la actividad electrofisiológica basal del hipocampo *in vitro*, se registró la actividad electrofisiológica hipocampal de rebanadas de hipocampo obtenidas de animales sometidos a HIC y a un periodo de ReOx (figura 8A). El análisis de la potencia absoluta de la actividad electrofisiológica basal, en la banda de frecuencia de 1-115 Hz, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Control+ReOx =  $49.9 \pm 19.4$  nV<sup>2</sup>/Hz, n = 11 rebanadas de 3 animales; HIC+ReOx =  $31.2 \pm 7.7$  nV<sup>2</sup>/Hz, n = 13 rebanadas de 4 animales;  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figura 8B). De forma similar, el análisis de la potencia relativa de la actividad electrofisiológica basal no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Delta: Control+ReOx =  $52.7 \pm 5.3$

% de la potencia, HIC+ReOx =  $59.2 \pm 6.5$  % de la potencia,  $p > 0.1$ ; Theta: Control+ReOx =  $22.0 \pm 3.3$  % de la potencia, HIC+ReOx =  $15.0 \pm 2.1$  % de la potencia,  $p > 0.1$ ; Beta: Control+ReOx =  $19.2 \pm 19.9$  % de la potencia, HIC+ReOx =  $19.9 \pm 3.7$  % de la potencia,  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figuras 8C y 8D), incluyendo la banda de frecuencia gamma (Control+ReOx =  $5.9 \pm 1.4$  % de la potencia, HIC+ReOx =  $5.7 \pm 1.0$  % de la potencia;  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figuras 8C y 8D).

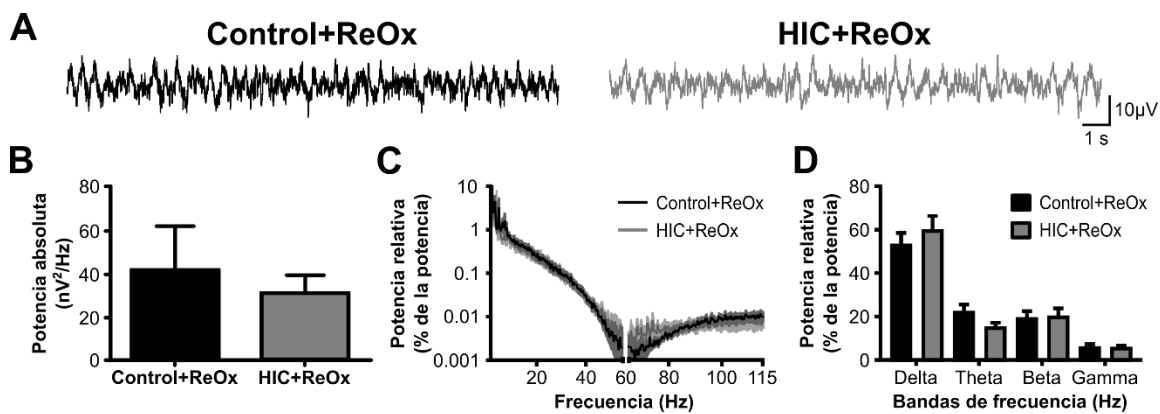


Figura 8. Los efectos de la HIC sobre la actividad electrofisiológica basal del hipocampo son revertidos tras un periodo de reoxigenación (ReOx). A. Trazos representativos de la actividad electrofisiológica basal del hipocampo de animales tratados con HIC o con normoxia (Control), seguido de un periodo de ReOx de 30 días. B. Potencia absoluta promedio de la actividad electrofisiológica basal, en la banda de frecuencia de 1-115 Hz, de animales de los grupos control+ReOx (barras negras; n = 11 rebanadas de 3 animales) e HIC+ReOx (barras grises; n = 13 rebanadas de 4 animales). C. Espectrogramas de la potencia relativa (% de la potencia) de la actividad electrofisiológica basal del hipocampo de animales de los grupos control +ReOx e HIC+ReOx. D. Cuantificación de la potencia relativa (% de la potencia) de la actividad electrofisiológica basal del hipocampo en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz), de animales control+ReOx (barras negras) e HIC+ReOx (barras grises). Nótese que la ReOx revirtió los efectos de la HIC sobre la potencia relativa de la actividad electrofisiológica basal en la banda de frecuencia gamma. Los grupos experimentales fueron comparados estadísticamente con la prueba de Kruskal-Wallis y se realizó una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.



**Las alteraciones inducidas por la HIC sobre la hiperexcitabilidad hipocampal inducida con 4-AP *in vitro* son revertidas después de un periodo de ReOx.**

Con el objetivo de investigar la persistencia de las alteraciones inducidas por la HIC sobre la hiperexcitabilidad hipocampal inducida con 4-AP *in vitro*, se aplicó 4-AP (100  $\mu$ M) en rebanadas de hipocampo obtenidas de animales sometidos a HIC y a un periodo de ReOx (figura 9A). La aplicación de 4-AP en la solución de registro indujo actividad epileptiforme de tipo interictal (figura 9A), en las rebanadas de hipocampo obtenidas de los grupos Control+ReOx (11/11 rebanadas; figura 9B) e HIC+ReOx (13/13 rebanadas;  $p > 0.1$ ; prueba exacta de Fisher; figura 9B). Es decir, en ninguna rebanada de hipocampo registrada se observó actividad epileptiforme de tipo ictal (figura 9B). El análisis de la potencia de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (figuras 9C y 9D), incluyendo la banda ancha (Control+ReOx =  $15014.0 \pm 7633.0$  % del basal, HIC+ReOx =  $23114.0 \pm 10593.0$ ;  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figuras 9C y 9D) y las bandas delta (Control+ReOx =  $40924.0 \pm 24463.0$  % del basal, HIC+ReOx =  $42406.0 \pm 19303.0$  % del basal;  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figuras 9C y 9D), theta (Control+ReOx =  $398998.0 \pm 390049.0$  % del basal, HIC+ReOx =  $109850.0 \pm 56488.0$  % del basal;  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figuras 9C y 9D), beta (Control+ReOx =  $504280.0 \pm 474256.0$  % del basal, HIC+ReOx =  $63032.0 \pm 30376.0$  % del basal;  $p < 0.01$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figuras 9C y 9D) y gamma (Control+ReOx =  $36863.0 \pm 26873$  % del basal, HIC+ReOx =  $8021.0 \pm 4721.0$  % del basal;  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis; figuras 9C y 9D). Finalmente, con el objetivo de investigar la persistencia de la relación entre la actividad electrofisiológica basal y la hiperexcitabilidad hipocampal en los animales sometidos a normoxia (control) o a HIC y a un periodo de ReOx, realizamos una correlación entre la potencia relativa de la actividad basal en la banda de frecuencia gamma (% de la potencia) y la potencia normalizada de la actividad epileptiforme en la banda ancha (% del basal; figura 9E). El análisis no mostró una correlación significativa entre la potencia relativa de la actividad basal en la banda de frecuencia gamma y

la magnitud de la potencia de la actividad epileptiforme de los grupos control+ReOx e HIC+ReOx ( $r = -0.02$ ;  $p > 0.1$ ; correlación de Spearman; figura 9E).

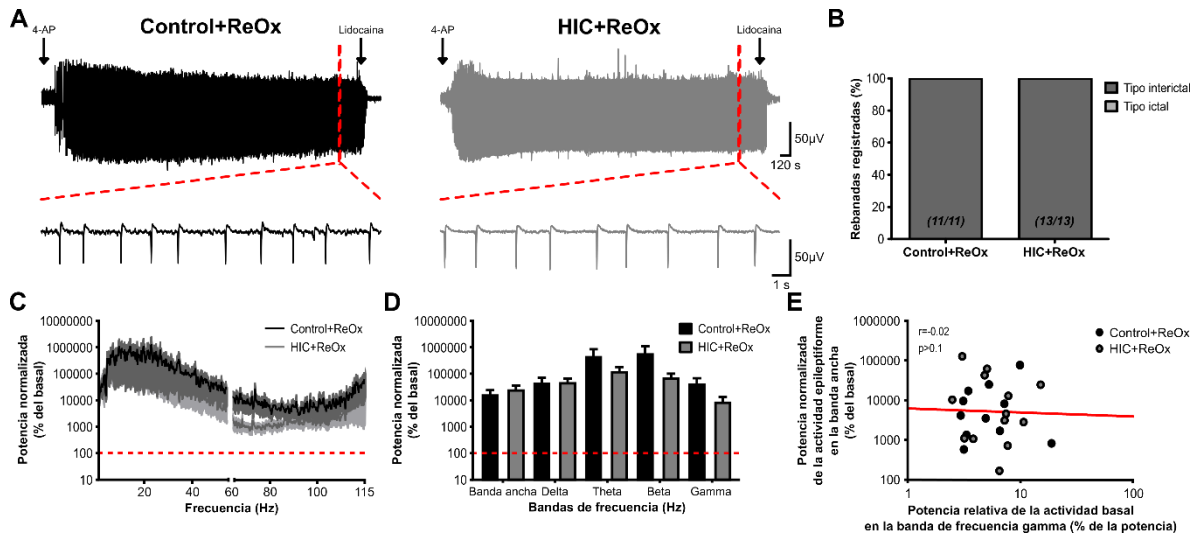


Figura 9. Los efectos de la HIC sobre la hiperexcitabilidad hipocámpal inducida con 4-AP son revertidos tras un periodo de ReOx. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad epileptiforme hipocámpal inducida con 4-AP (100  $\mu$ M) en rebanadas de animales control o sometidos a HIC, después de un periodo de ReOx de 30 días. Las flechas indican el inicio de la aplicación de 4-AP (100  $\mu$ M) o de lidocaína (1 mM). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad epileptiforme delimitada por la línea roja punteada. B. Cuantificación de la proporción de rebanadas registradas que mostraron actividad epileptiforme de tipo ictal e interictal inducida con 4-AP (100  $\mu$ M) en los grupos control+ReOx ( $n = 11$  rebanadas de 3 animales) e HIC+ReOx ( $n = 13$  rebanadas de 4 animales). C. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (100  $\mu$ M) de los grupos control+ReOx e HIC+ReOx. La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para ambos grupos. D. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (100  $\mu$ M) en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. E. Correlación de la potencia relativa de la actividad basal en la banda de frecuencia gamma (% de la potencia) y de la potencia normalizada de la actividad epileptiforme en la banda ancha (% del basal) de los grupos control+ReOx e HIC+ReOx. Se ajustó una función no lineal log-log a los datos (línea roja). Nótese que la ReOx revirtió los efectos de la HIC sobre la actividad epileptiforme hipocámpal, así como la relación de esta actividad con la actividad electrofisiológica basal en la banda de frecuencia gamma. La comparación estadística de la proporción de rebanadas que mostraron actividad ictal e interictal entre los grupos experimentales fue hecha con la prueba exacta de Fisher. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis

y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

En conjunto, estos resultados indican que la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental son moduladas por la HIC. Como se mencionó anteriormente, la activación proinflamatoria de la microglía es una de las principales consecuencias de la inducción experimental de HIC (Smith et al., 2013; Sapin et al., 2015; Liu et al., 2017; Shi et al., 2018; Dong et al., 2018; Oyarce & Iturriaga, 2018; Gong et al., 2020; Wu et al., 2021). Por otro lado, diversas investigaciones sugieren que la activación proinflamatoria de la microglía es un factor importante para el desarrollo de hiperexcitabilidad neuronal (De Simoni et al., 2000; Avignone et al., 2015; Amhaoul et al., 2015; Käufer et al., 2018; Brackhan et al., 2018). Por lo tanto, los efectos proepileptiformes de la HIC que observamos podrían ser el resultado de la activación proinflamatoria de la microglía. Por lo anterior, decidimos estudiar el efecto de la manipulación no selectiva y selectiva de la microglía sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental.

## **Manipulación farmacológica de la microglía.**

Con la finalidad de estudiar el efecto de la manipulación no selectiva de la microglía sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental, se administró de forma intracerebroventricular LPS, que es la herramienta farmacológica más utilizada para manipular a la microglía hacia un fenotipo proinflamatorio (Palsson-McDermott & O'Neill, 2004; Peña-Ortega, 2016; Pardo-Peña et al., 2018b; Batista et al., 2019; Bowyer et al., 2020) y se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP en animales anestesiados.

### **La administración intracerebroventricular de LPS no afecta la actividad electrofisiológica del hipocampo en animales anestesiados.**

Animales anestesiados con uretano fueron inyectados de forma intracerebroventricular con LPS (200  $\mu$ g) o con su vehículo (PBS), después de un periodo de 15-20 minutos de registro basal y, posteriormente, se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica del hipocampo durante 30-40 minutos (figura 10A). A pesar de que se utilizó una dosis alta de LPS (200  $\mu$ g), comparado con las dosis utilizadas en la literatura en el rango de los nanogramos (Batista et al., 2019), la actividad electrofisiológica hipocampal no se afectó por la administración de LPS en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $202.9 \pm 44.7$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $255.0 \pm 59.7$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta =  $224.7 \pm 43.3$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $128.8 \pm 30.0$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $125.3 \pm 35.92$  % del basal,  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $n = 12$ ; figuras 10B y 10C), con respecto a su propia actividad basal y al grupo control inyectado con vehículo (Banda ancha =  $156.3 \pm 30.9$  % del basal; Delta =  $188.8 \pm 62.9$  % del basal; Theta =  $162.5 \pm 40.0$  % del basal; Beta =  $157.69 \pm 65.6$  % del basal; Gamma =  $158.5 \pm 64.6$ ;  $n = 6$ , figuras 10B y 10C).

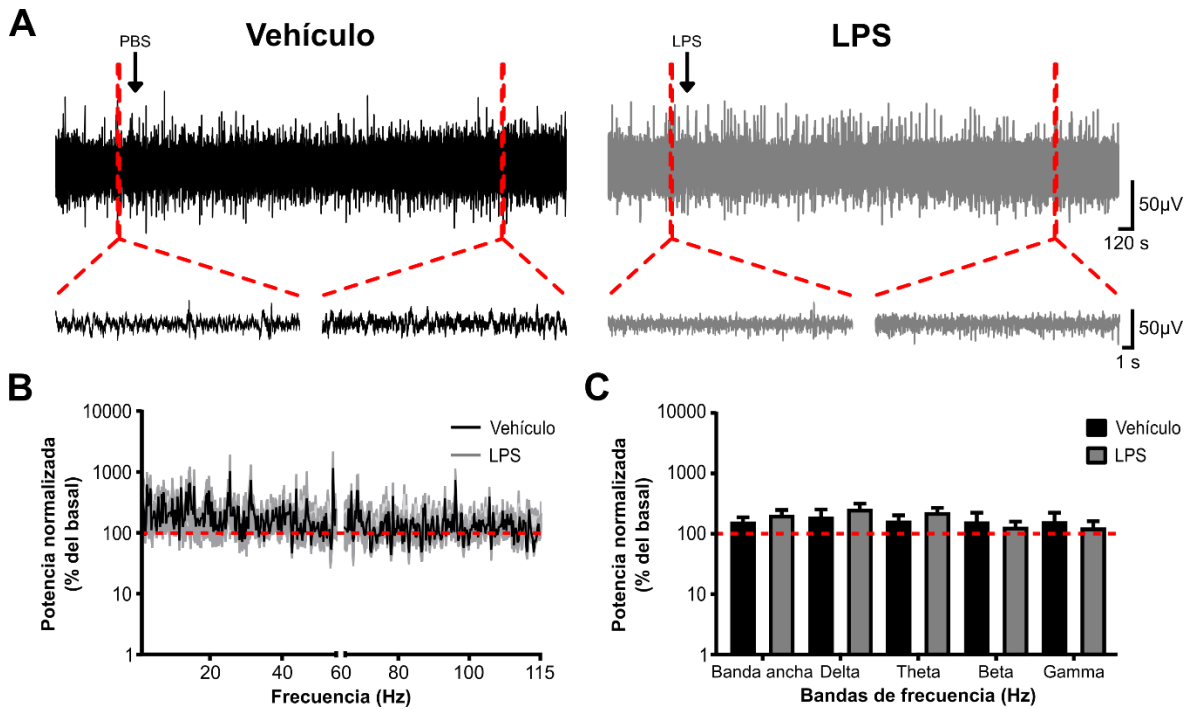


Figura 10. Efecto de la administración intracerebroventricular de lipopolisacárido (LPS) o de su vehículo (PBS) sobre la actividad electrofisiológica del hipocampo de animales anestesiados. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocampal basal y posterior a la administración de LPS (200 µg) o de su vehículo. Las flechas indican el inicio de la aplicación de LPS (200 µg) o de su vehículo. Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de LPS (200 µg) o de su vehículo (trazo de la derecha) B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica hipocampal después de la administración de LPS (200 µg; n = 12) o de su vehículo (n = 6). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica del hipocampo en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la administración de LPS (200 µg) o de su vehículo, no alteran la magnitud de la actividad electrofisiológica del hipocampo. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media ± EEM.

### **La administración intracerebroventricular de LPS no afecta la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP en animales anestesiados.**

Para examinar el efecto de la manipulación no selectiva de la microglía sobre la inducción experimental de hiperexcitabilidad, en un grupo separado de animales, se administró intracerebroventricularmente LPS (200  $\mu$ g) o su vehículo seguido de la administración intraperitoneal del fármaco convulsivante 4-AP (20 mg/kg) y se observaron sus efectos durante 30-40 minutos (figura 11A). En animales control inyectados de forma intracerebroventricular con vehículo, la administración de 4-AP produjo actividad epileptiforme en el hipocampo, caracterizada por un aumento sustancial de la amplitud de la actividad electrofisiológica de fondo y por la presencia de espigas epileptiformes (figura 11A), lo que se reflejó en un aumento de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $2963.3 \pm 1547.0$  % del basal; Delta =  $6098.7 \pm 4520.3$  % del basal; Theta =  $2716.5 \pm 1087.0$  % del basal; Beta =  $3210.7 \pm 1629.4$  % del basal; Gamma =  $1243.3 \pm 293.6$  % del basal; n = 6; figuras 11B y 11C). De forma similar, en los animales previamente inyectados de forma intracerebroventricular con LPS (200  $\mu$ g) se observó la aparición de actividad epileptiforme (figura 11A), lo que se reflejó en un aumento de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $1805.4 \pm 545.5$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $2032.3 \pm 641.7$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta =  $1957.3 \pm 667.5$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $2311.8 \pm 784.3$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $2911.9 \pm 1231.7$  % del basal,  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis; n = 6; figuras 11B y 11C), sin embargo, este aumento no fue estadísticamente diferente del mostrado por el grupo control inyectado con vehículo.

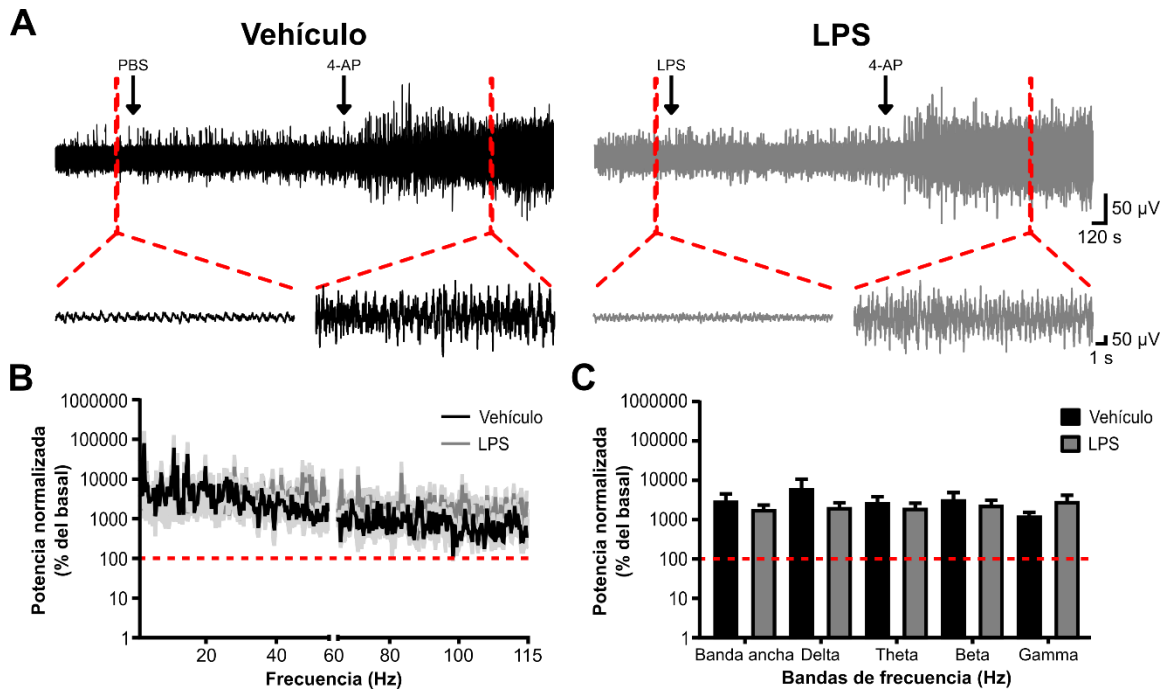


Figura 11. Efecto de la administración intracerebroventricular de LPS o de su vehículo (PBS) sobre la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP en animales anestesiados. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal y posterior a la administración de LPS (200  $\mu$ g) o de su vehículo, seguido de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Las flechas indican el inicio de la aplicación de LPS (200  $\mu$ g) o de su vehículo y de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de 4-AP (trazo de la derecha) B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme de animales administrados con LPS (200  $\mu$ g; n = 6) o con vehículo (n = 6). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la administración de LPS (200  $\mu$ g) o de su vehículo, no alteran la inducción de hiperexcitabilidad hipocámpal con 4-AP (20 mg/kg, i.p.). La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

**La administración intracerebroventricular de LPS no altera la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP en animales anestesiados.**

Con el objetivo de investigar el efecto de la manipulación no selectiva de la microglía sobre el la hiperexcitabilidad ya inducida, en un grupo separado de animales, se

administró LPS (200  $\mu$ g) o su vehículo de forma intracerebroventricular durante la actividad epileptiforme inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.). La actividad epileptiforme de los animales inyectados de forma intracerebroventricular con vehículo no cambió significativamente con respecto a la actividad epileptiforme previa a la inyección (Banda ancha =  $123.5 \pm 9.8$  % de 4AP; Delta =  $162.2 \pm 13.9$  % de 4AP; Theta =  $136.6 \pm 33.4$  % de 4AP; Beta =  $154.9 \pm 20.4$  % de 4AP; Gamma =  $157.0 \pm 26.0$  % de 4AP; n = 6; figuras 12A, 12B y 12C). De forma similar, la actividad epileptiforme de los animales inyectados de forma intracerebroventricular con LPS (200  $\mu$ g) no se alteró significativamente (Banda ancha =  $140.9 \pm 16.7$  % de 4AP,  $p > 0.1$ ; Delta =  $144.4 \pm 34.0$  % de 4AP,  $p > 0.1$ ; Theta =  $200.8 \pm 39.9$  % de 4AP,  $p > 0.1$ ; Beta =  $143.2 \pm 16.7$  % de 4AP,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $129.8 \pm 20.9$  % de 4AP,  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis; n = 6; figuras 12A, 12B y 12C), con respecto a la actividad epileptiforme previa a la inyección y a los animales inyectados con vehículo.

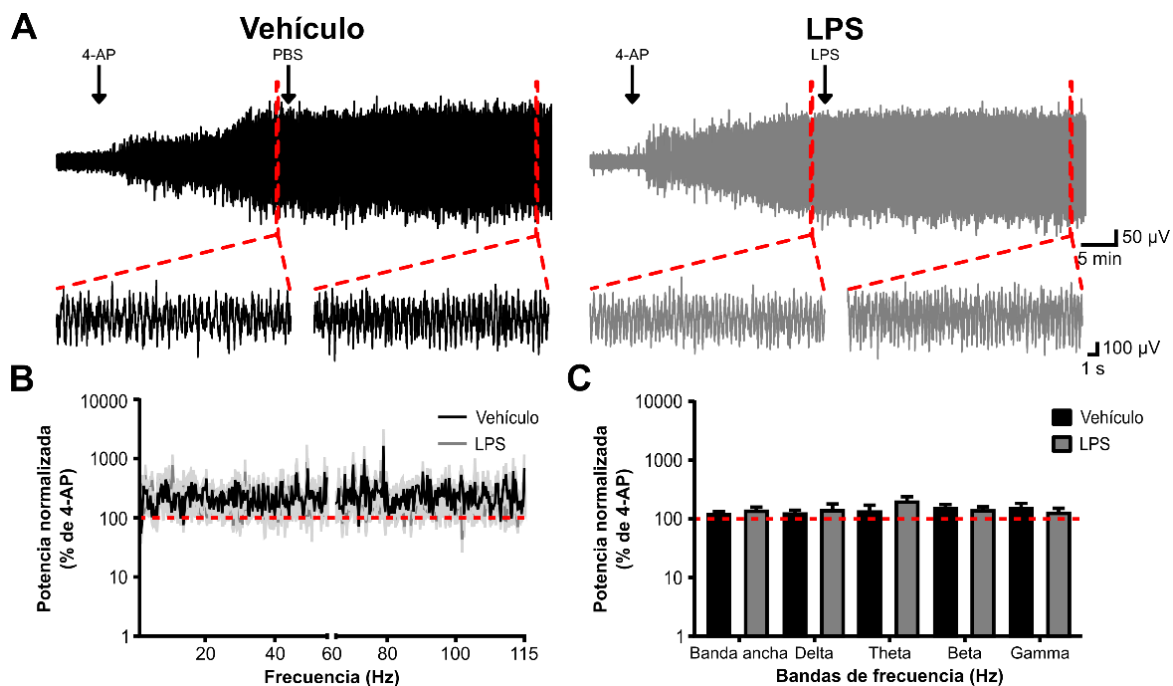


Figura 12. Efecto de la administración intracerebroventricular de LPS o de su vehículo (PBS) sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal y posterior a la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.), seguido de la administración de LPS (200  $\mu$ g) o de su vehículo. Las flechas indican el inicio de la aplicación de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y de LPS (200  $\mu$ g) o de su vehículo. Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad epileptiforme hipocámpal delimitada por la línea roja punteada, en condiciones previas a la



administración de LPS (200  $\mu$ g) o de su vehículo (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de LPS (200  $\mu$ g) o de su vehículo (trazo de la derecha) B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% de 4-AP) de la actividad epileptiforme después de la administración de LPS (n = 6) o de su vehículo (n = 6). La línea roja punteada representa la actividad epileptiforme previa a la administración de LPS o de su vehículo (100 % de 4-AP). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% de 4-AP) de la actividad epileptiforme después de la administración de LPS (200  $\mu$ g) o de su vehículo en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad epileptiforme previa a la administración de LPS (200  $\mu$ g) o de su vehículo (100 % de 4-AP) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la administración de LPS o de su vehículo, no altera la hiperexcitabilidad hipocampal ya inducida con 4-AP. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Inesperadamente, la administración de una dosis alta de LPS (200  $\mu$ g) no mostró efectos sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Con base en lo anterior, decidimos utilizar estrategias experimentales de manipulación celular específica, como la optogenética y la quimiogenética, con el objetivo de examinar los efectos de la manipulación selectiva de la microglía sobre la excitabilidad hipocampal, así como en la inducción experimental de hiperexcitabilidad.

## **Manipulación optogenética en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2.**

Con el objetivo de evaluar el efecto de la manipulación selectiva de la microglía sobre la excitabilidad hipocampal y la actividad epileptiforme, se llevaron a cabo experimentos utilizando animales de la cepa Cx3cr1/ChR2, que debieran expresar de forma constitutiva la proteína ChR2 en la microglía y que, al ser estimulada con luz azul, permitiría la activación proinflamatoria de estas células (Pardo-Peña et al., 2018b; Laprell et al., 2021; Yi et al., 2021b).

### **La manipulación optogenética en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 incrementa la actividad electrofisiológica hipocampal.**

A través de una fibra óptica colocada sobre el área CA1 del hipocampo (figura 2A), en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2, se aplicó un pulso de luz azul continua durante 20 minutos y se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica del hipocampo contralateral al sitio de estimulación, durante 20-30 minutos (figura 13A). La expresión de la proteína ChR2 no modificó la actividad electrofisiológica basal del hipocampo (Anexo 3 y figura 13A), sugiriendo que la capacidad del hipocampo para generar actividad oscilatoria se encuentra íntegra en los animales de la cepa Cxcr1/ChR2, con respecto a los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre. Durante la estimulación con luz azul, se observó un incremento de la actividad electrofisiológica hipocampal y la aparición de actividad epileptiforme en los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2, caracterizada por espigas paroxísticas de alto voltaje y recurrencia, que persistió durante 20-30 minutos después de la estimulación con luz azul (figura 13A). En un grupo separado de animales de la cepa Cx3cr1/ChR2, este efecto mostró ser dependiente de la duración del estímulo optogenético, observándose que 1 minuto de estimulación optogenética no es capaz de inducir alteraciones sobre la actividad electrofisiológica hipocampal, mientras que a partir de 5 minutos de estimulación optogenética se puede observar un incremento de la actividad electrofisiológica hipocampal y la aparición de actividad epileptiforme (Anexo 1). En animales de la cepa control Cx3cr1/Cre, el análisis de la potencia de la actividad electrográfica posterior a la estimulación con luz azul durante 20 minutos no mostró cambios en ninguna de las

bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $112.6 \pm 15.6$  % del basal; Delta =  $127.6 \pm 32.1$  % del basal; Theta =  $120.7 \pm 11.1$  % del basal; Beta =  $124.7 \pm 20.6$  % del basal; Gamma =  $142.9 \pm 29.1$  % del basal;  $n = 7$ ; figuras 13B y 13C). Sin embargo, en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 estimulados con luz azul durante 20 minutos, se observó un aumento estadísticamente significativo de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $1849.0 \pm 634.5$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Delta =  $3226.0 \pm 1040.0$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Theta =  $875.6 \pm 205.2$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Beta =  $930.5 \pm 353.9$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Gamma =  $530.3 \pm 188.5$  % del basal,  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $n = 7$ ; figuras 13B y 13C), comparados con la cepa control Cx3cr1/Cre.

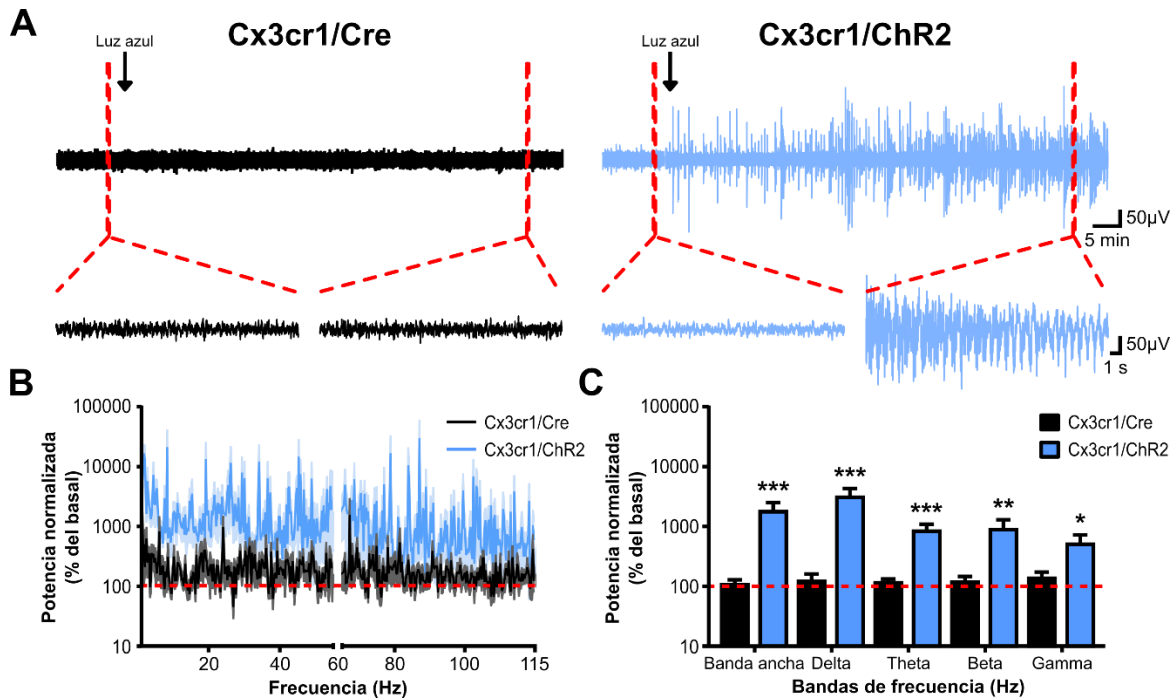


Figura 13. Efecto de la manipulación optogenética sobre la actividad electrofisiológica del hipocampo de animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal y posterior a la estimulación con luz azul durante 20 minutos, en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2. Las flechas indican el inicio de la aplicación de la estimulación con luz azul. Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la estimulación con luz azul (trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica del

hipocampo después de la estimulación con luz azul en animales de las cepas Cx3cr1/Cre (n = 7) y Cx3cr1/ChR2 (n = 7). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica hipocampal después de la estimulación con luz azul en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la estimulación con luz azul indujo un incremento en la amplitud de la actividad electrofisiológica hipocampal en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2. \*, \*\* y \*\*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

### **La manipulación optogenética en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 exacerba la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP.**

Con el objetivo de investigar el efecto de la manipulación optogenética en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 sobre la inducción de actividad epileptiforme; a un grupo separado de animales se le estimuló con luz azul en el hipocampo, durante 20 minutos, seguido de la administración intraperitoneal del fármaco convulsivante 4-AP (20 mg/kg) y se observaron sus efectos durante 30-40 minutos sobre la actividad electrofisiológica del hipocampo contralateral al sitio de estimulación (figura 14A). La administración de 4AP en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2 produjo actividad epileptiforme en el hipocampo (figura 14A), caracterizada por un aumento sustancial de la amplitud de la actividad electrofisiológica y por la presencia de espigas paroxísticas, similar a la actividad epileptiforme mencionada con anterioridad (figuras 11A y 12A). En animales de la cepa control Cx3cr1/Cre, el análisis de la potencia de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP mostró un incremento en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $963.0 \pm 286.8$  % del basal; Delta =  $1043.0 \pm 455.9$  % del basal; Theta =  $895.3 \pm 185.8$  % del basal; Beta =  $2618.0 \pm 1412.0$  % del basal; Gamma =  $1064.0 \pm 330.1$  % del basal; n = 7; figuras 14B y 14C). Sin embargo, en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2, se observó un incremento estadísticamente significativo de la potencia de la actividad epileptiforme en todas las bandas de frecuencia (Banda ancha =  $6245.3 \pm 1599.4$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Delta =  $7336.7 \pm 2661.3$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Theta =  $8386.6$

$\pm 2470.8$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Beta =  $5862.3 \pm 1839.9$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Gamma =  $5938.9 \pm 2229.2$  % del basal,  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $n = 7$ ; figuras 14B y 14C), comparados con animales de la cepa control Cx3cr1/Cre.

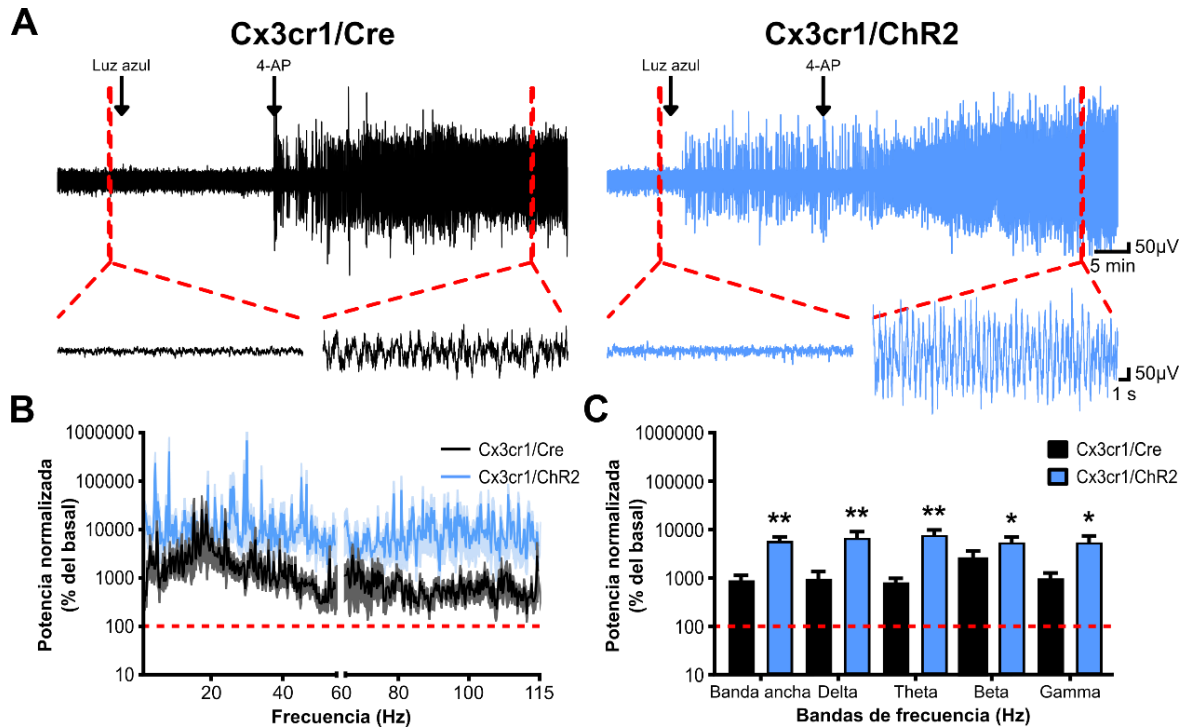


Figura 14. Efecto de la manipulación optogénica sobre la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal, durante la estimulación con luz azul y posterior a la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.), en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2. Las flechas indican el inicio de la aplicación de la estimulación con luz azul y de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de 4-AP (trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocámpal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $n = 7$ ) y Cx3cr1/ChR2 ( $n = 7$ ) estimulados con luz azul durante 20 minutos. La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocámpal en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la estimulación con luz azul exacerbó la inducción de hiperexcitabilidad en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2. \* y \*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ ,

respectivamente. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

### **La manipulación optogenética en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 potencia la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP.**

Para examinar el efecto de la manipulación selectiva de la microglía sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.), en grupos independientes de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2, se estimuló con luz azul por 20 minutos durante la actividad epileptiforme inducida con 4-AP (figura 15A). El análisis de la potencia de la actividad epileptiforme previa a la estimulación con luz azul no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas entre animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2 (Anexo 3). 20-30 minutos después de la estimulación con luz azul, la actividad epileptiforme de los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre no mostró alteraciones significativas con respecto a la actividad epileptiforme previa a la estimulación con luz en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $91.1 \pm 6.0$  % de 4-AP; Delta =  $77.9 \pm 8.3$  % de 4-AP; Theta =  $155.1 \pm 39.0$  % de 4-AP; Beta =  $131.5 \pm 16.9$  % de 4-AP; Gamma =  $176.1 \pm 52.6$  % de 4-AP; n = 6; figuras 15B y 15C). Sin embargo, la actividad epileptiforme de los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 exhibió un incremento sustancial de la potencia después de la estimulación con luz azul en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $338.8 \pm 96.6$  % de 4-AP,  $p < 0.01$ ; Delta =  $378.1 \pm 104.5$  % de 4-AP,  $p < 0.01$ ; Theta =  $626.6 \pm 251.8$  % de 4-AP,  $p < 0.05$ ; Beta =  $1220.0 \pm 772.8$  % de 4-AP,  $p < 0.05$ ; Gamma =  $1148.0 \pm 714.7$  % de 4-AP,  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis; n = 6; figuras 15B y 15C), con respecto a la cepa control Cx3cr1/Cre.

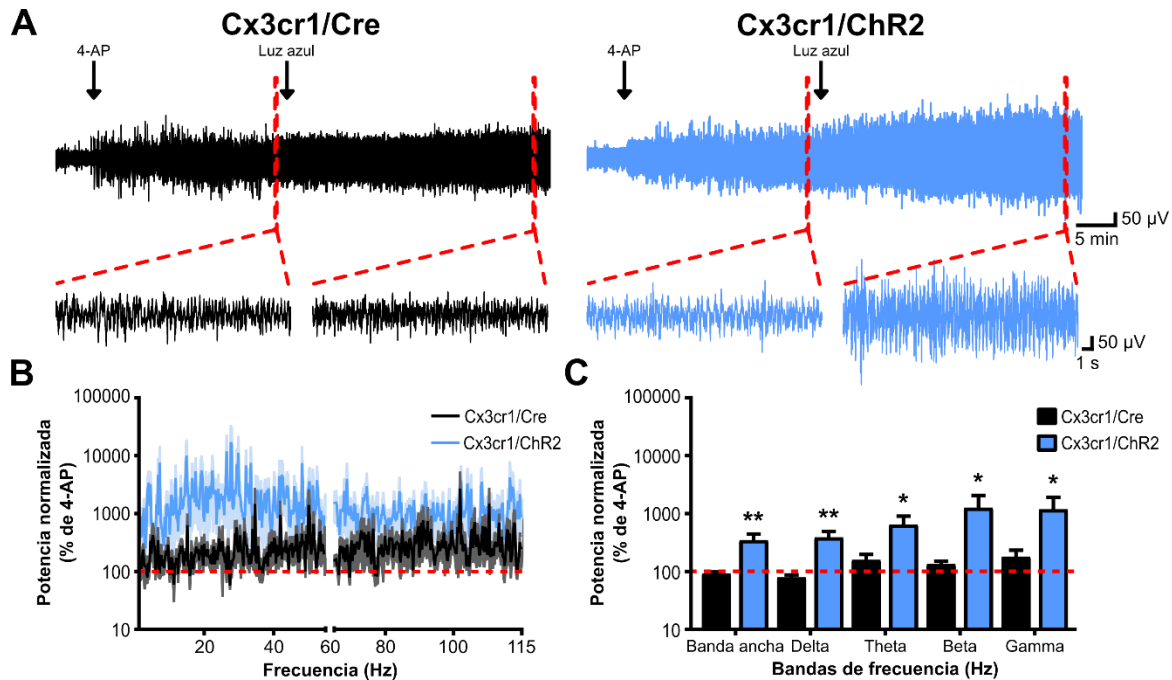


Figura 15. Efecto de la manipulación optogenética sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal y posterior a la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.), seguido de la estimulación con luz durante 20 minutos, en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2. Las flechas indican el inicio de la aplicación de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y de la estimulación con luz azul. Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad epileptiforme hipocámpal delimitada por la línea roja punteada, en condiciones previas a la estimulación con luz azul (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la estimulación con luz azul (trazo de la derecha) B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% de 4-AP) de la actividad epileptiforme después de la estimulación con luz azul en animales de las cepas Cx3cr1/Cre (n = 6) y Cx3cr1/ChR2 (n = 6). La línea roja punteada representa la actividad epileptiforme previa a la estimulación con luz azul (100 % de 4-AP). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% de 4-AP) de la actividad epileptiforme después de la estimulación con luz azul en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad epileptiforme previa a la estimulación con luz azul (100 % de 4-AP) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la estimulación con luz azul potencia la hiperexcitabilidad hipocámpal ya inducida con 4-AP en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2. \* y \*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

**La manipulación optogenética en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 incrementa la densidad microglial en el hipocampo e induce cambios morfológicos en estas células.**

Con la finalidad de investigar el efecto de la manipulación selectiva de la microglía con optogenética sobre la densidad microglial y la morfología de estas células en el hipocampo, animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 y de la cepa control Cx3cr1/Cre fueron estimulados con luz azul por 20 minutos y 60 minutos después se fijó el tejido cerebral para su análisis posterior. Después, mediante inmunofluorescencia, las células de la microglía fueron marcadas con el anticuerpo anti-Iba1, que es un marcador microglial utilizado ampliamente en la literatura (Ito et al., 1998; Lorea-Hernández et al., 2016) y con DAPI, como marcador nuclear (Kapuscinski, 1995) (figura 16A). En el *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo de animales de la cepa control Cx3cr1/Cre previamente estimulados con luz azul se observó una densidad microglial de  $318.5 \pm 33.2$  células/mm<sup>2</sup> (n = 9 muestras de 3 animales; figura 16B). Las células microgliales de la cepa control Cx3cr1/Cre mostraron una morfología ramificada (figura 16A), observándose un área de  $2.8 \pm 0.1$  mm<sup>2</sup> (n = 82 células),  $40.2 \pm 2.6$  ramificaciones secundarias (n = 82 células) y un índice de circularidad de  $5 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-3}$  (n = 82 células; figuras 16C, 16D y 16E). Por otra parte, en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 previamente estimulados con luz azul se observó un aumento sustancial de la densidad microglial ( $614.0 \pm 76.0$  células/mm<sup>2</sup>; p<0.01; prueba t de Student; n = 9 muestras de 3 animales; figura 16B), así como una disminución del área microglial ( $1.7 \pm 0.9$  mm<sup>2</sup>; n = 178 células; p<0.01; prueba de Mann-Whitney; figuras 16A y 16C) y del número de ramificaciones secundarias ( $15.6 \pm 0.8$  ramificaciones; n = 178 células; p<0.001; prueba de Mann-Whitney; figuras 16A y 16C), en comparación con la cepa control Cx3cr1/Cre. Además, se observó un aumento en el índice de circularidad microglial ( $0.2 \pm 1 \times 10^{-2}$  circularidad; n = 178 células; p<0.01; prueba de Mann-Whitney; figuras 16A y 16E), en comparación con los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre. Finalmente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la densidad de núcleos celulares marcados con DAPI entre animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $1514.1 \pm 55.0$  núcleos/mm<sup>2</sup>; n = 7 muestras de 3 animales; figura 16F)



y Cx3cr1/ChR2 ( $1417.9 \pm 110.3$  núcleos/mm<sup>2</sup>; n = 7 muestras de 3 animales; p>0.1; prueba t de Student; figura 16F) previamente estimulados con luz azul, sugiriendo que la estimulación optogenética no influyó en la proliferación celular. En conjunto, estos resultados indican que la estimulación optogenética en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 aumenta la densidad microglial, posiblemente a través de la inducción de la migración y/o división de estas células, e induce alteraciones morfológicas en la microglía hipocampal que involucran un cambio estructural hacia una morfología ameboide.

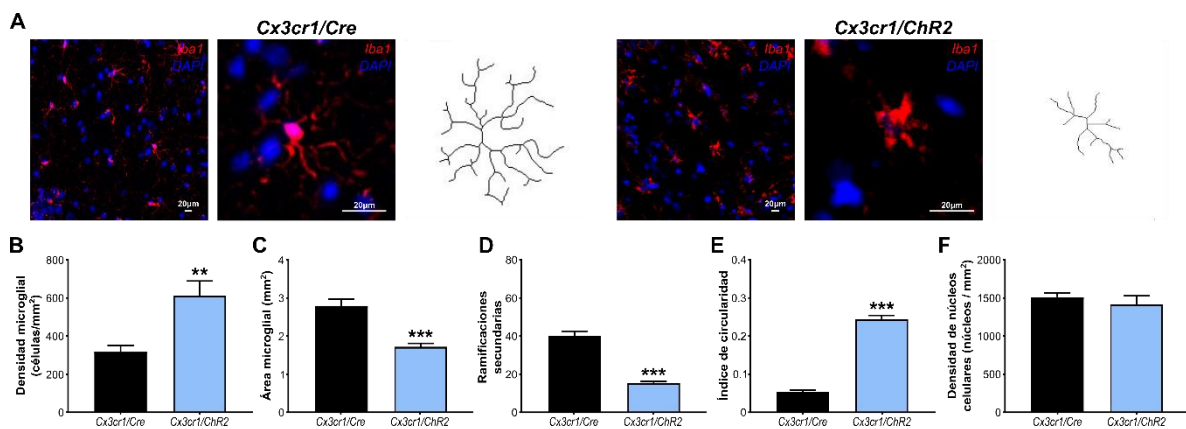


Figura 16. Efecto de la estimulación optogenética sobre la densidad microglial en el hipocampo y la morfología de estas células en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2. A. Micrografías de la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 y de DAPI, en el *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo de animales la cepa Cx3cr1/ChR2 (n = 178 células de 9 muestras de 3 animales) y de la cepa control Cx3cr1/Cre (n = 82 células de 9 muestras de 3 animales). Adicionalmente se muestra una célula microglial marcada con Iba1 y con DAPI (centro) y el análisis de su esqueleto (derecha). Cuantificación de la densidad microglial (B), el área microglial (C), el número de ramificaciones secundarias (D), índice de circularidad (E) y la densidad de núcleos celulares (F). Nótese que la estimulación optogenética incrementó la densidad microglial en el hipocampo y alteró la morfología microglial, disminuyendo su área y procesos, pero aumentando su circularidad. Las comparaciones estadísticas de la densidad microglial y de la densidad de núcleos celulares se llevaron a cabo con la prueba t de Student, mientras que las comparaciones estadísticas del área microglial, del número de ramificaciones secundarias y del índice de circularidad fueron hechas con la prueba de Mann-Whitney. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

**La proteína de fusión canalrodopsina 2 (ChR2)-proteína amarilla fluorescente aumentada (eYFP) se encuentra escasamente expresada en la microglía de animales de la cepa Cx3cr1/ChR2.**

Con el objetivo de caracterizar la expresión de la ChR2 en las células microgliales del hipocampo de animales de la cepa Cx3cr1/ChR2, mediante inmunofluorescencia, se marcaron las células de la microglía con el anticuerpo anti-Iba1 y se observó su colocalización con la fluorescencia de la proteína de fusión ChR2-eYFP en el *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo (figura 17A). Adicionalmente, se marcaron los núcleos celulares con DAPI (Kapuscinski, 1995) (figura 17A). La fluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 mostró cuerpos celulares microgliales con morfología ramificada, mientras que la fluorescencia de la proteína de fusión ChR2-eYFP se observó como *puncta* de fluorescencia (figura 17A). La cuantificación de la colocalización entre los *puncta* de fluorescencia de la proteína de fusión ChR2-eYFP con la fluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 mostró una proporción del 11.5 % de células microgliales que expresaron la proteína de fusión ChR2-eYFP (n = 9 rebanadas de 3 animales; figura 17B). En este mismo sentido, el 88.5 % de las células marcadas con Iba1 no expresaron la marca fluorescente de la proteína de fusión ChR2-eYFP. Por otro lado, se cuantificó la fluorescencia inespecífica de la proteína de fusión ChR2-eYFP y se observó que el 89.5 % de los *puncta* de fluorescencia de la proteína de fusión ChR2-eYFP no coincidió con la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1 (figura 17C). Esto sugiere que la proteína de fusión ChR2-eYFP se encuentra expresada en una baja proporción de células microgliales en el hipocampo de los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2.

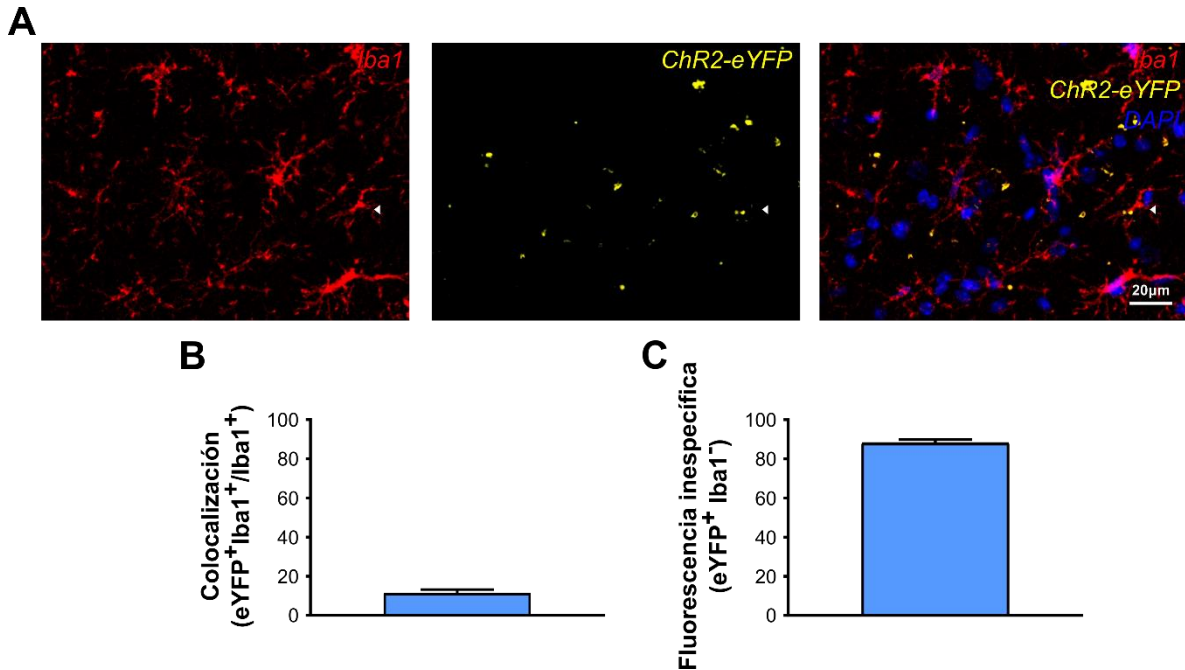


Figura 17. Caracterización de la expresión de la proteína de fusión canalrodopsina 2 (ChR2)-proteína amarilla fluorescente aumentada (eYFP) en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2. A. Micrografías de la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 (izquierda, rojo), de la proteína de fusión ChR2-eYFP (centro, amarillo) y de su combinación con DAPI (derecha, azul), en el *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo de un animal de la cepa Cx3cr1/ChR2. Las flechas blancas indican células positivas a Iba1 y a la proteína de fusión ChR2-eYFP. B. Proporción de células positivas a Iba1 que expresaron a la proteína de fusión ChR2-eYFP (n = 9 rebanadas de 3 animales). C. Proporción de *puncta* de fluorescencia de ChR2-eYFP que no coincidió con la fluorescencia del anticuerpo anti-Iba1. Nótese que los *puncta* de fluorescencia de la proteína de fusión ChR2-eYFP coinciden en una pequeña proporción de cuerpos celulares microgliales marcados con Iba1. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

### Las neuronas hipocampales de los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 responden a la estimulación optogenética.

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2, se decidió investigar si la proteína de fusión ChR2-eYFP pudiera estar expresada en las neuronas del hipocampo de los animales de esta cepa. Para ello, en un grupo separado de animales de la cepa Cx3cr1/ChR2, se registró la actividad multiunitaria hipocampal del área CA1 utilizando una *silicon probe* de 16 microelectrodos, mientras se estimuló con pulsos de luz a través de una fibra óptica colocada estereotáxicamente cerca de los electrodos de registro, en animales

anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 (figura 18A). Primero, debido a que la estimulación optogenética puede generar calor y que el calor incrementa la actividad neuronal (Arias-Gil et al., 2016; Peixoto et al., 2020), en el mismo grupo de animales, se registró la actividad multiunitaria hipocampal durante la estimulación optogenética del hipocampo con luz roja (10 s de duración de pulso; longitud de onda de ~625 nm; figura 18B), que no activa a la ChR2 (Deisseroth, 2011; 2015). La cuantificación de la tasa de disparo promedio de la actividad multiunitaria hipocampal no mostró diferencias estadísticamente significativas de la actividad neuronal durante la estimulación con luz roja ( $3.78 \pm 0.3$  Hz;  $p > 0.1$ ; prueba de Wilcoxon;  $n = 3$  ensayos de 3 animales; figuras 18B y 18C), comparado con la actividad basal previa a la estimulación optogenética ( $4.0 \pm 0.3$  Hz; figuras 18B y 18C). Por otro lado, al estimular con luz azul (10 s de duración del pulso; longitud de onda de ~480 nm; figuras 18D y 18E), la tasa de disparo promedio de la actividad multiunitaria hipocampal mostró un aumento sustancial de la actividad neuronal ( $13.5 \pm 2.6$  Hz,  $p < 0.001$ ; prueba de Wilcoxon;  $n = 12$  ensayos de 3 animales; figuras 18D y 18E), comparado con la actividad basal previa a la estimulación (basal,  $3.5 \pm 0.3$  Hz; figuras 18D y 18E). Para analizar más a fondo la posibilidad de la expresión de la proteína de fusión ChR2-eYFP en las neuronas hipocampales, en el mismo grupo de animales, se estimuló con un tren de pulsos de luz azul (5 pulsos) de 100 ms de duración a una frecuencia de 4 Hz (longitud de onda de ~470 nm;  $n = 3$  ensayos de 3 animales; figura 18F) y se observó que la actividad neuronal se encuentra acoplada a los estímulos optogenéticos, aumentando la tasa de disparo de la actividad multiunitaria hipocampal durante los pulsos de luz y disminuyendo inmediatamente su actividad al cesar el estímulo optogenético. Juntos, estos resultados muestran que la estimulación optogenética con luz azul incrementa la actividad neuronal en los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 y que este incremento de la actividad neuronal no es el resultado de un aumento de temperatura producido por la estimulación con luz, sugiriendo que la proteína de fusión ChR2-eYFP podría estar expresada en neuronas hipocampales.

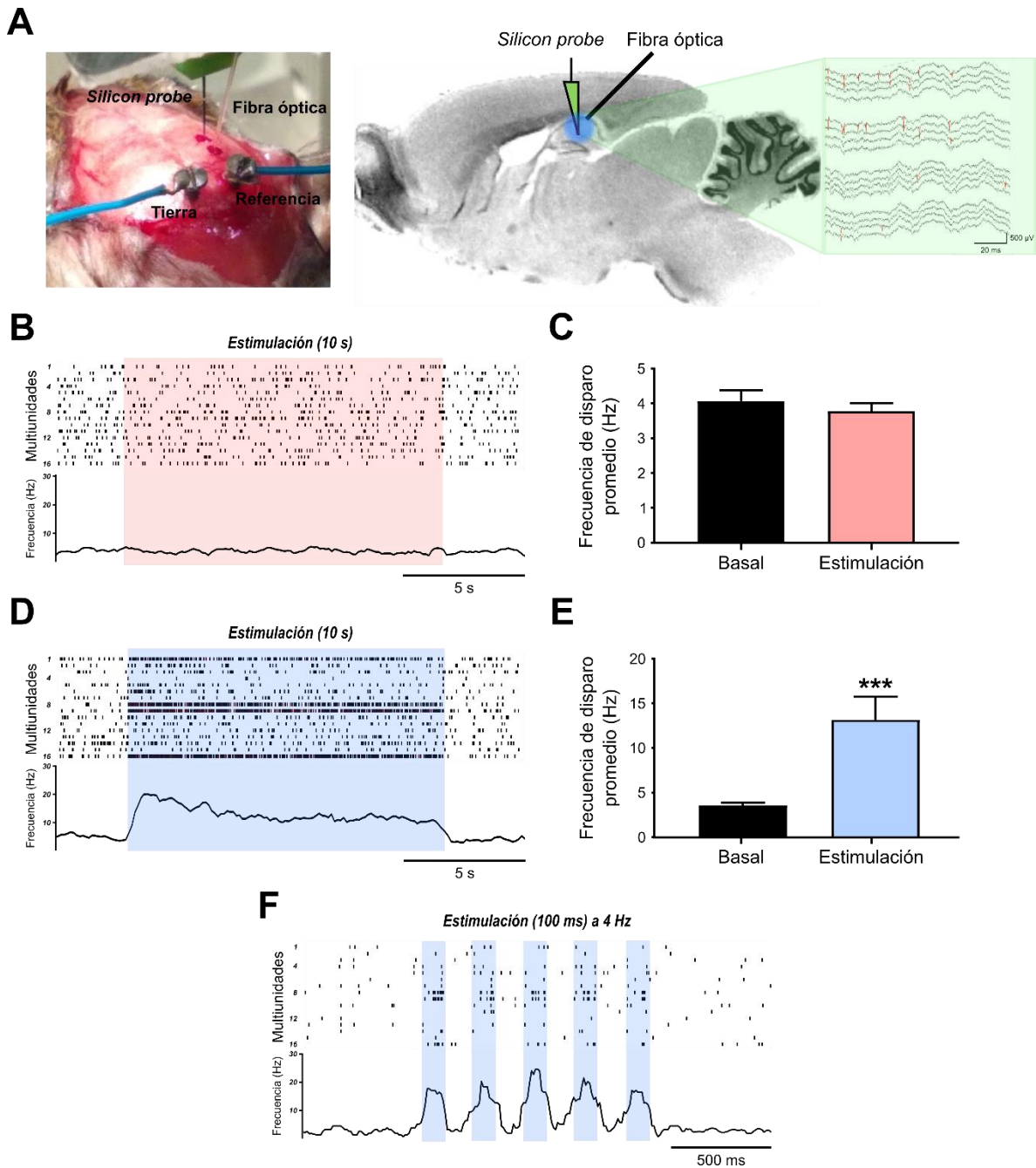


Figura 18. Registro de la actividad multiunitaria hipocámpal durante la estimulación optogenética en ratones anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2. A. Izquierda, fotografía de la preparación experimental, en donde se colocó de forma estereotáxica una *silicon probe* con un arreglo de 16 microelectrodos y una fibra óptica, ambos en la capa piramidal del área CA1 del hipocampo. Adicionalmente, se colocaron dos tornillos sobre el cerebelo que fueron usados como tierra y referencia, respectivamente. Derecha, esquema representativo de la preparación experimental en donde se puede apreciar el registro de la actividad multiunitaria hipocámpal y las trayectorias estereotáxicas del arreglo de microelectrodos y de la fibra óptica, utilizados para el registro de la actividad

multiunitaria y para la estimulación optogenética, respectivamente. B. *Raster plot* de la actividad multiunitaria hipocampal antes, durante y después de la estimulación optogenética con luz roja (10 s de duración del pulso; longitud de onda de ~625 nm). Debajo se observa la frecuencia de disparo promedio (Hz) de la actividad multiunitaria a lo largo del trazo. C. Cuantificación de la frecuencia de disparo promedio de la actividad multiunitaria hipocampal en el periodo basal previo a la estimulación y durante la estimulación optogenética con luz roja (n = 3 ensayos de 3 animales). Nótese que la actividad neuronal del hipocampo no se altera durante la estimulación optogenética con luz roja. D. *Raster plot* de la actividad multiunitaria hipocampal antes, durante y después de la estimulación optogenética con luz azul (10 s de duración del pulso; longitud de onda de ~470 nm). Debajo se observa la frecuencia de disparo promedio (Hz) de la actividad multiunitaria a lo largo del trazo. E. Cuantificación de la frecuencia de disparo promedio de la actividad multiunitaria hipocampal en el periodo basal previo a la estimulación y durante la estimulación optogenética con luz azul (n = 12 ensayos de 3 animales). Nótese que la estimulación optogenética con luz azul produce un aumento sustancial de la frecuencia de disparo de las neuronas hipocampales. F. *Raster plot* de la actividad multiunitaria hipocampal, antes, durante y después de la estimulación optogenética con pulsos de luz azul a una frecuencia de 4 Hz (5 pulsos con 100 ms de duración). Debajo se observa la frecuencia de disparo promedio (Hz) de la actividad multiunitaria a lo largo del trazo (n = 3 ensayos de 3 animales). Nótese que la actividad neuronal hipocampal aumenta sólo durante la estimulación con luz azul y que disminuye inmediatamente después de cesar la estimulación. \*\*\* denota una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con  $p < 0.001$ . Los cambios en la tasa de disparo de la actividad multiunitaria hipocampal fueron comparados con la prueba de Wilcoxon. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

### **La proteína ChR2 es expresada de forma constitutiva en animales de la cepa Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP).**

Con la finalidad de ahondar más en la expresión inespecífica de la proteína de fusión ChR2-eYFP observada en los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2, se hipotetizó que dicha inespecificidad podría deberse a la expresión constitutiva de la proteína de fusión ChR2-eYFP en los animales de las cepas progenitoras, específicamente en los animales de la cepa Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP), que expresan la secuencia genética invertida de la proteína de fusión ChR2-eYFP flanqueada por sitios lox-P. Para ello, mediante inmunofluorescencia, se observó la expresión de la proteína ChR2 en el hipocampo de animales de la cepa Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP) (n = 6 rebanadas de 3 animales; figura 19). Se observó que la marca fluorescente del anticuerpo anti-ChR2 se expresa de forma ubicua en el hipocampo de los ratones Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP), principalmente en el *stratum*

*radiatum* y el *stratum lacunosum-moleculare* (figura 19). Por otra parte, la marca fluorescente del anticuerpo anti-ChR2 parece estar expresada de forma inespecífica en cuerpos celulares, debido a que los cúmulos de fluorescencia asemejan somas (figura 19).

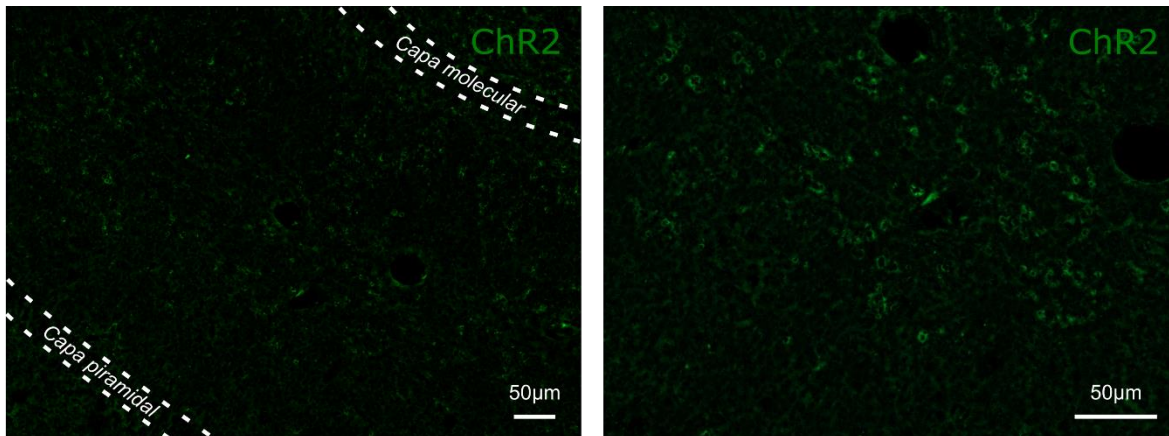


Figura 19. Caracterización de la expresión de la proteína ChR2 en el área CA1 del hipocampo de ratones de la cepa Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP). Izquierda, micrografía de la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-ChR2 en el *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum-moleculare* del área CA1 del hipocampo (n = 6 rebanadas de 3 animales). Nótese que la fluorescencia del anticuerpo anti-ChR2 se encuentra distribuida de forma ubicua en el hipocampo. Derecha, magnificación de la micrografía de la izquierda, en donde se observa la fluorescencia del anticuerpo anti-ChR2 en el *stratum radiatum* del hipocampo. Nótese que se observan cúmulos de fluorescencia que asemejan somas.

Estos resultados indican que la proteína de fusión ChR2-eYFP se expresa de forma constitutiva e inespecífica en los animales de la cepa progenitora Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP), sugiriendo que la inespecificidad observada en la expresión de la proteína de fusión ChR2-eYFP de los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 podría deberse a la utilización de los animales de la cepa progenitora Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP). Estos resultados resaltan la importancia de la caracterización de los animales transgénicos utilizados en los experimentos, pues la expresión del transgén o transgenes insertados podría no ser específica, como se observó en nuestros resultados con la cepa Cx3cr1/ChR2, así como por otros estudios en otros contextos experimentales (Hedrick & Waters, 2015; Hedrick et al., 2016; Prabhakar et al., 2019; Luo et al, 2020). Lo anterior, despoja de su

especificidad celular a estrategias experimentales como la optogenética, en condiciones experimentales como las nuestras, originando resultados complejos de interpretación difícil.



## **Manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales**

Con el objetivo de evaluar el efecto de la manipulación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y sobre la inducción de la hiperexcitabilidad y de la hiperexcitabilidad ya inducida, se llevaron a cabo experimentos utilizando animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/hM3Dq y Cx3cr1/hM4Di, las cuales expresan a los DREADDs hM3Dq y hM4Di en la microglía y en los macrófagos no parenquimales, respectivamente.

### **Activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales.**

Con la finalidad de evaluar el efecto de la manipulación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y sobre la inducción de la hiperexcitabilidad y de la hiperexcitabilidad ya inducida, se llevaron a cabo experimentos utilizando animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/hM3Dq, que expresan los DREADDs hM3Dq en la microglía.

### ***Los receptores diseñados para responder exclusivamente a fármacos diseñados (DREADDs) hM3Dq están expresados exclusivamente en los macrófagos cerebrales de animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.***

Debido a la inespecificidad celular de la expresión de la ChR2 observada anteriormente en los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2, en esta serie de experimentos, primero se caracterizó la expresión del DREADD hM3Dq en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. Mediante inmunofluorescencia, se observó la expresión de la proteína fluorescente mCitrina, expresada de forma constitutiva en las células que expresan los DREADDs. Adicionalmente, la marca fluorescente de la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina se colocó con la fluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 y con DAPI. En muestras histológicas del área CA1 del hipocampo de animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq (n = 12 rebanadas de 4 animales), la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1 evidenció la presencia de células microgliales con morfología ramificada (figura 20A), mientras que la marca fluorescente de la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina se observó como *puncta* de

fluorescencia (figura 20A). Se observó que la marca fluorescente de la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina colocalizó con la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 en el  $73.9 \pm 4.9$  % de las células positivas a Iba1 (flechas blancas, figuras 20A y 20B). Adicionalmente, se observó que el  $26.0 \pm 4.9$  % de las células positivas a Iba1 no colocalizaron con la marca fluorescente de la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina (figura 20A). Es importante resaltar que no se observó marca fluorescente de la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina que no coincidiera con la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1 (figura 20A), sugiriendo que el DREADD hM3Dq se expresó exclusivamente en la microglía, así como en macrófagos no parenquimales de los espacios perivascuales (anexo 4A), debido a que también expresan el gen *Cx3cr1* (Goldman et al., 2016; Shemer et al., 2018; Van Hove et al., 2019). Lo anterior, sugiere que los DREADDs hM3Dq también podrían estar expresados en los macrófagos no parenquimales de las meninges o de los plexos coroideos, que también expresan el gen *Cx3cr1* (Utz & Greter, 2019), sin embargo, no se verificó su expresión en estas zonas. Adicionalmente, para corroborar que la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina colocalizara con las células marcadas con Iba1, se adquirió un bloque imágenes a diferentes profundidades utilizando un microscopio confocal, abarcando la totalidad del soma de la célula observada (n = 3 células; figura 20C). Las imágenes mostraron que la fluorescencia de la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina colocaliza con la fluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 en el soma de la célula marcada (figura 20C).

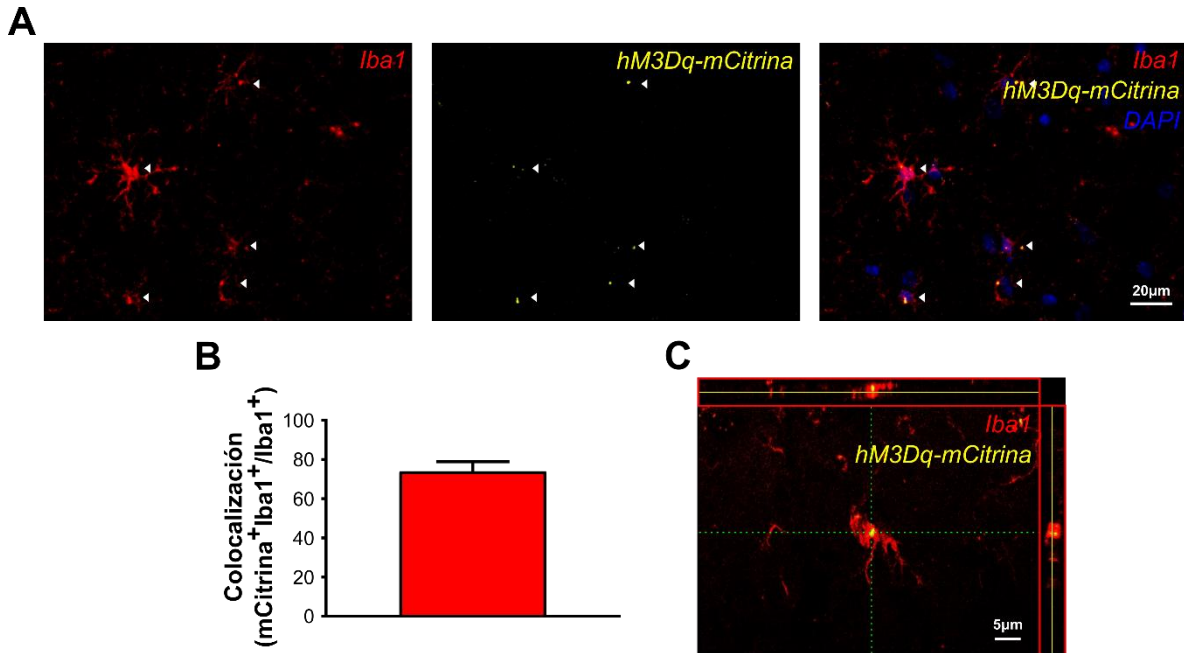


Figura 20. Caracterización de la expresión de la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. A. Micrografías de la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 (izquierda, rojo), de la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina (centro, amarillo) y de su combinación con DAPI (derecha, azul), en el *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo de un animal de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. Las flechas blancas indican células positivas a Iba1 y a la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina. Nótese que la fluorescencia de la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina se observó como *puncta* de fluorescencia y que colocaliza con la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1. B. Proporción de células positivas a Iba1 que expresaron a la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina (n = 12 rebanadas de 4 animales). C. Z-stack de una célula marcada con el anticuerpo anti-Iba1 y con la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina (n = 3 células). Obsérvese que la marca fluorescente de la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina colocaliza con la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1 en el soma de la célula observada.

***La activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales aumenta la excitabilidad hipocampal e induce actividad epileptiforme en animales anestesiados.***

Una vez establecido que la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina se encuentra expresada exclusivamente en la microglía y en los macrófagos no parenquimales de los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, se caracterizó la influencia de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal. A través de una cánula colocada

estereotáxicamente en el ventrículo lateral (figura 4C), se administró CNO (10  $\mu$ g) de forma intracerebroventricular en animales anestesiados de las cepas *Cx3cr1/Cre* y *Cx3cr1/hM3Dq* y se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal durante 20-30 minutos (figura 21A). La expresión constitutiva de la proteína hM3Dq, bajo el control del gen *Cx3cr1*, no modificó la actividad electrofisiológica basal del hipocampo (Anexo 6 y figura 21A), sugiriendo que la capacidad del hipocampo para generar actividad electrofisiológica oscilatoria se encuentra íntegra en los animales de la cepa *Cxcr1/hM3Dq*, con respecto a los animales de la cepa control *Cx3cr1/Cre*. La administración de CNO (10  $\mu$ g) no produjo alteraciones significativas en la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales de la cepa control *Cx3cr1/Cre*, en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $130.7 \pm 21.7$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $119.1 \pm 25.9$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta =  $149.1 \pm 26.3$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $138.5 \pm 33.3$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $136.7 \pm 20.4$  % del basal,  $p > 0.1$ ; prueba de Friedman;  $n = 6$ ; figuras 21A, 21B y 21C), con respecto a la actividad basal previa a la administración de CNO (10  $\mu$ g). Sin embargo, en los animales de la cepa *Cx3cr1/hM3Dq*, la administración de CNO (10  $\mu$ g) aumentó gradualmente la amplitud de la actividad electrográfica hipocampal a lo largo del tiempo (figura 21A), observándose un incremento sustancial de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $10170.7 \pm 4282.5$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Delta =  $12478.2 \pm 5308.7$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Theta =  $12195.0 \pm 7043.1$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Beta =  $6838.3 \pm 1562.7$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Gamma =  $8038.6 \pm 2547.7$  % del basal,  $p < 0.01$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $n = 6$ ; figuras 21B y 21C), con respecto a la cepa control *Cx3cr1/Cre*.

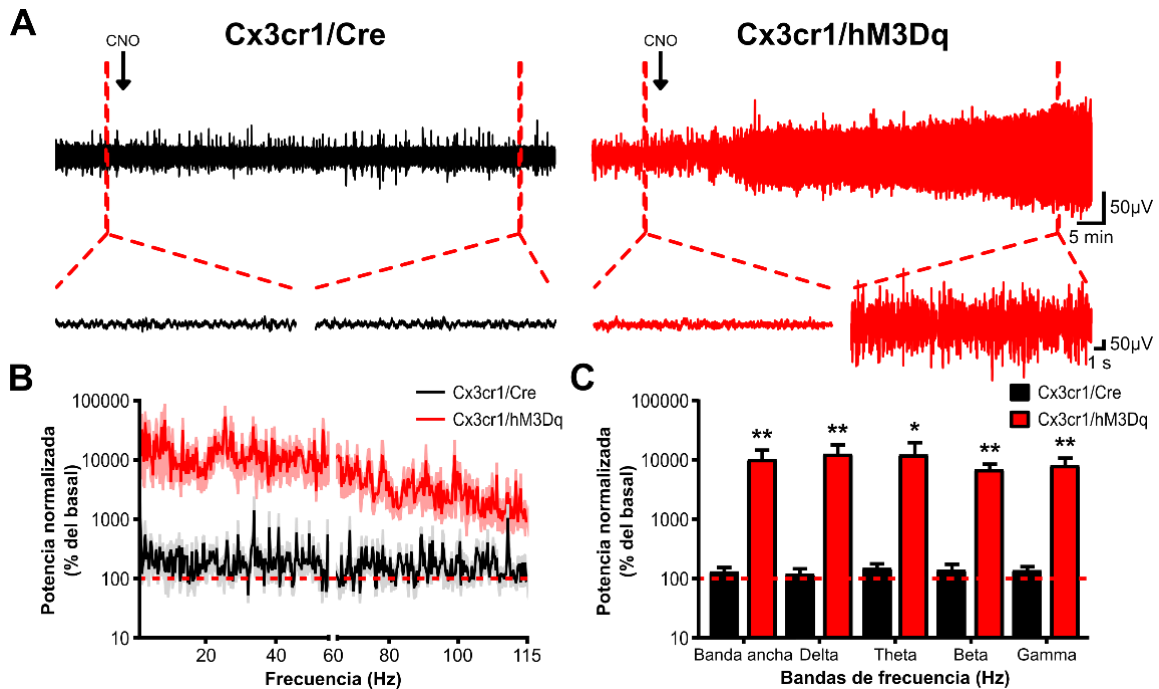


Figura 21. Efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la actividad electrofisiológica hipocámpal de animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. A. Trazos representativos de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal y después de la administración intracerebroventricular de clozapina-N-óxido (CNO; 10 µg) en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica hipocámpal después de la administración de CNO (10 µg) en animales de las cepas Cx3cr1/Cre (n = 6) y Cx3cr1/hM3Dq (n = 6). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica del hipocampo en las bandas de frecuencia de 1-115 Hz (Banda ancha), 1-4 Hz (Delta), 4-10 Hz (Theta), 10-30 Hz (Beta) y 30-115 Hz (Gamma). Nótese que la administración de CNO (10 µg) produce un aumento significativo de la excitabilidad hipocámpal en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. \* y \*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente, comparado contra la cepa control Cx3cr1/Cre. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

En un subgrupo de animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, después de la aplicación intracerebroventricular de CNO (10 µg) se observó el desarrollo de actividad epileptiforme en el hipocampo (figura 22A), caracterizada por espigas de gran amplitud y recurrencia (figura 22B). Se observó que el 66.6 % de los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq que fueron administrados con CNO (10 µg) desarrollaron

actividad epileptiforme (4/6 animales; figura 22C), el restante 33.6 % sólo mostró un aumento de la amplitud de la actividad electrofisiológica de fondo (2/6 animales; figura 22C). En animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq que fueron administrados con CNO a dosis menores de 10  $\mu\text{g}$ , sólo se observó un aumento de la amplitud de la actividad electrofisiológica hipocampal (anexo 4).

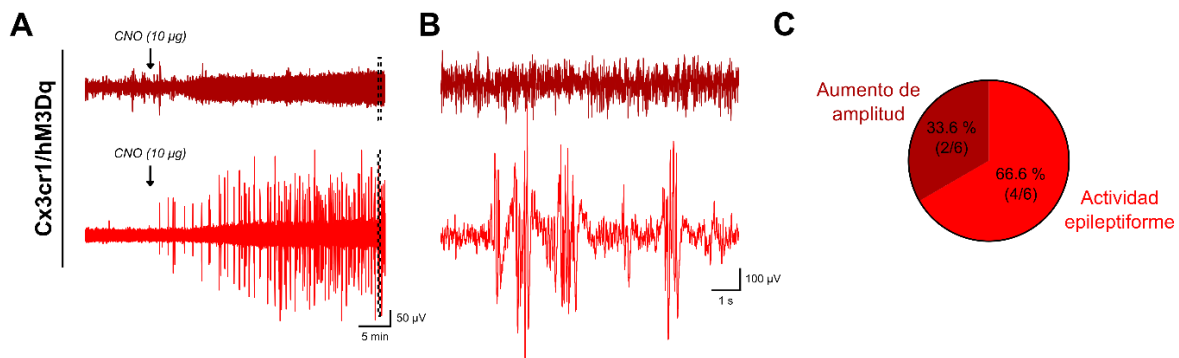


Figura 22. La administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu\text{g}$ ) en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq induce actividad epileptiforme en el hipocampo. A. Trazos representativos de la actividad electrofisiológica hipocampal antes y después de la administración intracerebroventricular de 10  $\mu\text{g}$  de CNO en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. Nótese que la aplicación de 10  $\mu\text{g}$  de CNO produce un aumento sustancial de la amplitud de la actividad electrográfica hipocampal (trazo de arriba), así como el desarrollo de actividad epileptiforme (trazo de abajo). B. Trazos expandidos de la actividad delimitada por las líneas punteadas en A. C. Proporción de animales que presentaron un incremento de la amplitud de la actividad electrográfica hipocampal o el desarrollo de actividad epileptiforme después de la aplicación de 10  $\mu\text{g}$  de CNO (n = 6).

Estos resultados muestran que la activación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, aumenta la excitabilidad del circuito hipocampal y que, incluso, es capaz de producir actividad epileptiforme.

***La activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales exacerba la inducción de hiperexcitabilidad hipocampal en animales anestesiados.***

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la activación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la inducción de hiperexcitabilidad hipocampal, animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq fueron

administrados intracerebroventricularmente con CNO (10  $\mu$ g), seguido de la administración del fármaco convulsivante 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Similar a lo observado anteriormente (figura 14), en un grupo independiente de animales, la administración sistémica de 4-AP (20 mg/kg) en animales anestesiados de la cepa control Cx3cr1/Cre, que fueron previamente inyectados con CNO (10  $\mu$ g), indujo actividad epileptiforme en el hipocampo, caracterizada por un aumento sustancial de la amplitud de la actividad electrográfica y por la presencia de espigas epileptiformes (figura 23A), lo que se reflejó en un aumento de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $2479.3 \pm 762.2$  % del basal; Delta =  $2867.1 \pm 1011.5$  % del basal; Theta =  $2016.6 \pm 411.5$  % del basal; Beta =  $2439.2 \pm 485.9$  % del basal; Gamma =  $1898.5 \pm 453.4$  % del basal; n = 12; figuras 23B y 23C). Por otro lado, la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq exacerbó la inducción de actividad epileptiforme con 4-AP (20 mg/kg, i.p.), observándose un aumento significativo de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $13027.1 \pm 2917.3$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Delta =  $8168.9 \pm 2648.1$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Theta =  $31272.8 \pm 23437.3$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Beta =  $18164.7 \pm 9551.1$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Gamma =  $12622.9 \pm 6530.2$  % del basal,  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis; n = 7; figuras 23B y 23C), en comparación con la cepa control Cx3cr1/Cre.

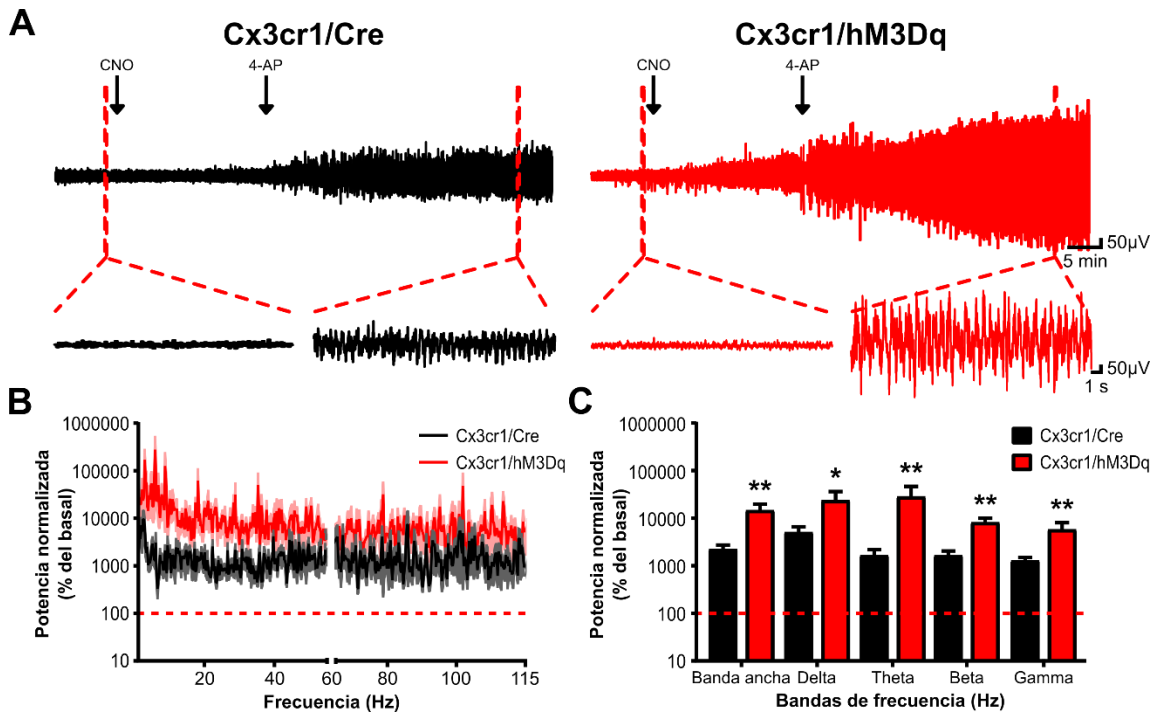


Figura 23. Efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la inducción de hiperexcitabilidad hipocampal con 4-AP en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocampal basal, durante la administración de CNO (10 µg) y posterior a la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.), en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. Las flechas indican el inicio de la administración intracerebroventricular de CNO (10 µg) y de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de 4-AP (trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocampal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre (n = 12) y Cx3cr1/hM3Dq (n = 7), previamente administrados con CNO. La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocampal en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la administración de CNO exacerba la inducción de hiperexcitabilidad hipocampal en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. \* y \*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.



Para examinar si el efecto proepileptiforme de la modulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, es generalizable a toda la actividad epileptiforme, se realizaron experimentos en donde se administró intracerebroventricularmente CNO (10 µg), seguido de la administración intraperitoneal del fármaco convulsivante PTZ (200 mg/kg; figura 24A). A diferencia de la hiperexcitabilidad inducida con 4AP (20 mg/kg, i.p; figuras 11, 14 y 23), la hiperexcitabilidad inducida con PTZ (200 mg/kg, i.p.) en animales anestesiados se caracterizó por la presencia de espigas epileptiformes de alto voltaje y por un incremento ligero de la amplitud de la actividad electrofisiológica de fondo (figura 24A). En los animales anestesiados de la cepa control Cx3cr1/Cre, previamente inyectados con CNO (10 µg), la administración de PTZ (200 mg/kg, i.p.) incrementó la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $1110.0 \pm 189.6$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Delta =  $2347.4 \pm 716.7$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Theta =  $1252.9 \pm 344.0$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Beta =  $787.3 \pm 197.0$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Gamma =  $1094.2 \pm 269.2$  % del basal,  $p < 0.05$ ; prueba de Friedman;  $n = 6$ ; figuras 24B y 24C), con respecto a la actividad basal previa a la administración de CNO (10 µg). Sin embargo, en los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, previamente inyectados con CNO (10 µg), la administración de PTZ (200 mg/kg, i.p.) produjo un incremento mayor de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $20928.5 \pm 15127.0$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Delta =  $26002.4 \pm 12605.0$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Theta =  $245015.7 \pm 18734.0$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Beta =  $19403.0 \pm 15875.8$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Gamma =  $4200.2 \pm 1852.6$  % del basal,  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $n = 6$ ; figuras 24B y 24C), comparados con la cepa control Cx3cr1/Cre.

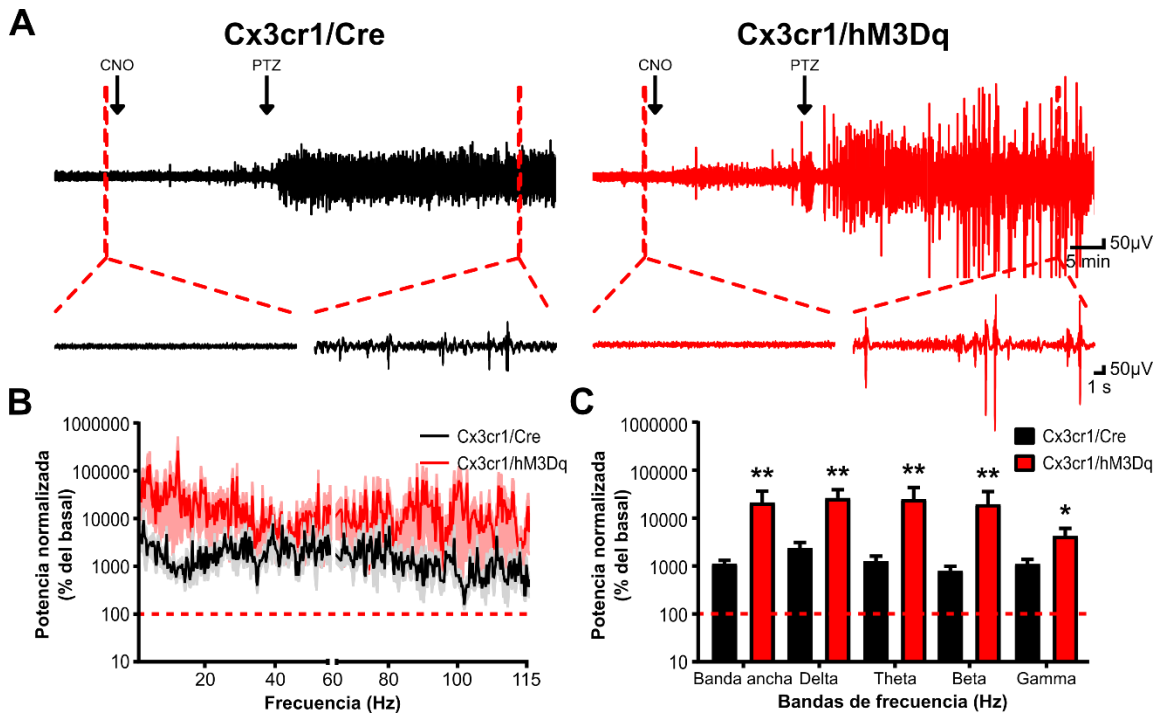


Figura 24. Efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la inducción de hiperexcitabilidad hipocámpal con pentilinetetrazol (PTZ) en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal, durante la administración de CNO (10 µg) y posterior a la administración de PTZ, en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. Las flechas indican el inicio de la administración intracerebroventricular de CNO y de la administración de PTZ. Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de PTZ (trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocámpal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre (n = 6) y Cx3cr1/hM3Dq (n = 6), previamente administrados con CNO. La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocámpal en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la administración de CNO exagera la inducción de hiperexcitabilidad hipocámpal en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. \* y \*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Estos resultados muestran que la manipulación selectiva de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, exacerba la inducción de hiperexcitabilidad, independientemente del mecanismo utilizado para inducirla.

***La activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales potencia la hiperexcitabilidad hipocampal ya establecida en animales anestesiados.***

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la activación selectiva de la microglía sobre la hiperexcitabilidad hipocampal ya establecida, se administró CNO (10 µg) de forma intracerebroventricular durante la actividad epileptiforme inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq y se observaron sus efectos durante 30 minutos (figura 25A). El análisis de la potencia de la actividad epileptiforme previa a la administración intracerebroventricular de CNO (10 µg) no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas entre animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq (Anexo 7). En los animales anestesiados de la cepa control Cx3cr1/Cre, la actividad epileptiforme no mostró cambios significativos tras la administración de CNO (10 µg; Banda ancha =  $132.0 \pm 14.6$  % de 4-AP,  $p > 0.1$ ; Delta =  $138.0 \pm 17.4$  % de 4-AP  $p > 0.1$ ; Theta =  $132.9 \pm 22.2$  % de 4-AP  $p > 0.1$ ; Beta =  $148.3 \pm 18.4$  % de 4-AP  $p > 0.1$ ; Gamma =  $182.7 \pm 17.2$  % de 4-AP  $p > 0.1$ ;  $n = 6$ ; figuras 25A, 25B y 25C), con respecto a la actividad epileptiforme previa a la administración de CNO (10 µg). En contraste, la actividad epileptiforme de los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq aumentó significativamente después de la administración intracerebroventricular de CNO (10 µg; Banda ancha =  $1338.7 \pm 322.7$  % de 4-AP,  $p < 0.01$ ; Delta =  $1723.7 \pm 1347.7$  % de 4-AP,  $p < 0.05$ ; Theta =  $884.9 \pm 103.9$  % de 4-AP,  $p < 0.01$ ; Beta =  $2316.8 \pm 778.9$  % de 4-AP,  $p < 0.01$ ; Gamma =  $1633.9 \pm 463.6$  % de 4-AP,  $p < 0.05$ ;  $n = 6$ ; figuras 25A, 25B y 25C). Estos resultados muestran que la activación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM3Dq, potencia la actividad epileptiforme ya establecida.

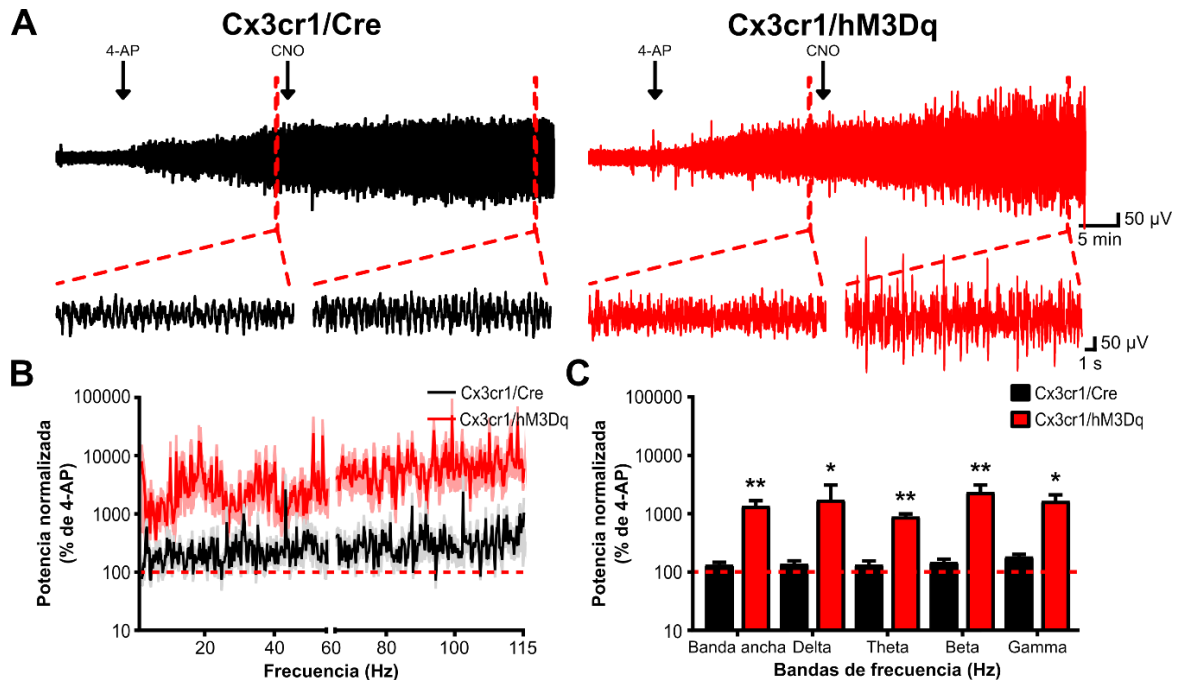


Figura 25. Efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal y posterior a la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.), seguido de la administración de CNO (10  $\mu$ g), en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. Las flechas indican el inicio de la aplicación de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y de la administración de CNO (10  $\mu$ g). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad epileptiforme hipocámpal delimitada por la línea roja punteada, en condiciones previas a la administración de CNO (10  $\mu$ g; trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de CNO (10  $\mu$ g; trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% de 4-AP) de la actividad epileptiforme después de la administración de CNO (10  $\mu$ g) en animales de las cepas Cx3cr1/Cre (n = 6) y Cx3cr1/hM3Dq (n = 6). La línea roja punteada representa la actividad epileptiforme previa a la administración de CNO (100 % de 4-AP). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% de 4-AP) de la actividad epileptiforme después de la administración de CNO (10  $\mu$ g) en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad epileptiforme previa a la administración de CNO (100 % de 4-AP) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales exacerba la actividad epileptiforme ya establecida hipocámpal inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.). \* y \*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

***La activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales incrementa la densidad microglial y altera la morfología de la microglía hipocampal.***

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la activación selectiva de la microglía y de los macrófagos parenquimales con quimiogenética sobre la densidad microglial y la morfología de estas células, mediante inmunofluorescencia, se visualizó la fluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 y de DAPI en *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo de animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq y la cepa control Cx3cr1/Cre, previamente administrados con CNO (10 µg) de forma intracerebroventricular (figura 26A). Los cerebros se fijaron 60 minutos después de la administración de CNO (10 µg). En animales de la cepa control Cx3cr1/Cre previamente administrados con CNO (10 µg), se observó una densidad microglial de  $219.3 \pm 22.5$  células/mm<sup>2</sup> (n = 6 muestras de 3 animales; figura 26B). Las células microgliales de la cepa control Cx3cr1/Cre mostraron una morfología ramificada (figura 26A), observándose un área de  $2.1 \pm 0.1$  mm<sup>2</sup> (n = 52 células),  $36.9 \pm 2.9$  ramificaciones secundarias (n = 52 células) y un índice de circularidad de  $0.2 \pm 2.9 \times 10^{-2}$  (n = 52 células; figuras 26C, 26D y 26E). Por otra parte, en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, previamente administrados con CNO (10 µg), se observó un aumento estadísticamente significativo de la densidad microglial ( $278.4 \pm 21.2$  células/mm<sup>2</sup>; n = 6 muestras de 3 animales; p<0.05; prueba t de Student; figura 26B), así como en el área microglial ( $2.6 \pm 0.2$  mm<sup>2</sup>; n = 35 células; p<0.05; prueba t de Student; figura 26C) y el número de ramificaciones secundarias ( $53.0 \pm 4.6$  ramificaciones; n = 35 células; p<0.01; prueba t de Student; figura 26D), pero no en el índice de circularidad ( $0.1 \pm 2.3 \times 10^{-2}$  circularidad; n = 35 células; p>0.1; prueba de Mann-Whitney; figura 26E). Finalmente, la cuantificación del número de núcleos celulares marcados con DAPI no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $1185.4 \pm 119.7$  núcleos/mm<sup>2</sup>; n = 7 muestras de 3 animales; figura 26F) y Cx3cr1/hM3Dq ( $1118.7 \pm 70.4$  núcleos/mm<sup>2</sup>; n = 7 muestras de 3 animales; p>0.1; prueba t de Student; figura 26F) previamente administrados con CNO (10 µg). Juntos, estos resultados muestran que la activación quimiogenética de la microglía y de los macrófagos no parenquimales

induce un aumento de la densidad microglial, posiblemente debido a la inducción de migración y/o de proliferación microglial, como se ha observado en otras condiciones experimentales (Casal et al., 2001; Nagamoto-Combs & Combs, 2010; Kettenmann et al., 2011; Möller, 2012; Gomes et al., 2013; Szabo et al., 2016; Thangthaeng et al., 2018; Franco-Bocanegra et al., 2019; Bowyer et al., 2020), así como un cambio estructural de estas células hacia una morfología hipertrófica.

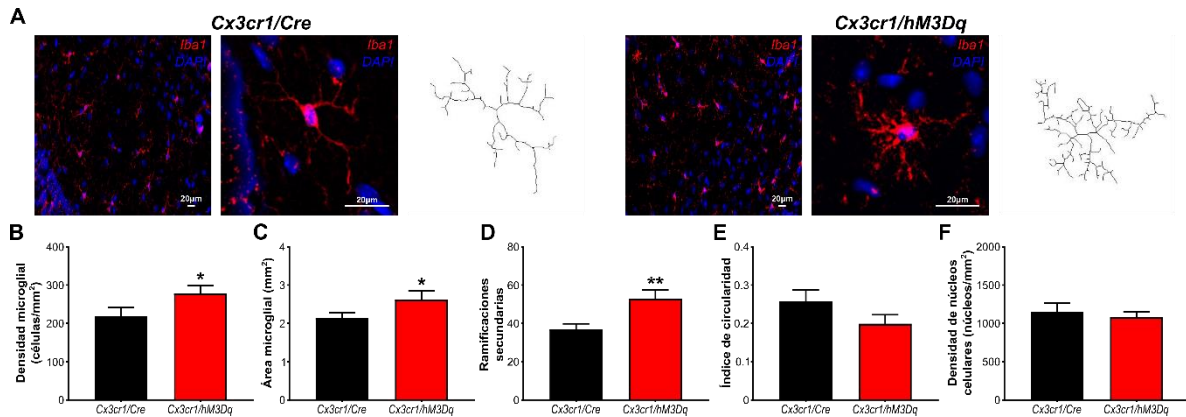


Figura 26. Efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la densidad microglial en el hipocampo y la morfología de estas células en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. A. Micrografías de la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 y de DAPI, en el *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo de animales la cepa Cx3cr1/hM3Dq (n = 52 células de 6 muestras de 3 animales) y de la cepa control Cx3cr1/Cre (n = 35 células de 6 muestras de 3 animales). Adicionalmente se muestra una célula microglial marcada con Iba1 y con DAPI (centro) y el análisis de su esqueleto (derecha). Cuantificación de la densidad microglial (B), el área microglial (C), el número de ramificaciones secundarias (D), el índice de circularidad microglial (E) y la densidad de núcleos celulares (F). Nótese que la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales incrementó la densidad microglial en el hipocampo y alteró la morfología microglial, aumentando su área y número de procesos, pero sin alterar su circularidad. Las comparaciones estadísticas de la densidad microglial, del área microglial, del número de ramificaciones secundarias y de la densidad de núcleos celulares se llevaron a cabo con la prueba t de Student, mientras que las comparaciones estadísticas del índice de circularidad fueron hechas con la prueba de Mann-Whitney. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

***El efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad es mediado por el receptor de la interleucina 1 (IL1R) en animales anestesiados.***

De acuerdo con resultados de nuestro laboratorio (anexo 8) y con la literatura (Hetier et al., 1988; Grace et al., 2018; Liu & Quan, 2018), la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, resulta en un aumento de la síntesis y liberación de la molécula proinflamatoria IL1 $\beta$ . Con lo anterior, nos propusimos investigar el papel de la IL1 $\beta$  en los efectos de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la actividad del circuito hipocampal, a través de la coadministración intracerebroventricular de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g) (figura 27A). La coadministración intracerebroventricular de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g) no produjo cambios significativos sobre la excitabilidad hipocampal en ratones de las cepas Cx3cr1/Cre (figura 27A), en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $147.42 \pm 28.3$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $170.5 \pm 53.0$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta =  $193.2 \pm 81.6$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $138.9 \pm 32.3$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $139.6 \pm 25.4$  % del basal,  $p > 0.1$ ;  $n = 6$ ; prueba de Friedman; figuras 27B y 27C), en comparación con la actividad basal previa a la coadministración de IL1Ra/CNO. Estos datos sugieren que la activación de la proteína IL1R no influye en la generación de la actividad oscilatoria hipocampal. Por otro lado, en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, la actividad electrofisiológica hipocampal no mostró cambios significativos después de la coadministración intracerebroventricular de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g; figura 25A), en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $1047.8 \pm 558.8$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $540.9 \pm 247.0$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta =  $1344.6 \pm 849.5$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $2450.2 \pm 1366.1$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $2075.4 \pm 1218.5$  % del basal,  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $n = 6$ ; figuras 27B y 27C), en comparación con la cepa control Cx3cr1/Cre y con la actividad basal previa a la administración intracerebroventricular de la combinación

IL1Ra/CNO ( $p > 0.1$ ; prueba de Friedman). Estos resultados indican que el incremento de la actividad electrográfica hipocampal inducido por la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales es principalmente mediado por la activación del receptor IL1R tipo 1, probablemente a través de su acoplamiento con la IL1 $\beta$  que, de acuerdo con resultados de nuestro laboratorio (Anexo 8) y con la literatura (Grace et al., 2018), es sintetizada y liberada por la microglía como resultado de la activación quimiogénica de estas células.

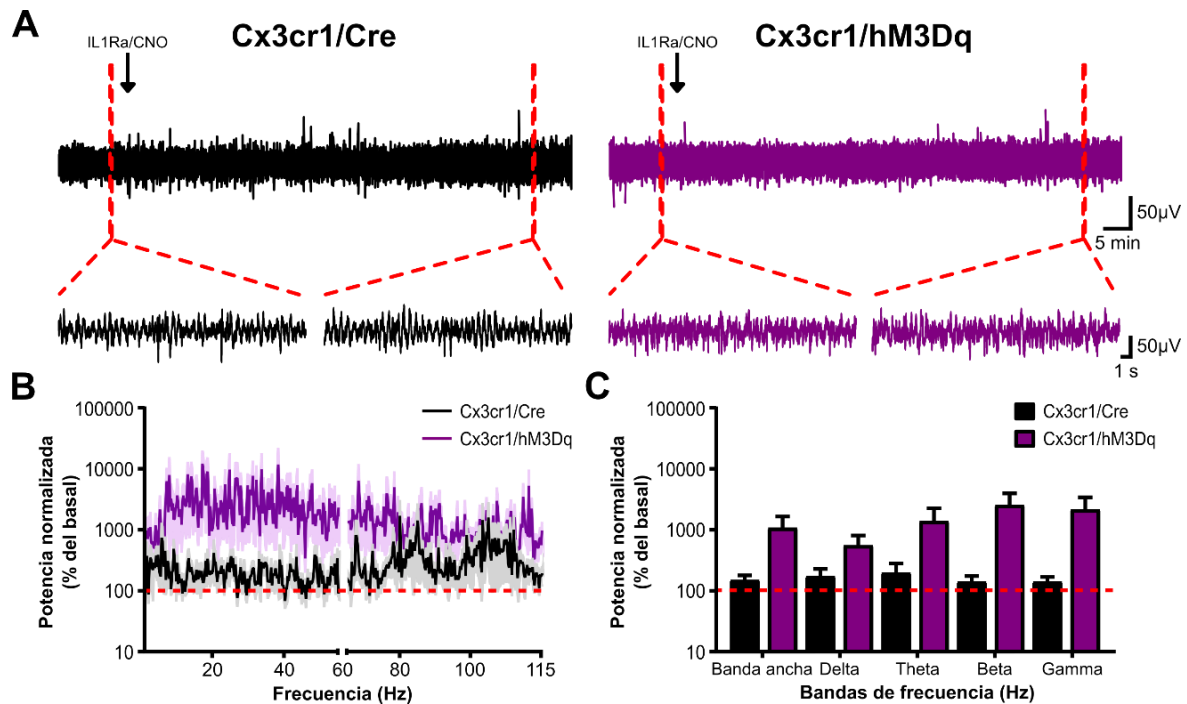


Figura 27. Efecto de la coadministración de la proteína antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL1Ra) y de CNO sobre la excitabilidad hipocampal en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocampal basal y después de la coadministración intracerebroventricular de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g) en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. Las flechas indican el inicio de la aplicación de la coadministración de IL1Ra/CNO. Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica hipocampal, delimitada por la línea roja punteada, en condiciones previas a la administración de la combinación de IL1Ra/CNO (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de la combinación de IL1Ra/CNO (trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica hipocampal después de la coadministración de IL1Ra/CNO en animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $n = 6$ ) y Cx3cr1/hM3Dq ( $n = 6$ ). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica del



hipocampo en las bandas de frecuencia de 1-115 Hz (Banda ancha), 1-4 Hz (Delta), 4-10 Hz (Theta), 10-30 Hz (Beta) y 30-115 Hz (Gamma). Nótese que la coadministración de IL1Ra/CNO no produjo cambios significativos sobre la excitabilidad hipocampal en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Con el objetivo de evaluar el papel de la IL1 $\beta$  sobre la potenciación de la inducción de actividad epileptiforme que induce la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, en un grupo separado de animales, se administró intracerebroventricularmente la combinación de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g) y posteriormente se indujo actividad epileptiforme con 4-AP (20 mg/kg, i.p.; figura 28A). La inducción de actividad epileptiforme en animales de la cepa control Cx3cr1/Cre, previamente inyectados de forma intracerebroventricular con la combinación IL1Ra/CNO, mostró un incremento sustancial de la amplitud de la actividad electrofisiológica hipocampal, acompañado de espigas epileptiformes (figura 28A), lo que se reflejó en un aumento de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $2027.4 \pm 650.0$  % del basal; Delta =  $2260.3 \pm 1009.2$  % del basal; Theta =  $1768.4 \pm 405.5$  % del basal; Beta =  $2897.3 \pm 1706.6$  % del basal; Gamma =  $1815.9 \pm 1042.9$  % del basal; n = 6; figuras 28B y 28C), similar a lo observado en los experimentos anteriormente descritos (figuras 15 y 23). En cuanto al efecto de la coadministración de la proteína IL1Ra y de CNO sobre la inducción de actividad epileptiforme en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, se observó que la actividad epileptiforme hipocampal inducida con 4AP (20 mg/kg, i.p.) no mostró diferencias estadísticamente significativas (Banda ancha =  $6892.3 \pm 3495.5$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $3608.5 \pm 1841.8$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta =  $8292.1 \pm 4196.6$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $16542.7 \pm 9333.0$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $19787.4 \pm 11742.5$  % del basal,  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis; n = 6; figuras 28B y 28C), en comparación con la actividad epileptiforme de los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre.

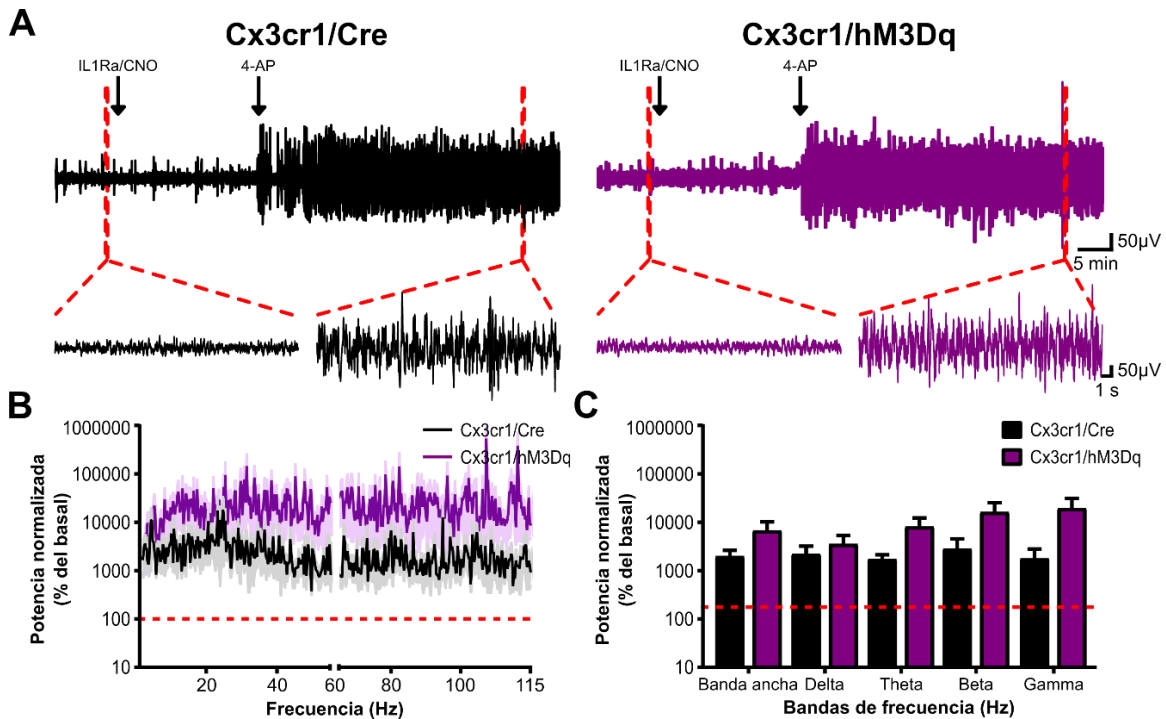


Figura 28. Efecto de la coadministración de la proteína IL1Ra y de CNO sobre la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal, durante la coadministración intracerebroventricular de la proteína IL1Ra (5 µg) y de CNO (10 µg), así como después de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Las flechas indican el inicio de la coadministración de IL1Ra/CNO y de la aplicación de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica hipocámpal, delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.; trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocámpal en animales de las cepas Cx3cr1/Cre (n = 6) y Cx3cr1/hM3Dq (n = 6). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica del hipocampo en las bandas de frecuencia de 1-115 Hz (Banda ancha), 1-4 Hz (Delta), 4-10 Hz (Theta), 10-30 Hz (Beta) y 30-115 Hz (Gamma). Nótese que la coadministración de IL1Ra/CNO no produjo cambios significativos sobre la inducción hiperexcitabilidad con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media ± EEM.

De forma similar, al investigar los efectos de la administración intracerebroventricular de la combinación de la proteína IL1Ra (5 µg) y de CNO (10

µg) sobre la inducción de actividad epileptiforme hipocampal con PTZ (200 mg/kg, i.p.), se observó que los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq desarrollaron actividad epileptiforme de forma similar a los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre (figura 29A). El análisis de la potencia de la actividad electrofisiológica no mostró diferencias estadísticamente significativas en las bandas de frecuencia analizadas entre los animales de las cepas Cx3cr1/Cre (Banda ancha = 1149.9 ± 283.8 % del basal; Delta = 2764.3 ± 949.4 % del basal; Theta = 835.2 ± 355.6 % del basal; Beta = 471.0 ± 245.8 % del basal; Gamma = 764.7 ± 335.1 % del basal; n = 6; figuras 29B y 29C) y Cx3cr1/hM3Dq (Banda ancha = 1024.3 ± 368.8 % del basal, p>0.1; Delta = 1294.1 ± 472.9 % del basal, p>0.1; Theta = 1058.4 ± 338.1 % del basal, p>0.1; Beta = 710.4 ± 291.5 % del basal, p>0.1; Gamma = 593.1 ± 204.8 % del basal, p>0.1; prueba de Kruskal-Wallis; n = 6; figuras 29B y 29C).

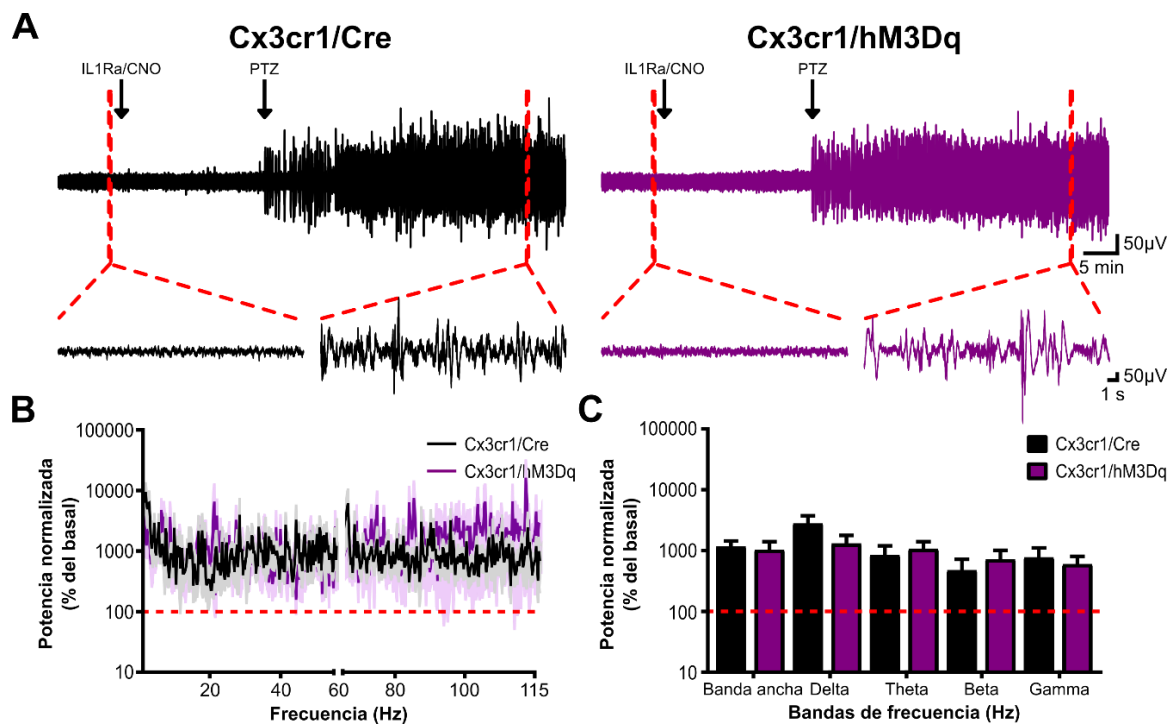


Figura 29. Efecto de la coadministración de la proteína IL1Ra y de CNO sobre la inducción de hiperexcitabilidad con PTZ en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocampal basal, durante la coadministración intracerebroventricular de la proteína IL1Ra (5 µg) y de CNO (10 µg), así como después de la administración de PTZ (200 mg/kg, i.p.). Las flechas indican el inicio de la coadministración de IL1Ra/CNO y de la aplicación de PTZ (200 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad

electrofisiológica hipocampal, delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de PTZ (200 mg/kg, i.p.; trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocampal en animales de las cepas Cx3cr1/Cre (n = 6) y Cx3cr1/hM3Dq (n = 6). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme del hipocampo en las bandas de frecuencia de 1-115 Hz (Banda ancha), 1-4 Hz (Delta), 4-10 Hz (Theta), 10-30 Hz (Beta) y 30-115 Hz (Gamma). Nótese que la coadministración de IL1Ra/CNO en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq no produjo efectos significativos sobre la inducción de hiperexcitabilidad con PTZ (200 mg/kg, i.p.). La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Finalmente, para examinar el papel del receptor IL1R sobre la exacerbación de la hiperexcitabilidad ya establecida, que resulta de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, en un grupo independiente de animales, se indujo hiperexcitabilidad mediante la administración sistémica de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y, una vez desarrollada la hiperexcitabilidad, los animales fueron inyectados de forma intracerebroventricular con la combinación de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g; figura 30A). La coadministración de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g) durante la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) no afectó la actividad epileptiforme ya establecida en animales de la cepa Cx3cr1/Cre (figura 30A), no observándose cambios significativos en la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $128.4 \pm 8.8$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $112.0 \pm 10.9$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta =  $168.5 \pm 33.5$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $170.3 \pm 25.8$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $202.6 \pm 65.4$  % del basal,  $p > 0.1$ ; prueba de Friedman; n = 6; figuras 30B y 30C), en comparación con la actividad epileptiforme previa a la coadministración de IL1Ra/CNO. Estos datos sugieren que la activación del IL1R no es necesaria para la actividad epileptiforme ya establecida. Por otro lado, la coadministración de la combinación de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g) durante la actividad epileptiforme en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq mostró un aumento sustancial de la amplitud de la actividad epileptiforme (figura 30A), reflejándose en un aumento estadísticamente significativo de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda

ancha =  $524.5 \pm 127.1$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Delta =  $498.1 \pm 262.5$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Theta =  $540.9 \pm 93.3$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Beta =  $687.9 \pm 122.7$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Gamma =  $1009.6 \pm 176.5$  % del basal,  $p < 0.01$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $n = 6$ ; figuras 30B y 30C), en comparación con los animales la cepa control Cx3cr1/Cre.

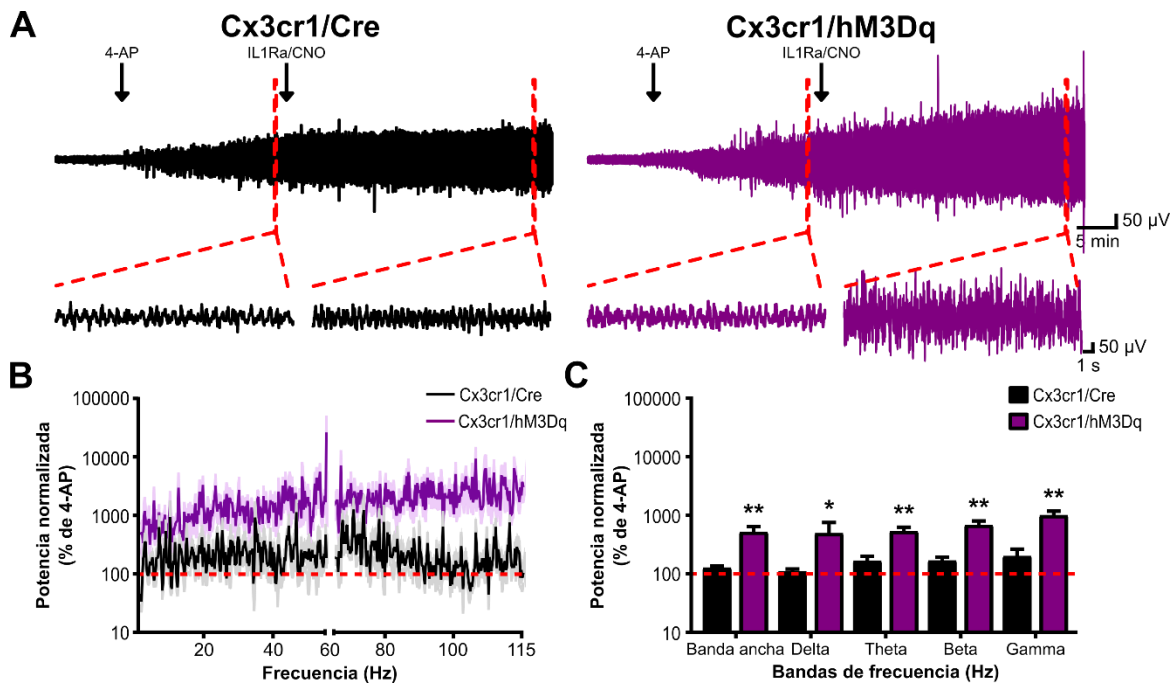


Figura 30. Efecto de la coadministración de la proteína IL1Ra y de CNO sobre la hiperexcitabilidad ya establecida en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal, después de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y durante la coadministración de la combinación de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) y de CNO (10  $\mu$ g). Las flechas indican el inicio de la aplicación de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y de la coadministración de IL1Ra/CNO. Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad epileptiforme hipocámpal, delimitada por la línea roja punteada, antes de la coadministración de IL1Ra/CNO (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de su administración (trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocámpal en animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $n = 6$ ) y Cx3cr1/hM3Dq ( $n = 6$ ). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme del hipocampo en las bandas de frecuencia de 1-115 Hz (Banda ancha), 1-4 Hz (Delta), 4-10 Hz (Theta), 10-30 Hz (Beta) y 30-115 Hz (Gamma). Nótese que la administración de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g) no bloquea el efecto de la activación selectiva de la microglía en los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas

de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Estos resultados indican que la exacerbación de la excitabilidad hipocampal y de la inducción de hiperexcitabilidad que resulta de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales está mediada principalmente por la activación del receptor IL1R tipo 1. Resultados de nuestro laboratorio (anexo 7) y de otros grupos de trabajo (Grace et al., 2018), han mostrado que la activación quimiogénica de la microglía conlleva a la síntesis y liberación de IL1 $\beta$ , por lo que es probable que el efecto proepileptiforme inducido por la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, observado en nuestros experimentos, pueda ser mediado por la síntesis y liberación de IL1 $\beta$ , seguido de la activación de su receptor IL1R tipo 1 en las neuronas hipocampales. Por otro lado, la exacerbación de la hiperexcitabilidad ya establecida no fue bloqueada por la administración de la proteína IL1Ra (5  $\mu$ g), sugiriendo que los efectos de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales durante la actividad epileptiforme no están mediados por la activación del IL1R.

***La administración intracerebroventricular de IL1 $\beta$  exagera la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad en animales anestesiados.***

Para investigar más a fondo la posible participación de la IL1 $\beta$  en los efectos inducidos por la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad, se administró IL1 $\beta$  (100 ng) o su vehículo (PBS) de forma intracerebroventricular en animales anestesiados de la cepa C57BL/6J y se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y PTZ (200 mg/kg, i.p.; figuras 31, 32, 33 y 34). Primero, se investigó el efecto de la administración intracerebroventricular de la IL1 $\beta$  (100 ng) sobre la excitabilidad hipocampal (figura 31A). Similar a lo observado con anterioridad (figura 8), la administración intracerebroventricular de PBS no produjo cambios en la amplitud de la actividad electrográfica hipocampal (figura 31A), así como ningún cambio significativo de la

potencia en ninguna las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $143.4 \pm 48.4$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $141.8 \pm 49.5$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta =  $160.6 \pm 61.1$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $115.4 \pm 11.3$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $94.5 \pm 13.2$  % del basal,  $p > 0.1$ ; prueba de Friedman;  $n = 6$ ; figuras 31B y 31C), comparado con la actividad electrofisiológica basal previa a la administración de vehículo. Sin embargo, la administración intracerebroventricular de IL1 $\beta$  (100 ng) resultó en un incremento sustancial de la actividad electrofisiológica del hipocampo acompañado de espigas epileptiformes (figura 31A), reflejándose en un aumento significativo de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $1802.7 \pm 517.4$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Delta =  $1649.8 \pm 488.6$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Theta =  $2769.8 \pm 974.4$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Beta =  $1807.4 \pm 521.1$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Gamma =  $883.6 \pm 232.0$  % del basal,  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $n = 6$ ; figuras 31B y 31C), en comparación con los animales inyectados intracerebroventricularmente con vehículo.

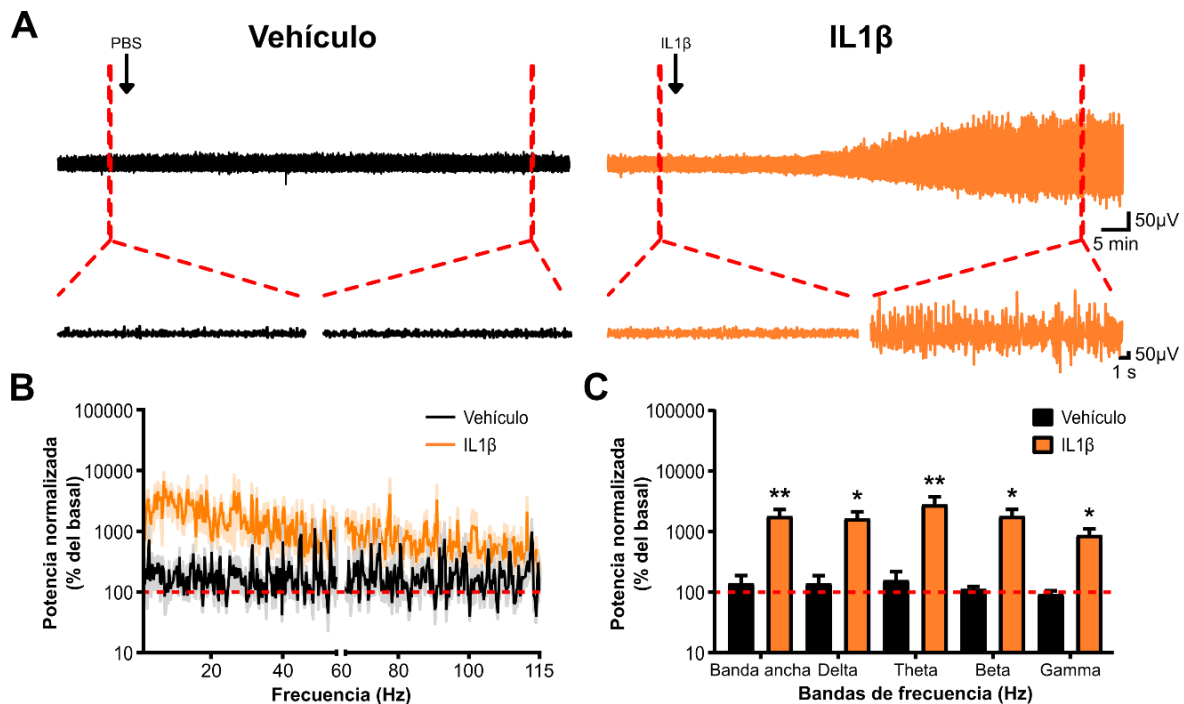


Figura 31. Efecto de la administración intracerebroventricular de interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) o de su vehículo (PBS) sobre la actividad electrofisiológica del hipocampo de animales anestesiados. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocampal basal y posterior a la administración de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo. Las flechas indican el inicio

de la aplicación de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo. Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo (trazo de la derecha) B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica hipocampal después de la administración de IL1 $\beta$  (100 ng; n = 6) o de su vehículo (n = 6). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica del hipocampo en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la administración del IL1 $\beta$  (100 ng) exacerba la excitabilidad hipocampal en todas las bandas de frecuencia analizadas. \* y \*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente, comparado contra el grupo tratado con vehículo. Nótese que la actividad electrofisiológica hipocampal aumenta sustancialmente después de la administración de IL1 $\beta$  (100 ng). La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Posteriormente, con el objetivo de investigar el efecto de la IL1 $\beta$  sobre la inducción de hiperexcitabilidad, en un grupo independiente de animales se administró IL1 $\beta$  (100 ng) o su vehículo (PBS) de forma intracerebroventricular y después se indujo actividad epileptiforme con 4-AP (20 mg/kg, i.p.; figura 32A). En animales previamente inyectados con vehículo, se observó la aparición de actividad epileptiforme caracterizada por un aumento sustancial de la actividad electrofisiológica de fondo, acompañado de espigas epileptiformes (figura 32A), reflejándose en un incremento sustancial de la potencia de la actividad epileptiforme en todas las bandas de frecuencia (Banda ancha =  $1372.5 \pm 321.2$  % del basal; Delta =  $2031.4 \pm 628.7$  % del basal; Theta =  $1465.3 \pm 429.7$  % del basal; Beta =  $1523.3 \pm 466.6$  % del basal; Gamma =  $1072.7 \pm 300.4$  % del basal; n = 6; figuras 32B y 32C). De forma similar, en los animales previamente inyectados con IL1 $\beta$ , la administración sistémica de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) produjo la aparición de actividad epileptiforme hipocampal (figura 32A), sin embargo, en comparación con los animales administrados con vehículo, se observó un incremento mayor de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $6218.8 \pm 1610.0$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Delta =  $15987.4 \pm 488.6$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Theta =



7389.3 ± 1379.9 % del basal,  $p < 0.01$ ; Beta = 4938.8 ± 1070.6 % del basal,  $p < 0.05$ ; Gamma = 2798.8 ± 569.7 % del basal,  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal.-Wallis;  $n = 6$ ; figuras 32B y 32C).

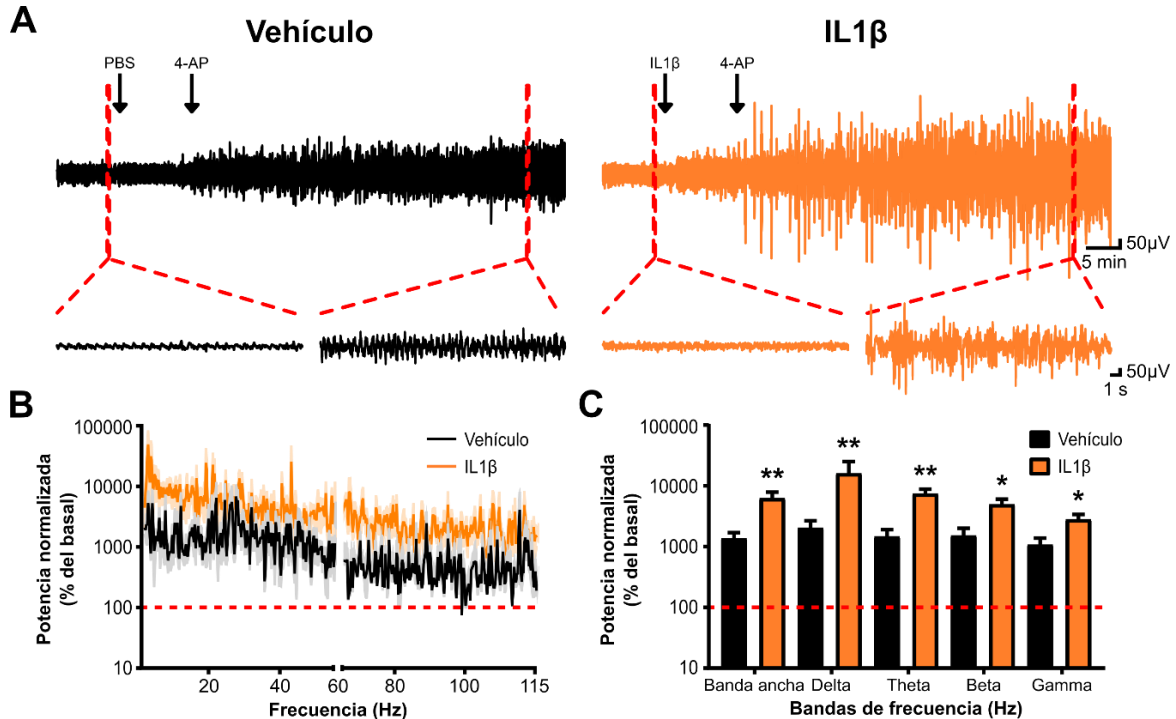


Figura 32. Efecto de la administración intracerebroventricular de IL1β o de su vehículo (PBS) sobre la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP en animales anestesiados. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal y posterior a la administración de IL1β (100 ng) o de su vehículo, seguido de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Las flechas indican el inicio de la aplicación de IL1β (100 ng) o de su vehículo y de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.; trazo de la derecha) B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme de animales administrados con IL1β (100 ng;  $n = 6$ ) o con vehículo ( $n = 6$ ). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. \* y \*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente, comparado contra el grupo tratado con vehículo. Nótese que la administración de IL1β (100 ng) aumenta sustancialmente la hiperexcitabilidad hipocámpal inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.). La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-

Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Así mismo, la administración intracerebroventricular de IL1 $\beta$  (100 ng) mostró efectos proepileptiformes sobre la inducción de hiperexcitabilidad hipocampal con PTZ (200 mg/kg, i.p.; figura 33A). El análisis de la potencia de la actividad epileptiforme de los animales previamente administrados con IL1 $\beta$  (100 ng) mostró un incremento mayor de la actividad epileptiforme inducida con PTZ (200 mg/kg, i.p.) en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $84520.9 \pm 75005.9$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Delta =  $83579.2 \pm 55385.2$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Theta =  $95302.9 \pm 76170.7$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Beta =  $119783.8 \pm 115628.8$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Gamma =  $64588.0 \pm 61639.0$  % del basal,  $p < 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $n = 6$ ; figuras 33B y 33C), comparada con la potencia de la actividad epileptiforme inducida con PTZ (200 mg/kg, i.p.) de los animales previamente inyectados con vehículo (Banda ancha =  $893.1 \pm 164.4$  % del basal; Delta =  $1544.1 \pm 442.6$  % del basal; Theta =  $985.6 \pm 284.4$  % del basal; Beta =  $616.5 \pm 110.6$  % del basal; Gamma =  $645.1 \pm 186.6$  % del basal;  $n = 6$ ; figuras 33B y 33C).

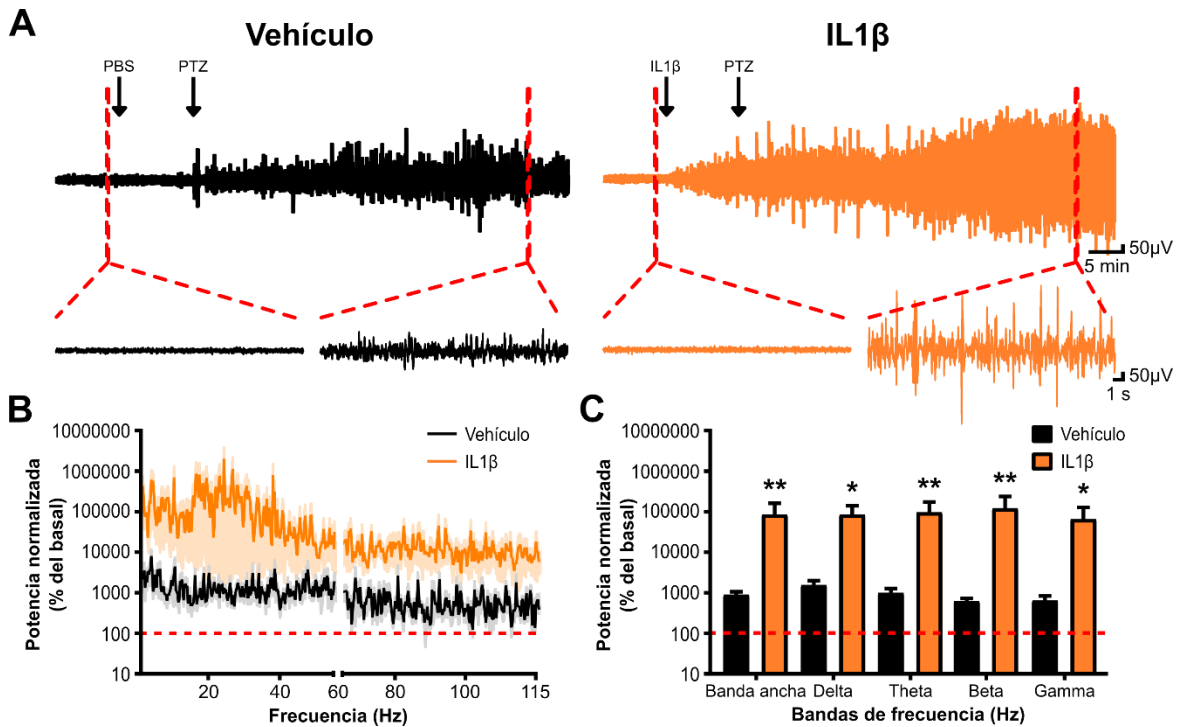


Figura 33. Efecto de la administración intracerebroventricular de IL1 $\beta$  sobre la inducción de hiperexcitabilidad con PTZ en animales anestesiados. A. Trazos representativos de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal, durante la administración intracerebroventricular de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo y de PTZ (200 mg/kg, i.p.). Las flechas indican el inicio de la aplicación de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo y de PTZ (200 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica hipocámpal, delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de PTZ (200 mg/kg, i.p.; trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocámpal de los animales inyectados de forma intracerebroventricular con IL1 $\beta$  (100 ng; n = 6) o con su vehículo (n = 6). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocámpal en las bandas de frecuencia de 1-115 Hz (Banda ancha), 1-4 Hz (Delta), 4-10 Hz (Theta), 10-30 Hz (Beta) y 30-115 Hz (Gamma). \* y \*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente, comparado contra el grupo tratado con vehículo. Nótese que la coadministración de IL1 $\beta$  (100 ng) exacerba la inducción de hiperexcitabilidad con PTZ (200 mg/kg, i.p.). La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Por último, se investigó el efecto de la administración de IL1 $\beta$  (100 ng) sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Para ello, en un grupo

independiente de animales, se indujo hiperexcitabilidad con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y, una vez establecida la actividad epileptiforme, se administró IL1 $\beta$  (100 ng) de forma intracerebroventricular para observar sus efectos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal durante 30 minutos (figura 34A). La administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) produjo un aumento de la actividad electrofisiológica de fondo acompañado de espigas epileptiformes (figura 34A). La administración intracerebroventricular de vehículo durante la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) no alteró significativamente esta actividad (figura 34A), en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha = 168.5  $\pm$  38.4 % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta = 164.3  $\pm$  39.1 % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta = 161.6  $\pm$  39.8 % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta = 209.3  $\pm$  47.1 % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma = 317.4  $\pm$  122.4 % del basal,  $p > 0.1$ ; prueba de Friedman;  $n = 6$ ; figuras 34B y 34C), comparado con la hiperexcitabilidad previa a la administración de vehículo. De forma similar, la administración intracerebroventricular de IL1 $\beta$  (100 ng) durante la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) no modificó significativamente esta actividad (figura 34A), en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha = 380.0  $\pm$  134.0 % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta = 527.4  $\pm$  289.6 % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta = 381.8  $\pm$  122.5 % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta = 291.3  $\pm$  82.4 % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma = 233.2  $\pm$  58.7 % del basal,  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $n = 6$ ; figuras 34B y 34C), en comparación con los animales administrados con vehículo.

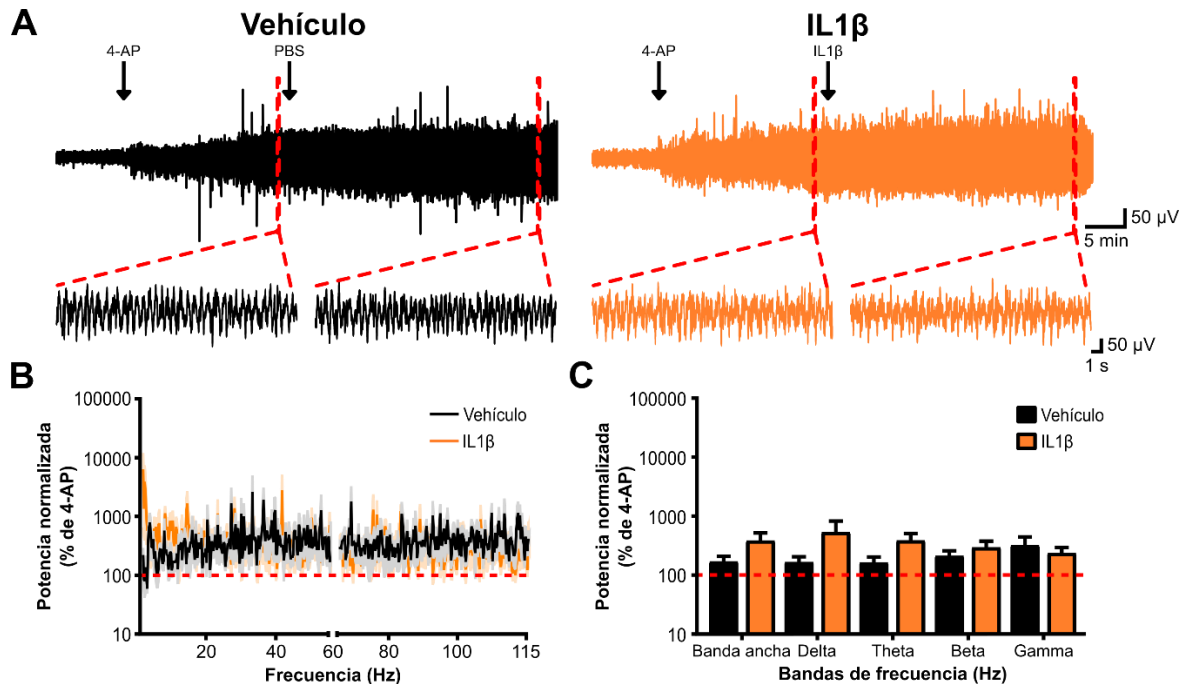


Figura 34. Efecto de la administración intracerebroventricular de IL1 $\beta$  sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP en animales anestesiados. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocampal basal y posterior a la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.), seguido de la administración de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo (PBS). Las flechas indican el inicio de la aplicación de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y de la administración de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo. Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad epileptiforme hipocampal delimitada por la línea roja punteada, en condiciones previas a la administración de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo (trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% de 4-AP) de la actividad epileptiforme después de la administración de IL1 $\beta$  (100 ng; n = 6) o de su vehículo (n = 6). La línea roja punteada representa la hiperexcitabilidad previa a la administración de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo (100 % de 4-AP). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% de 4-AP) de la actividad epileptiforme después de la administración de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad epileptiforme previa a la administración de IL1 $\beta$  (100 ng) o de su vehículo (100 % de 4-AP) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la administración de IL1 $\beta$  (100 ng) no modifica la hiperexcitabilidad hipocampal ya inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.). La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

En conjunto, estos resultados indican que la IL1 $\beta$  es capaz de incrementar la excitabilidad hipocampal y de promover la inducción de hiperexcitabilidad, independientemente de si la hiperexcitabilidad fue inducida con 4-AP o con PTZ, que, como se mencionó anteriormente, son modelos experimentales de hiperexcitabilidad con mecanismos ictogénicos diferentes (Gustafsson et al., 1984; Squires et al., 1984; Peña & Alavez-Pérez, 2006; Velisek, 2006; Luszczki & Czuczwar, 2005; Wang et al., 2022). Esto sugiere que el efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad podría estar mediado por el acoplamiento de la IL1 $\beta$ , previamente sintetizada y liberada por la microglía y los macrófagos no parenquimales como resultado de la activación quimiogénica (Anexo 8; Grace et al., 2018), con el IL1R tipo 1, que se encuentra mayoritariamente expresado en las neuronas hipocampales (Viviani et al., 2006).

### **Inhibición quimiogénica de la activación de la microglía y de los macrófagos no parenquimales.**

Con el objetivo de investigar el efecto de la inhibición selectiva de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y sobre la hiperexcitabilidad, se llevaron a cabo experimentos utilizando animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di, que expresan a los DREADDs hM4Di en la microglía y en los macrófagos no parenquimales.

#### ***Caracterización de la expresión de los DREADDs hM4Di en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.***

Se caracterizó la expresión del DREADDs hM4Di en animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di. Para ello, mediante inmunofluorescencia, se observó la expresión de la proteína fluorescente mCitrina que se encuentra expresada de forma constitutiva en las células que expresan los DREADDs. Adicionalmente, la marca fluorescente de la proteína de fusión hM4Di-mCitrina se colocó con la fluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 y con DAPI. En muestras histológicas del área CA1 del hipocampo de animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di (n = 17 rebanadas de 6 animales), la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1 evidenció la presencia de células microgliales con morfología ramificada (figura 35A), mientras que la marca fluorescente de la proteína de fusión hM4Di-mCitrina se observó como *puncta* de fluorescencia (figura 35A), similar a lo obtenido en los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq (figura 20A). Se observó que la marca fluorescente de la proteína de fusión hM4Di-mCitrina colocó con la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 en el  $66.2 \pm 5.2$  % de las células positivas a Iba1 (flechas blancas, figuras 35A y 35B). Adicionalmente, se observó que el  $33.7 \pm 5.2$  % de las células positivas a Iba1 no colocaron con la marca fluorescente de la proteína de fusión hM4Di-mCitrina (figura 35A). Es importante resaltar que, de la misma forma que con los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, no se observó marca fluorescente de la proteína de fusión hM4Di-mCitrina que no coincidiera con la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1 (figura 35A), sugiriendo que el DREADD hM4Di se expresó exclusivamente en la microglía y en los macrófagos no parenquimales de los

espacios perivascuales (Anexo 4), debido a que estas células también expresan el gen *Cx3cr1* (Shemer et al., 2018; Van Hove et al., 2019). Lo anterior, sugiere que los DREADDs hM4Di también podrían estar expresados en los macrófagos no parenquimales de las meninges o de los plexos coroideos, que también expresan el gen *Cx3cr1* (Utz & Greter, 2019), sin embargo, no se verificó su expresión en estas zonas. Asimismo, para corroborar que la proteína de fusión hM4Di-mCitrina colocalizara con las células marcadas con el anticuerpo anti-Iba1, se adquirió un bloque de imágenes a diferentes profundidades utilizando un microscopio confocal, abarcando la totalidad del soma de la célula observada (n = 2 células; figura 35C). Las imágenes mostraron que la fluorescencia de la proteína de fusión hM4Di-mCitrina colocaliza con la fluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 en el soma de la célula marcada (figura 35C), así como en algunos de sus procesos.

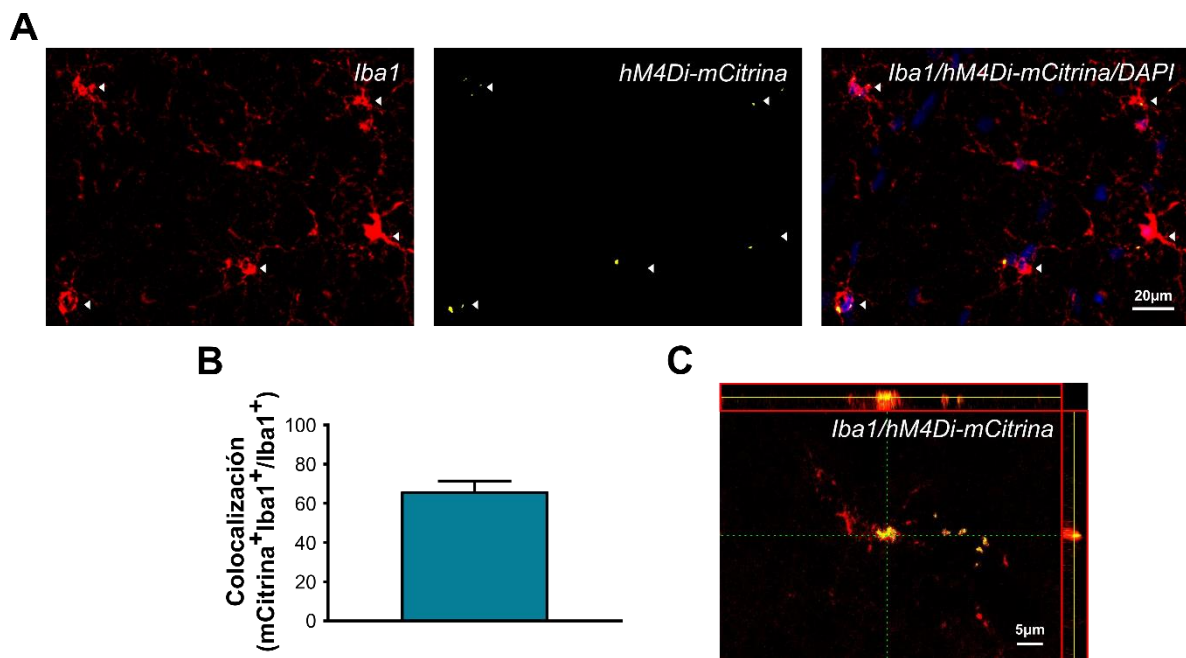


Figura 35. Caracterización de la expresión de la proteína de fusión hM4Di-mCitrina en animales de la cepa *Cx3cr1/hM4Di*. A. Micrografías de la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 (izquierda, rojo), de la proteína de fusión hM4Di-mCitrina (centro, amarillo) y de su combinación con DAPI (derecha, azul), en el *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo de un animal de la cepa *Cx3cr1/hM4Di*. Las flechas blancas indican células positivas a Iba1 y a la proteína de fusión hM4Di-mCitrina. Obsérvese que la fluorescencia de la proteína de fusión hM4Di-mCitrina se observó como *puncta* de fluorescencia y que colocaliza con la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1. B. Proporción de células positivas a Iba1 que expresaron a la proteína de



fusión hM4Di-mCitrina (n = 17 rebanadas de 6 animales). C. *Z-stack* de una célula marcada con el anticuerpo anti-Iba1 y con la proteína de fusión hM4Di-mCitrina (n = 2 células). Nótese que la marca fluorescente de la proteína de fusión hM4Di-mCitrina colocalizó con la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1 en la totalidad del soma de la célula observada.

***La activación de los DREADDs hM4Di en la microglía y en los macrófagos no parenquimales inhibe la excitabilidad hipocampal en animales anestesiados.***

Con la finalidad de caracterizar la influencia de la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal, se administró CNO (10 µg) de forma intracerebroventricular en ratones anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di y se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal durante 30-40 minutos (figura 36A). Previo a la administración intracerebroventricular de CNO (10 µg), se caracterizó la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di y no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cepa control Cx3cr1/Cre (Anexo 9). Similar a lo observado anteriormente (figura 21A), la administración intracerebroventricular de CNO (10 µg) en animales de la cepa Cx3cr1/Cre no ejerció efectos significativos sobre la actividad electrofisiológica del hipocampo (figura 36A), en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $95.0 \pm 3.0$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $96.6 \pm 6.4$  % del basal; Theta =  $99.7 \pm 6.0$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $106.5 \pm 10.8$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $103.0 \pm 7.9$  % del basal,  $p > 0.1$ ; prueba de Friedman; n = 6; figuras 36B y 36C), en comparación con la actividad electrofisiológica previa a la administración intracerebroventricular de CNO (10 µg). Sin embargo, la administración intracerebroventricular de CNO (10 µg) en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di produjo una reducción de la amplitud de la actividad electrofisiológica hipocampal (figura 36A), que se vio reflejada en una disminución estadísticamente significativa de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $34.0 \pm 5.6$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Delta =  $37.6 \pm 9.6$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Theta =  $31.4 \pm 8.5$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Beta =  $34.2 \pm 6.4$  %

del basal,  $p < 0.001$ ; Gamma =  $44.9 \pm 8.4$  % del basal,  $p < 0.001$ ; prueba ANOVA de una vía;  $n = 6$ ; figuras 36B y 36C), en comparación con la cepa control Cx3cr1/Cre.

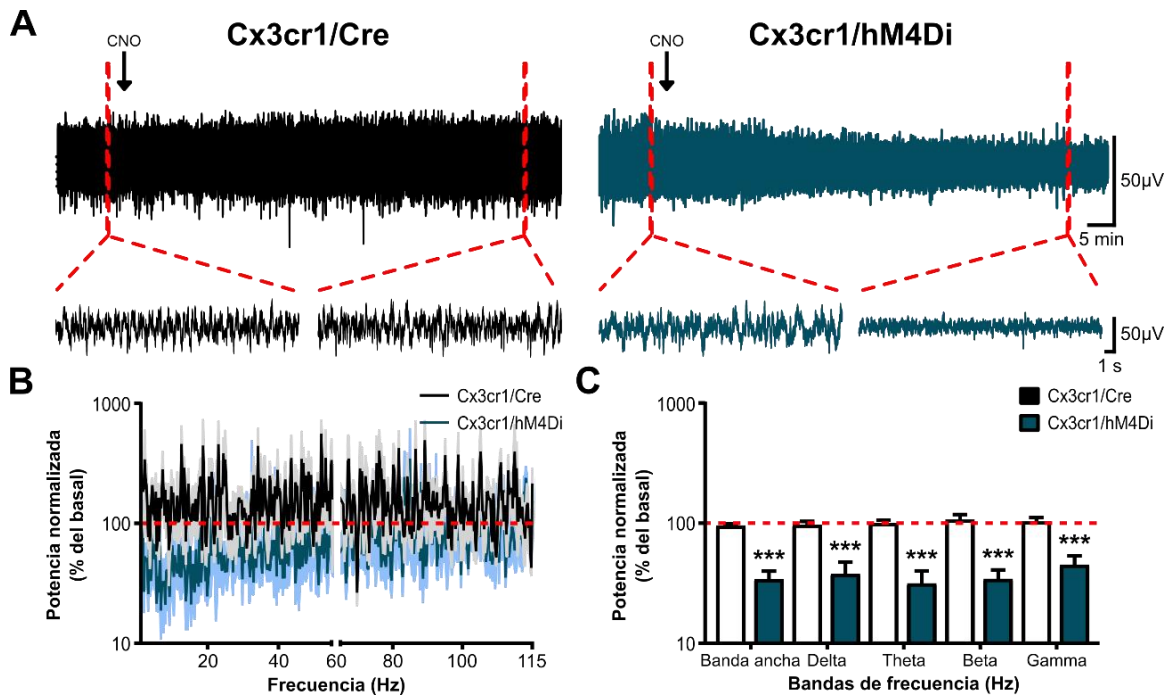


Figura 36. Efecto de la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales sobre la actividad electrofisiológica del hipocampo de ratones anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di. A. Trazos representativos de la actividad electrofisiológica hipocampal basal y después de la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di. B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica hipocampal después de la administración de CNO en animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $n = 6$ ) y Cx3cr1/hM4Di ( $n = 6$ ). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica del hipocampo en las bandas de frecuencia de 1-115 Hz (Banda ancha), 1-4 Hz (Delta), 4-10 Hz (Theta), 10-30 Hz (Beta) y 30-115 Hz (Gamma). Nótese que la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) produce una disminución sustancial de la excitabilidad hipocampal en animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di. \*\*\* denota una diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.001$ , comparado contra la cepa control Cx3cr1/Cre. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba ANOVA de una vía y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Estos resultados muestran que la inhibición selectiva de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM4Di expresados en estas células, disminuye la excitabilidad del circuito hipocampal, sugiriendo que la microglía y los macrófagos no parenquimales se encuentra basalmente activada y que influye en el mantenimiento de la actividad electrofisiológica basal del circuito hipocampal.

***La activación de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales bloquea parcialmente la inducción de hiperexcitabilidad en animales anestesiados.***

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la inhibición selectiva de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales sobre la inducción de hiperexcitabilidad, se administró CNO (10  $\mu$ g) de forma intracerebroventricular y posteriormente se administró sistémicamente 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di. La administración sistémica de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre, previamente inyectados con CNO (10  $\mu$ g), indujo hiperexcitabilidad (figura 37A), similar a la observada en resultados descritos previamente (figura 14, 23, 22, 28), lo que se reflejó en un aumento de la potencia de la actividad electrofisiológica hipocampal en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $1663.5 \pm 159.9$  % del basal; Delta =  $2621.4 \pm 286.2$  % del basal; Theta =  $1489.4 \pm 220.8$  % del basal; Beta =  $1300.1 \pm 253.7$  % del basal; Gamma =  $1613.3 \pm 603.1$  % del basal; n = 6; figuras 37B y 37C). Por otra parte, en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di, previamente administrados con CNO (10  $\mu$ g) de forma intracerebroventricular, la aplicación de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) también indujo hiperexcitabilidad (figura 37A). Sin embargo, la hiperexcitabilidad observada en los animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di administrados con CNO (10  $\mu$ g) fue significativamente menor en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $484.5 \pm 80.2$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Delta =  $411.9 \pm 76.8$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Theta =  $485.3 \pm 97.5$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Beta =  $855.3 \pm 173.1$  % del

basal,  $p < 0.05$ ; Gamma =  $737.4 \pm 199.1$  % del basal,  $p < 0.01$ ; prueba ANOVA de una vía;  $n = 6$ ; figuras 37B y 37C), con respecto a la cepa control Cx3cr1/Cre.

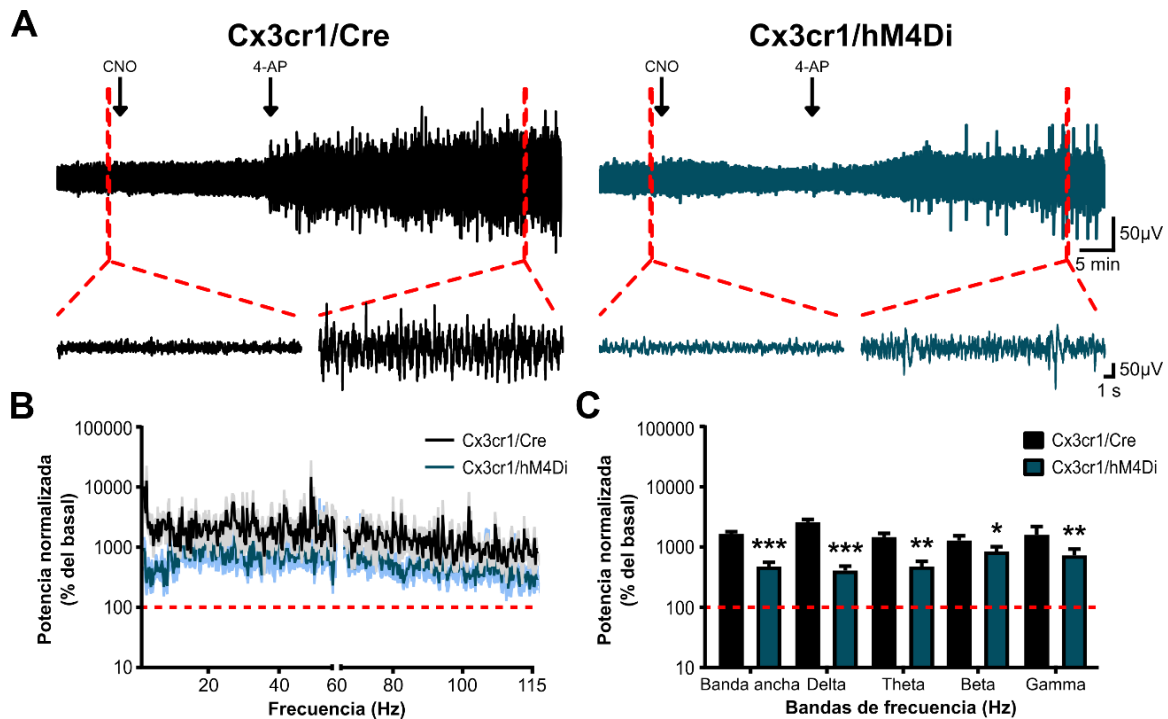


Figura 37. Efecto de la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales sobre la inducción de hiperexcitabilidad hipocámpal con 4-AP en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal y posterior a la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g), seguido de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Las flechas indican el inicio de la aplicación de CNO (10  $\mu$ g) y de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.; trazo de la derecha) B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme de animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre ( $n = 6$ ) y Cx3cr1/hM4Di ( $n = 6$ ) previamente administrados con CNO (10  $\mu$ g). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) disminuye la hiperexcitabilidad hipocámpal inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di. \*, \*\* y \*\*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente, comparado contra la cepa control Cx3cr1/Cre. La potencia en

las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba ANOVA de una vía y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Asimismo, para examinar si el efecto antiepileptiforme de la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales es generalizable a toda la actividad epileptiforme, se realizaron experimentos en donde se administró CNO (10  $\mu$ g) de forma intracerebroventricular seguido de la administración sistémica del fármaco convulsivante PTZ (200 mg/kg, i.p.; figura 38A). En un grupo independiente de animales de la cepa control Cx3cr1/Cre, previamente inyectados de forma intracerebroventricular con CNO (10  $\mu$ g), la administración sistémica de PTZ (200 mg/kg, i.p.) indujo hiperexcitabilidad caracterizada por espigas epileptiformes de alto voltaje y un incremento ligero de la amplitud de la actividad electrofisiológica de fondo (figura 38A), similar a lo observado en resultados anteriores (figuras 23, 29 y 32). La aparición de esta actividad epileptiforme se reflejó en un aumento sustancial de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $1324.1 \pm 336.3$  % del basal; Delta =  $2730.4 \pm 741.4$  % del basal; Theta =  $1415.3 \pm 492.4$  % del basal; Beta =  $8873 \pm 217.3$  % del basal; Gamma =  $1260.9 \pm 366.0$ % del basal; n = 6; figuras 38B y 38C). Por otro lado, en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di previamente inyectados de forma intracerebroventricular con CNO (10  $\mu$ g), la inducción de hiperexcitabilidad con PTZ (200 mg/kg, i.p.) se bloqueó parcialmente, pues estos animales exhibieron espigas epileptiformes de menor voltaje (figura 38A) y un incremento estadísticamente menor de la potencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $271.5 \pm 54.1$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Delta =  $5578 \pm 128.8$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Theta =  $148.2 \pm 25.1$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Beta =  $115.7 \pm 33.2$  % del basal,  $p < 0.05$ ; Gamma =  $210.7 \pm 58.4$  % del basal,  $p < 0.01$ ; prueba ANOVA de una vía; n = 6; figuras 38B y 38C), con respecto a la cepa control Cx3cr1/Cre.

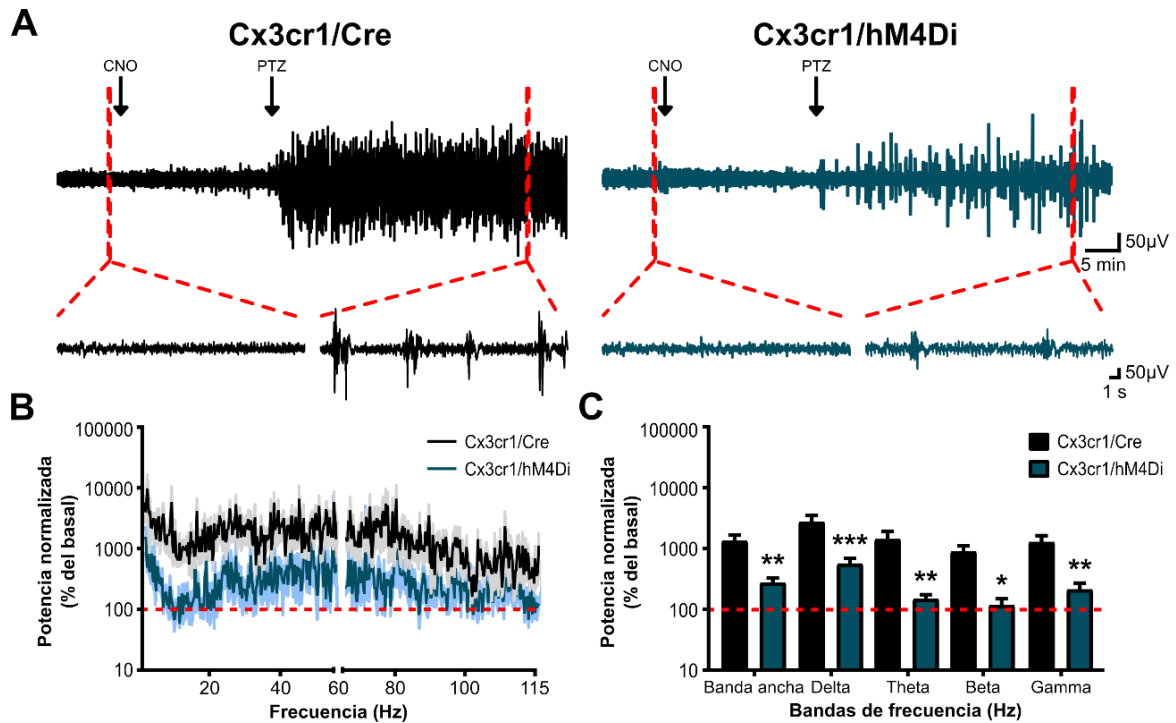


Figura 38. Efecto de la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales sobre la inducción de hiperexcitabilidad hipocámpal con PTZ en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal y posterior a la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g), seguido de la administración de PTZ (200 mg/kg, i.p.). Las flechas indican el inicio de la aplicación de CNO (10  $\mu$ g) y de PTZ (200 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración de PTZ (200 mg/kg, i.p.; trazo de la derecha) B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme de animales de las cepas Cxcr1/Cre (n = 6) y Cx3cr1/hM4Di (n = 6) previamente administrados de forma intracerebroventricular con CNO (10  $\mu$ g). La línea roja punteada representa la actividad basal para ambos grupos (100 % del basal). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de la actividad basal (100 % del basal) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la hiperexcitabilidad hipocámpal inducida con PTZ (200 mg/kg, i.p.) en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di fue parcialmente bloqueada tras la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g). \*, \*\* y \*\*\* denotan una diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente, comparado contra la cepa control Cx3cr1/Cre. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba ANOVA de una vía y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de

frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Estos resultados sugieren que la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM4Di expresados en estas células, es capaz de bloquear parcialmente la inducción de hiperexcitabilidad, independientemente del mecanismo utilizado para producirla.

***La activación de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales no modula la hiperexcitabilidad ya inducida en animales anestesiados.***

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la inhibición selectiva de la activación microglial sobre la hiperexcitabilidad ya inducida, se indujo hiperexcitabilidad mediante la aplicación sistémica de 4-AP (20 mg/kg, i.p.), seguido de la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di (figura 39A). El análisis de la potencia de la actividad epileptiforme previa a la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas entre animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di (Anexo 10). La administración intracerebroventricular de CNO (10 $\mu$ g) en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/Cre no afectó significativamente la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $163.4 \pm 20.6$  % de 4-AP,  $p > 0.1$ ; Delta =  $167.4 \pm 33.0$  % de 4-AP,  $p > 0.1$ ; Theta =  $192.2 \pm 27.7$  % de 4-AP,  $p > 0.1$ ; Beta =  $135.6 \pm 13.5$  % de 4-AP,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $156.9 \pm 20.0$  % de 4-AP,  $p > 0.1$ ; prueba de Friedman;  $n = 6$ ; figuras 39B y 39C), en comparación con la hiperexcitabilidad previa a la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g). Asimismo, en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di, la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) durante la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) no modificó de forma significativa la actividad epileptiforme (figura 39A), así como la potencia de esta actividad en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $161.1 \pm 28.4$  % de 4-AP,  $p > 0.1$ ;

Delta =  $155.3 \pm 43.7$  % de 4-AP,  $p > 0.1$ ; Theta =  $192.9 \pm 24.9$  % de 4-AP,  $p > 0.1$ ; Beta =  $184.7 \pm 22.1$  % de 4-AP,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $231.4 \pm 54.2$  % de 4-AP,  $p > 0.1$ ; prueba ANOVA de una vía;  $n = 6$ ; figuras 39B y 39C), en comparación con la cepa control Cx3cr1/Cre.

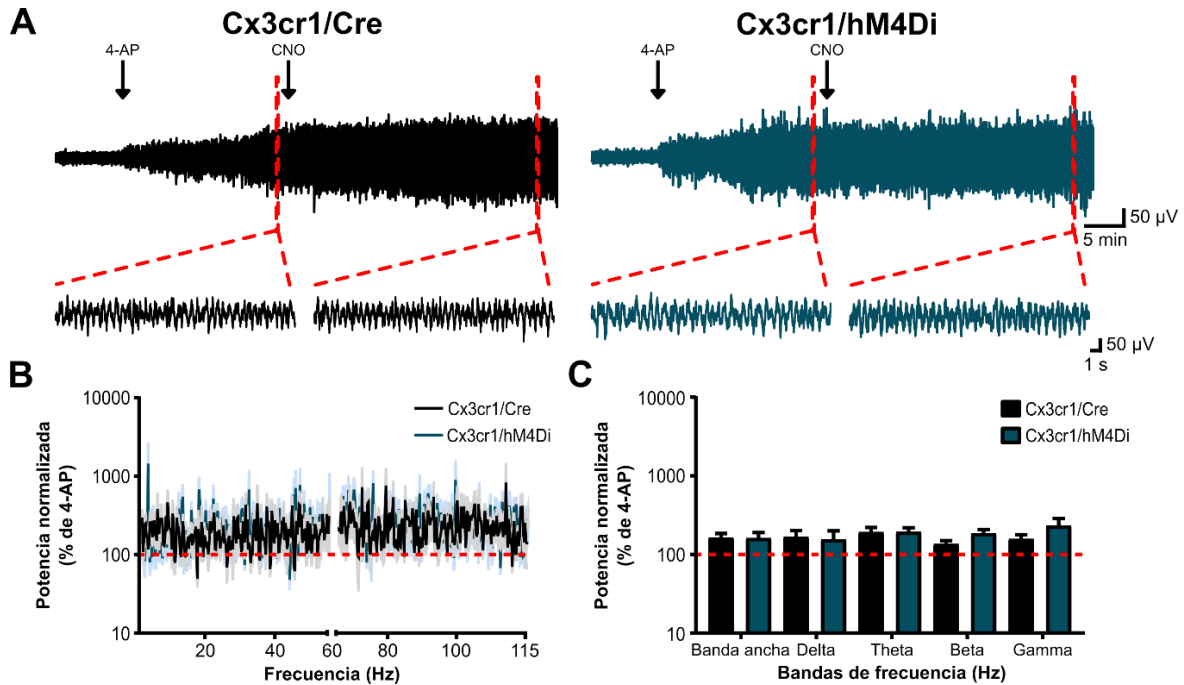


Figura 39. Efecto de la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocampal basal y posterior a la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.), seguido de la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g), en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di. Las flechas indican el inicio de la aplicación de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) y de la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad epileptiforme hipocampal delimitada por la línea roja punteada, en condiciones previas a la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g; trazo de la izquierda) y 30 minutos después de la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g; trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% de 4-AP) de la actividad epileptiforme después de la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre ( $n = 6$ ) y Cx3cr1/hM4Di ( $n = 6$ ). La línea roja punteada representa la actividad epileptiforme previa a la administración intracerebroventricular de CNO (100 % de 4-AP). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% de 4-AP) de la actividad epileptiforme después de la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). La línea roja punteada representa la potencia de



la actividad epileptiforme previa a la administración intracerebroventricular de CNO (100 % de 4-AP) para cada una de las bandas de frecuencia analizadas. Nótese que la inhibición quimiogénica de la activación microglial no modifica hiperexcitabilidad hipocampal ya inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.). La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba ANOVA de una vía y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

Estos resultados indican que, durante la actividad epileptiforme, la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM4Di expresados en estas células, no modula la hiperexcitabilidad ya inducida.

***La activación de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales no altera la densidad microglial en el hipocampo ni la morfología de estas células.***

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la inhibición selectiva de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales con quimiogénica sobre la densidad microglial y la morfología de estas células, mediante inmunofluorescencia, se visualizó la fluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 y de DAPI en *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo de animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di y la cepa control Cx3cr1/Cre, previamente administrados de forma intracerebroventricular con CNO (10  $\mu$ g; figura 40A). Similar a lo observado previamente (figura 26), en animales de la cepa control Cx3cr1/Cre previamente administrados de forma intracerebroventricular con CNO (10  $\mu$ g), se observó una densidad microglial de  $218.0 \pm 19.4$  células /  $\text{mm}^2$  ( $n = 7$  muestras de 3 animales; figura 40B). Las células microgliales de la cepa control Cx3cr1/Cre mostraron una morfología ramificada (figura 40A), observándose un área de  $2.1 \pm 0.1$   $\text{mm}^2$  ( $n = 60$  células; figura 40C),  $34.6 \pm 2.5$  ramificaciones secundarias ( $n = 60$  células; figura 40D) y un índice de circularidad de  $0.2 \pm 2.4 \times 10^{-2}$  ( $n = 60$  células; figura 40E). Por otra parte, en animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di previamente administrados de forma intracerebroventricular con CNO (10  $\mu$ g) no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la densidad microglial ( $202.4 \pm 8.3$  células /  $\text{mm}^2$ ;  $n = 7$  muestras de 3 animales;  $p > 0.01$ ; prueba t de Student; figura

40B), así como en el área microglial ( $2.1 \pm 0.1 \text{ mm}^2$ ;  $n = 60$  células;  $p > 0.1$ ; prueba de Mann-Whitney; figura 40C), el número de ramificaciones secundarias ( $34.93 \pm 2.3$  ramificaciones;  $n = 60$  células;  $p > 0.1$ ; prueba de Mann-Whitney; figura 40D) y en el índice de circularidad ( $0.2 \pm 2.2 \times 10^{-2}$  circularidad;  $n = 60$  células;  $p > 0.1$ ; prueba de Mann-Whitney; figura 40E). Asimismo, la cuantificación de los núcleos celulares marcados con DAPI no mostró diferencias estadísticamente significativas entre animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $1185.4 \pm 119.7$  núcleos/ $\text{mm}^2$ ;  $n = 7$  muestras de 3 animales; figura 38F) y Cx3cr1/hM4Di ( $1350.8 \pm 121.1$  núcleos/ $\text{mm}^2$ ;  $n = 7$  muestras de 3 animales;  $p > 0.1$ ; prueba t de Student; figura 40F) previamente administrados de forma intracerebroventricular con CNO ( $10 \mu\text{g}$ ). Estos datos indican que la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM4Di expresados en estas células, no altera la densidad y la morfología de la microglía hipocampal.

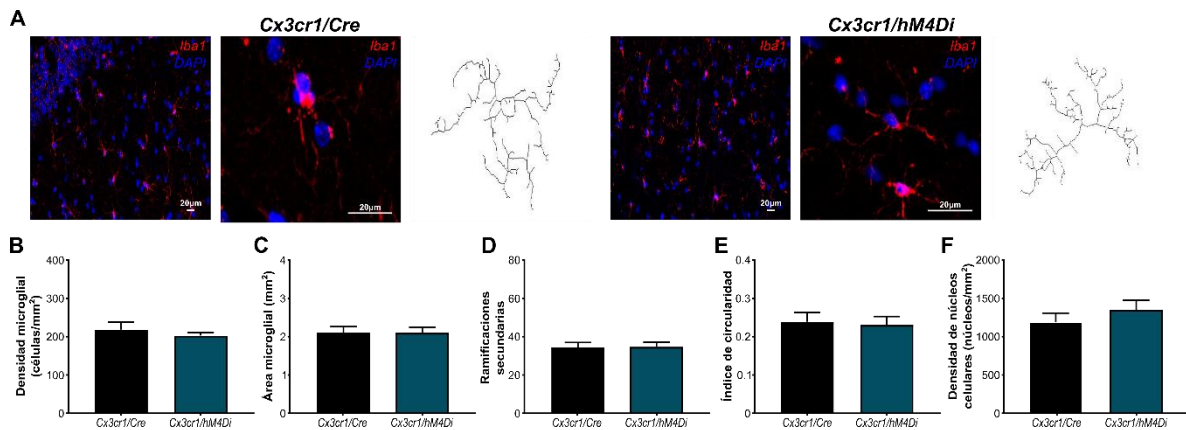


Figura 40. Efecto de la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales sobre la densidad microglial en el hipocampo y la morfología de estas células en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2. A. Micrografías de la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-Iba1 y de DAPI, en el *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo de animales la cepa Cx3cr1/hM4Di ( $n = 60$  células de 7 muestras de 3 animales) y de la cepa control Cx3cr1/Cre ( $n = 60$  células de 7 muestras de 3 animales; izquierda). Adicionalmente se muestra una célula microglial marcada con Iba1 y con DAPI (centro) y el análisis de su esqueleto (derecha). Cuantificación de la densidad microglial (B), el área microglial (C), el número de ramificaciones secundarias (D), el índice de circularidad (E) y la densidad de núcleos celulares (F). Nótese que la inhibición quimiogénica de la activación microglial no alteró la densidad y la morfología de la microglía hipocampal. Las comparaciones

estadísticas de la densidad microglial y la densidad de núcleos celulares se llevaron a cabo con la prueba t de Student, mientras que las comparaciones estadísticas del área microglial, del número de ramificaciones secundarias y del índice de circularidad fueron hechas con la prueba de Mann-Whitney. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

## DISCUSIÓN

En la presente tesis, con la finalidad de profundizar en los mecanismos que subyacen a la comorbilidad entre la epilepsia y el SAOS, se investigó el efecto de la inducción experimental de HIC, que es la principal consecuencia inmediata del SAOS (Dempsey et al., 2010; Labarca et al., 2019), sobre la actividad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (figuras 6 y 7). También, se investigó la reversibilidad de los efectos producidos por la HIC sobre la actividad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (figuras 8 y 9). Adicionalmente, como la activación microglial es un factor común para el desarrollo de la epilepsia y de la HIC (Vezzani & Granata, 2005; Fabene et al., 2010; Smith et al., 2013; Gorter et al., 2015; Sapin et al., 2015; Alyu & Dikmen, 2016; Eyo et al., 2016; Khaspekov & Frumkina, 2017; Webster et al., 2017; Hiragi et al., 2018; Liu et al., 2020), se investigó el papel de las células microgliales en la actividad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad. Para ello, se implementaron diversas estrategias experimentales de manipulación microglial, que incluyeron la manipulación farmacológica no selectiva de la microglía con LPS (figuras 10-12) y la manipulación selectiva de la microglía con optogenética (figuras 13-15) y quimiogenética (figuras 21-25, 36-39).

A la fecha, múltiples reportes han evidenciado la alta comorbilidad entre la epilepsia y el SAOS (Malow et al., 2000; Manni et al., 2003; Vaughn & D'Cruz, 2003; Höllinger et al., 2006; Chihorek et al., 2007; Vendrame et al., 2014; Maurousset et al., 2017; McCarter et al., 2018; Söylemez et al., 2020). Incluso, la presencia de ambas patologías parece exacerbar la condición clínica de estos pacientes, observándose un incremento en la frecuencia y la severidad de las crisis epilépticas (Chihorek et al., 2007; Shaheen et al., 2012; Scharf et al., 2020), así como un agravamiento de los signos/síntomas asociados al SAOS (Malow et al., 2000; Chihorek et al., 2007), impactando la calidad de vida de estos pacientes y aumentando el riesgo de sufrir muerte súbita (Piperidou et al., 2008; Andersen et al., 2012; Hashim et al., 2013; McCarter et al., 2018). Asimismo, también hay reportes que indican que la sola presencia del SAOS parece precipitar la aparición de epilepsia (Höllinger et al., 2006; Chihorek et al., 2007; Milano et al., 2009). Sin embargo, a pesar de estas

evidencias clínicas, hasta esta tesis, no se había estudiado la asociación entre la epilepsia y el SAOS de forma experimental. Por lo anterior, en esta tesis nos planteamos investigar el efecto de la HIC, que es la principal consecuencia inmediata del SAOS (Dempsey et al., 2010; Labarca et al., 2019), sobre la actividad hipocampal y la inducción experimental de hiperexcitabilidad con 4-AP (figuras 6 y 7). En esta serie de experimentos observamos que la HIC por 21 días incrementa ligeramente la actividad hipocampal, particularmente en la banda de frecuencia gamma (figura 6), además de exacerbar la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP (figura 7). Las oscilaciones hipocampales en la banda de frecuencia gamma son el resultado de la interacción entre interneuronas y neuronas piramidales (Hughes, 2008; Merchant et al., 2012; Keeley et al., 2017) y parecen dar cuenta de la interacción entre múltiples circuitos neuronales durante tareas específicas (Montgomery & Buzsáky, 2007; Buzsáky & Schomburg, 2015). La actividad de las interneuronas inhibitorias del hipocampo parece estar alterada en animales sometidos a hipoxia intermitente (Wais et al., 2009). Sin embargo, la inducción de episodios breves de hipoxia en animales neonatos parece no producir alteraciones a largo plazo sobre el número de interneuronas hipocampales positivas a parvalbúmina (Rodríguez-Álvarez et al., 2015; Fernando & Mody, 2015), las cuales están estrechamente implicadas en la generación del ritmo gamma hipocampal (Kann et al., 2014; Merchant et al., 2012). Por otro lado, se ha reportado que la HIC incrementa la neuroinflamación y produce activación microglial (Row et al., 2003; Baronio et al., 2013; Zhang et al., 2015; Liu et al., 2018; Gong et al., 2020). En este sentido, Papageorgiou y colaboradores (2015) reportaron que la activación proinflamatoria de la microglía, con inmógenos como el LPS y el IFN $\gamma$ , produce un incremento de la actividad hipocampal en la frecuencia gamma *in vitro*, además de la liberación de moléculas proinflamatorias, como la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL6. En conjunto, las alteraciones inducidas por la HIC en la frecuencia gamma de la actividad hipocampal podrían ser debidas a alteraciones en la población de interneuronas hipocampales que generan el ritmo gamma, así como a un aumento en la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias, posiblemente provenientes de la microglía que, a su vez, ejercen efectos favorecedores de la excitabilidad

neuronal (Liu et al., 2006; Liu et al., 2013; Liu et al., 2017). Lo anterior, también podría dar cuenta de la correlación positiva que observamos entre la actividad electrofisiológica hipocampal en la banda de frecuencia gamma y la hiperexcitabilidad en los animales expuestos a HIC (figura 7). En primer lugar, pareciera que la inducción de hipoxia, ya sea en animales neonatos o en adultos, resulta en un aumento duradero de la susceptibilidad para presentar actividad epileptiforme, e incluso es capaz de inducir epileptogénesis (Jensen et al., 1991; 1992; 1998; Wais et al., 2009; Bjorkman et al., 2010; Rakhade et al., 2011, 2012; Rodriguez-Alvarez et al., 2015). Asimismo, el patrón electrofisiológico de actividad epileptiforme de tipo ictal observado en los animales tratados con HIC (figura 7), que también ha sido observado en tejido obtenido de animales adultos expuestos a hipoxia neonatal (Jensen et al., 1998), pareciera reflejar un estado de excitabilidad aumentada en el circuito hipocampal. De hecho, el patrón de actividad epileptiforme de tipo ictal es comúnmente observado en tejido obtenido de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente (Reyes-García et al., 2018), mientras que es poco frecuente en tejido obtenido de pacientes sin epilepsia (Reyes-García et al., 2018), así como en tejido obtenido de animales sanos (Jensen et al., 1998), que tiende a exhibir un patrón electrofisiológico de actividad epileptiforme de tipo interictal al ser expuestos a una solución libre de  $Mg^{+}$  (Jensen et al., 1998). Adicionalmente, se ha observado que la actividad aberrante de interneuronas hipocampales positivas a parvalbúmina favorece la aparición del patrón de actividad epileptiforme de tipo ictal *in vitro* (Fujiwara-Tsukamoto et al., 2004; Sessolo et al., 2015). De la misma forma, la aplicación de moléculas proinflamatorias, como la  $IL1\beta$ , también es capaz de favorecer la aparición de actividad epileptiforme de tipo ictal *in vitro* (Chiavegato et al., 2014), así como de exacerbar la hiperexcitabilidad *in vivo* (Vezzani et al., 1999; Kolosowska et al., 2014; 2016; Medel-Matus et al., 2014; Tao et al., 2015). En suma, la exacerbación de la hiperexcitabilidad, así como la aparición de actividad epileptiforme de tipo ictal y el incremento de la excitabilidad hipocampal basal en la banda de frecuencia gamma, observada en los animales sometidos a HIC, podrían ser el resultado de la neuroinflamación inducida por la HIC (Smith et al. 2013; Oyarce & Iturriaga, 2018; Shi et al., 2018; Gong et al., 2020;

Wu et al., 2021), posiblemente mediada por la microglía, y que, a su vez, esté induciendo alteraciones sobre la actividad de las interneuronas hipocampales.

De forma adicional, también se investigó la posible reversibilidad de los efectos producidos por la HIC sobre la actividad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (figuras 8 y 9). En esta serie de experimentos, los animales fueron inducidos a HIC por 21 días y posteriormente sometidos a un periodo de ReOx por 30 días. Nuestros resultados mostraron que los efectos inducidos por la HIC sobre la actividad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP son transitorios, pues ya no se observaron después del periodo de ReOx (figuras 8 y 9). Curiosamente, estos resultados se suman a los efectos neuropatológicos que son inducidos por la HIC y que son transitorios, como la disminución de la ganancia de peso corporal, la hipervascularización y la policitemia (Harik et al., 1996; Kanaan et al., 2005; Huanhuan et al., 2021). Sin embargo, contrastan con otros efectos patológicos inducidos por la HIC que parecen ser permanentes, como la desmielinización y la expresión del transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1, por sus siglas en inglés) en la vasculatura cerebral (Harik et al., 1996; Kanaan et al., 2005). Por otro lado, los reportes clínicos indican que los niveles séricos de moléculas proinflamatorias observados en pacientes con SAOS son revertidos tras recibir un tratamiento con CPAP (Wang et al., 2021), sugiriendo que la neuroinflamación inducida por la HIC también podría ser revertida después un periodo de reoxigenación. De forma similar, es bien sabido que la hiperexcitabilidad y las crisis convulsivas observadas en pacientes con epilepsia que presentan SAOS, disminuyen después de recibir tratamiento con CPAP o intervenciones quirúrgicas en las vías respiratorias superiores (como la tonsilectomía, la adenoidectomía y la uvuloplastía) e inferiores (como la traqueostomía; Vaughn et al., 1996; Chihorek et al., 2007; Manni & Terzaghi, 2010; Vendrame et al., 2011; Segal et al., 2012). Por lo tanto, nuestros resultados sustentan el uso de tratamientos enfocados en el SAOS, como la CPAP o las intervenciones quirúrgicas en las vías respiratorias superiores e inferiores, en pacientes con epilepsia, pues los efectos benéficos de la restauración de la oxigenación pueden ser extendidos al control de la

hiperexcitabilidad y de las crisis convulsivas. Sin embargo, aún queda por investigar el posible rol de la remisión de la neuroinflamación en dichos efectos terapéuticos. En vista de que la neuroinflamación y la activación microglial son consecuencias principales de la inducción experimental de HIC y de epilepsia (Vezzani & Granata, 2005; De Simoni et al., 2000; Ravizza et al., 2008; Row et al., 2003; Vezzani et al., 2011; Aronica & Crino, 2011; Baronio et al., 2013; Zhang et al., 2015; Liu et al., 2018; Gong et al., 2020), se ha hipotetizado que la neuroinflamación y la activación microglial, que resultan de la HIC, son factores importantes que favorecen la excitabilidad neuronal y el desarrollo de hiperexcitabilidad. A este respecto, el efecto de la neuroinflamación sobre la actividad neuronal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental ha sido ampliamente caracterizado en la literatura, en donde se ha observado que la administración o la sobreexpresión de moléculas proinflamatorias, como la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$ , y la IL6, resulta en un aumento de la actividad neuronal y en una facilitación de la inducción de hiperexcitabilidad (Vezzani et al., 2002; 2008; 2011; 2019; Vezzani & Viviani, 2015). De hecho, la administración intracerebral de moléculas proinflamatorias derivadas de la microglía exacerba la actividad neuronal e induce hiperexcitabilidad (Zheng et al., 2010; Zhao et al., 2018), sugiriendo que la activación microglial favorece la generación de hiperexcitabilidad a partir de la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias. Sin embargo, a pesar de estas evidencias, aún no ha sido esclarecido cuál es el papel de la microglía en la inducción experimental de hiperexcitabilidad, debido, en gran medida, a la inespecificidad celular de las estrategias experimentales utilizadas hasta el momento para modular a estas células (Tikka et al., 2001; Kigerl et al., 2014; Peña-Ortega et al., 2016; Möller et al., 2016). En nuestros experimentos en donde manipulamos de forma no selectiva a la microglía a través de la administración intracerebroventricular de LPS, que es una herramienta farmacológica clásicamente utilizada para modular de forma no selectiva a la microglía hacia un fenotipo proinflamatorio (Palsson-McDermott & O'Neill, 2004; Kigerl et al., 2014; Peña-Ortega, 2016; Batista et al., 2019; Bowyer et al., 2020), inesperadamente no se observó un efecto significativo sobre la excitabilidad hipocampal ni sobre la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (figuras 10, 11 y 12).



Estos resultados contrastan con otros estudios en donde se ha observado que la administración de LPS favorece la excitabilidad neuronal y la inducción de hiperexcitabilidad (Sayyah et al. 2003a; Rodgers et al., 2009; Gullo et al., 2014; Kóvacs et al., 2014; Kolosowska et al., 2016). No obstante, otros estudios también han mostrado que la administración de LPS tiene efectos inhibitorios (Sayyah et al., 2003b; Ahmadi et al., 2013; Eslami et al., 2015), así como nulos (Yahas et al., 1995; Sayyah et al., 2003b; Mirrione et al., 2010; Akhlaghi et al., 2012; Ahmadi et al., 2013; Sultan et al., 2021) sobre la excitabilidad neuronal y la inducción de hiperexcitabilidad, inclusive utilizando la misma metodología experimental (Ahmadi et al., 2013; Kolosowska et al., 2016). Aunque aún no ha sido esclarecido cómo es que la administración de LPS produce efectos paradójicos sobre la excitabilidad neuronal y la inducción de hiperexcitabilidad, se puede hipotetizar que este fenómeno puede ser debido a la activación de los múltiples blancos farmacológicos que tiene el LPS, así como a la consecuente activación inmune de cada célula que expresa dichos blancos farmacológicos (Kigerl et al., 2014; Peña-Ortega et al., 2016). Como se mencionó anteriormente, el LPS induce sus efectos a través de una variedad de receptores de membrana, principalmente mediante la activación de los receptores TLR4 (Poltorak et al., 1998; Kigerl et al., 2014; Peña-Ortega et al., 2016), pero también a través de la activación de los receptores *scavenger* (Vishnyakova et al., 2003; Cai et al., 2012; Czerkies et al., 2013; Cao et al., 2016), los receptores de complemento (Kaya et al., 2005; Bodea et al., 2014), los receptores CD14 (Tarassishin et al., 2014), los receptores de potencial transitorio tipo V4 (TRPV4, por sus siglas en inglés; Scheraga et al., 2016; Alpizar et al., 2017), y posiblemente, a través de los receptores TLR2 (Kirschning et al., 1998; Francisco et al., 2022), así como intracelularmente a través de la caspasa 11 (Yang et al., 2015). Asimismo, a pesar de que estos receptores son expresados predominantemente por la microglía (Husemann et al., 2002; Alarcón et al., 2005; Maroso et al., 2010; Veerhuis et al., 2011; Kettenmann et al., 2011; Shen et al., 2016), también son expresados por otros tipos celulares en el cerebro, incluyendo los astrocitos (Husemann et al., 2002; Alarcón et al., 2005; Maroso et al., 2010; Crosio et al., 2011; Veerhuis et al., 2011; Godoy et al., 2012; Shen et al., 2016), los oligodendrocitos (Sloane et al., 2010;

Kremer et al., 2013), las células endoteliales (Duperray et al., 2015; Fung et al., 2017) y las neuronas (Maroso et al., 2010; Veerhuis et al., 2011; Leow-Dyke et al., 2012; Shen et al., 2016; Calvo-Rodríguez et al., 2017). Lo anterior, podría dar cuenta de la variabilidad de efectos observados tras la aplicación de LPS, pues, si bien, la activación de algunos de los receptores antes mencionados resulta en efectos proinflamatorios y citotóxicos, como en el caso de los receptores TLR4 (Kinsner et al., 2006; Sloane et al., 2010; Rannikko et al., 2015; Liu et al., 2016; Shen et al., 2016; Calvo-Rodríguez et al., 2017), los receptores TLR2 (Kinsner et al., 2006; Sloane et al., 2010; Liu et al., 2016), los receptores de complemento (Bodea et al., 2014) y la caspasa 11 (Chen et al., 2018; Tang et al., 2018); la activación de otros receptores que reconocen al LPS resulta en efectos opuestos (Yi et al., 2009; Zanoni et al., 2011; Cai et al., 2012; Konno et al., 2012; Yang et al., 2015; Mannaa et al., 2018). Por ejemplo, la activación de los receptores *scavenger* tipo A y B, que son expresados por la microglía, los astrocitos y las células endoteliales (Husemann et al., 2002; Alarcón et al., 2005; Yang et al., 2015; Yung et al., 2017), regula negativamente la síntesis y la liberación de moléculas proinflamatorias, como la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL6, además de favorecer la sobrevivencia neuronal (Yi et al., 2009; Cai et al., 2012; Yang et al., 2015). También, la activación de los receptores CD14, que están expresados en la microglía y los astrocitos (Tarassishin et al., 2014; Martin et al., 2017), inhibe la síntesis y la liberación de TNF $\alpha$  (Zanoni et al., 2011). Asimismo, la activación de los receptores TRPV4, que son expresados por las neuronas (Butenko et al., 2012), los astrocitos (Butenko et al., 2012), las células endoteliales (Monaghan et al., 2015) y la microglía (Kong et al., 2019), inhibe la síntesis y liberación de TNF $\alpha$  y evita la muerte celular inducida por citotoxicidad (Konno et al., 2012; Mannaa et al., 2018). En conjunto, estos resultados sugieren que los efectos paradójicos de la administración de LPS podrían deberse a la activación inespecífica de los blancos farmacológicos de este inmunógeno, de manera dependiente del estado de los diferentes tipos celulares. En el mismo sentido, también se ha hipotetizado que los efectos del LPS dependen de la ruta de señalización, es decir, extracelular o intracelular, debido a que el LPS aplicado de forma intracelular induce efectos opuestos a los inducidos por el LPS aplicado de

forma extracelular (Seitzer & Gerdes, 2002; Gerth et al., 2005). Seitzer y Gerdes (2002), así como Gerth y colaboradores (2005), reportaron que la administración extracelular de LPS *in vitro* en cultivos de células mononucleares sanguíneas humanas indujo un aumento de las corrientes salientes de K<sup>+</sup>, un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, la activación de NFκB y la síntesis de moléculas proinflamatorias, como la IL1β y la IL6 (Seitzer & Gerdes, 2002; Gerth et al., 2005), que son indicadores de activación proinflamatoria (Kettenmann et al., 2011). En contraste, estos mismos autores también observaron que la microinyección de LPS en el citoplasma de estas células, una condición experimental que simula la internalización del LPS llevada a cabo por los receptores *scavenger* (Vishnyakova et al., 2003) y que podría ser independiente de la activación de la caspasa 11 (Hagar et al., 2013), resultó en una disminución de las corrientes salientes de K<sup>+</sup>, pero no en la activación del factor de transcripción NFκB o en el aumento de la síntesis de moléculas proinflamatorias (Seitzer & Gerdes, 2002; Gerth et al., 2005), sugiriendo que el LPS intracelular no induce la activación de vías de señalización proinflamatorias. Finalmente, la activación inmune de cada tipo celular que expresa los receptores activados por el LPS podría tener efectos diferenciales (Balosso et al., 2005), que pueden depender del estado de cada tipo celular (Beschoner et al., 2002; Osorio et al., 2007; Zurolo et al., 2011; Gómez-Eguílaz et al., 2018; Kundap et al., 2019; Wei et al., 2021; Zheng et al., 2022). Por ejemplo, la administración sistémica o intracerebroventricular de TNFα (Shandra et al., 2002; Riazi et al., 2008), así como la sobreexpresión de esta citocina en el hipocampo (Weiberg et al., 2013), favorece la inducción de hiperexcitabilidad neuronal. Sin embargo, Balosso y colaboradores (2005) reportaron que la sobreexpresión de TNFα en los astrocitos reduce la actividad convulsiva inducida con ácido kaínico. Estos autores también mostraron que animales que carecen del receptor TNFR tipo 2, expresado en prácticamente todas las células del cerebro (Zelová & Hošek, 2013; Frago et al., 2014), presentan una actividad convulsiva exacerbada (Balosso et al., 2005), sugiriendo que este receptor podría mediar los efectos antiepiléptiformes del TNFα sintetizado y liberado por los astrocitos. Adicionalmente, se ha observado que los receptores a los que se acopla el LPS aumentan su expresión en condiciones patológicas (Beschoner et al., 2002;

Osorio et al., 2007; Zurolo et al., 2011; Gómez-Eguílaz et al., 2018; Kundap et al., 2019; Wei et al., 2021; Zheng et al., 2022), sugiriendo que el efecto del LPS sobre la fisiología de las células que expresan estos receptores podría depender también del estado de los circuitos neuronales. En conjunto, se sugiere que las consecuencias biológicas de la administración de LPS sobre la excitabilidad neuronal y la inducción de hiperexcitabilidad podrían depender de los receptores activados por el LPS (Kigerl et al., 2014) y de los tipos celulares involucrados en dicha activación (Balosso et al., 2005), así como del estado de cada uno de estos tipos celulares en un momento dado (Beschoner et al., 2002; Osorio et al., 2007; Zurolo et al., 2011; Gómez-Eguílaz et al., 2018; Kundap et al., 2019; Wei et al., 2021; Zheng et al., 2022). Por otro lado, la administración sistémica de LPS induce neuroinflamación a partir de 4-6 horas de su administración (Batista et al., 2019), sugiriendo que, en nuestros resultados, la falta de efecto de la administración de LPS podría deberse a que la cascada de señalización que resulta en la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B necesita de más tiempo para llevarse a cabo, independientemente del receptor activado por el LPS (por ejemplo, los receptores TLR4, los TRPV4, los CD14, entre otros),. Con respecto a este punto, la latencia para inducir neuroinflamación se ve reducida cuando el LPS es administrado directamente en el cerebro, por ejemplo, de forma intracerebroventricular, en comparación con la administración sistémica de este inmunógeno (Quan et al., 1994). Por ejemplo, Quan y colaboradores (1994) administraron LPS de forma intraperitoneal en roedores y observaron un incremento en la expresión de IL1 $\beta$  en el cerebro después de 6 horas de haber administrado el inmunógeno. Por otro lado, en este mismo estudio observaron que la administración intracerebroventricular de LPS indujo un aumento en la expresión de IL1 $\beta$  en el cerebro a partir de 2 horas de la administración del inmunógeno (Quan et al., 1994). Sin embargo, 2 horas fue el tiempo mínimo en el que estos autores buscaron cambios. Otras investigaciones similares han mostrado cambios en la expresión de IL1 $\beta$  desde 1 hora después de la administración de LPS (De Simoni et al., 1995). Sin embargo, una vez más, 1 hora fue el tiempo mínimo en el que estos autores buscaron cambios, por lo que los efectos del LPS sobre la expresión de IL1 $\beta$  podrían ocurrir con una menor latencia.

A este respecto, investigaciones más recientes han mostrado que la administración intracerebral de LPS induce un aumento en la expresión hipocampal de IL1 $\beta$  y de óxido nítrico a partir de 30 minutos de la administración de LPS (Ahmadi et al., 2013). Asimismo, se ha observado un aumento en la concentración de glutamato y de la excitabilidad neuronal en el hipocampo, a partir de 30 minutos de la administración intrahipocampal o intracerebroventricular de LPS (Ahmadi et al., 2013; Kolosowska et al., 2016). Adicionalmente, varios estudios han demostrado que la administración de LPS *in vitro* es capaz de inducir la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B a partir de 15-30 minutos de la administración de LPS (Sharif et al., 2007; Santa-Cecilia et al., 2016; Nie et al., 2019). En conjunto, estos estudios sugieren que la ventana temporal de ~60 minutos en la que en esta tesis se analizaron los efectos de la administración intracerebroventricular de LPS sobre la excitabilidad neuronal y la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP, son suficientes para inducir la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B y la transcripción de moléculas proinflamatorias como la IL1 $\beta$ . Sin embargo, lo anterior queda por ser confirmado de forma experimental. En resumen, nuestros resultados se suman a la controversia sobre el papel de la microglía en la modulación de la excitabilidad e hiperexcitabilidad neuronal, que se ha derivado del uso de manipulaciones farmacológicas para orientar a la microglía hacia un estado proinflamatorio y que, como se mencionó anteriormente, carecen de especificidad celular, ya que sus blancos farmacológicos se encuentran expresados en múltiples tipos celulares en el cerebro (Kigerl et al., 2014; Peña-Ortega et al., 2016).

Por lo anterior, se hace necesario el uso de estrategias experimentales que permitan manipular de forma selectiva a la microglía para estudiar los efectos específicos de la modulación de estas células sobre la actividad neuronal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental. Para abordar este problema, como primera aproximación se utilizó a la optogenética, que es una herramienta de manipulación celular que consiste en la expresión de canales catiónicos sensibles a la luz azul, llamados ChR2, en un tipo celular específico (Deisseroth, 2011; 2015), y que, en nuestro caso, fue usada para modular a la microglía y a los macrófagos no parenquimales del hipocampo. Para ello, se generó una cepa de animales

transgénicos que expresan a la ChR2 bajo el control del promotor del gen *Cx3cr1*, que en el cerebro se encuentra expresado exclusivamente en la microglía y en los macrófagos no parenquimales (Nishiyori et al., 1998; Goldman et al., 2016; Shemer et al., 2018; Van Hove et al., 2019). Acorde con la literatura, la activación optogenética de las células microgliales resulta en un aumento en los niveles de moléculas proinflamatorias, así como en cambios morfológicos en estas células (Sawada, 2012; Laprell et al., 2021; Yi et al., 2021b), es decir, que la estimulación optogenética de la microglía modula a la microglía hacia un fenotipo proinflamatorio. Nuestros resultados mostraron que la estimulación optogenética del hipocampo de animales de la cepa *Cx3cr1/ChR2* resultó en un aumento sustancial de la excitabilidad hipocampal, así como en la exacerbación de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (figuras 13, 14 y 15). Adicionalmente, mostramos que la estimulación optogenética incrementó la densidad microglial en el hipocampo y produjo cambios en la estructura de estas células hacia una morfología ameboide 60 minutos después de la estimulación optogenética (figura 16). Efectos similares también fueron reportados previamente en nuestro laboratorio, con la estimulación optogenética del bulbo olfatorio y del tallo cerebral de animales de la cepa *Cx3cr1/ChR2*, en donde se observó un aumento de la densidad microglial y una morfología ameboide en estas células, 120 minutos después de la estimulación con luz azul (Rojas-García, 2018; Lorea-Hernández, 2020). También, Yi y colaboradores (2021b) mostraron que 24 horas después de la estimulación optogenética de la microglía de la médula espinal incrementó la densidad microglial y el número de microglías positivas a Ki67, un marcador de proliferación celular (Scholzen & Gerdes, 2000), sugiriendo que la estimulación optogenética de la microglía incrementa de forma aguda la proliferación de estas células. Sin embargo, desafortunadamente, también observamos que una baja proporción de células microgliales expresaron la proteína ChR2 (figura 17) y, por otro lado, que la estimulación optogenética indujo un incremento transitorio de la actividad neuronal, altamente acoplada con el estímulo optogenético (figuras 18), sugiriendo que la proteína ChR2 también podría estar expresada en las neuronas hipocampales. A este respecto, Yi y colaboradores (2021b) también observaron expresión

inespecífica de la opsina canalrodopsina activada por luz roja (ReaChR, por sus siglas en inglés) utilizando al promotor del gen *Cx3cr1*. En contraste con nuestros resultados, estos autores observaron una alta tasa de expresión de la opsina en las células microgliales (~95 %), sin embargo, también observaron la expresión de la opsina ReaChR en aproximadamente el 10 % de las neuronas y de los astrocitos de la médula espinal (Yi et al., 2021b). En el mismo sentido, Laprell y colaboradores (2020) observaron una alta expresión de la proteína ChR2 en células microgliales utilizando al promotor del gen *Cx3cr1*, sin embargo, también observaron expresión inespecífica en células no microgliales. Al parecer, en nuestros experimentos, la expresión inespecífica de la proteína ChR2 provino de la cepa progenitora Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP) utilizada para generar la cepa *Cx3cr1/ChR2*, debido a que la proteína ChR2 se expresó ampliamente en el hipocampo de estos animales en ausencia de la recombinasa Cre (figura 19). En otros contextos experimentales, en donde se ha utilizado a la cepa progenitora Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP) para expresar a la proteína ChR2 en neuronas, también se ha observado expresión inespecífica de esta opsina (Hedrick & Waters, 2015; Hedrick et al., 2016; Prabhakar et al., 2019; Luo et al, 2020). Por ejemplo, Hedrick y Waters (2015) observaron que los animales que resultan de la cruce entre animales de la cepa Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP) y animales de la cepa *ChaT-Cre*, que expresan a la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen del transportador de acetilcolina (Rossi et al., 2011), expresaron a la proteína ChR2 en neuronas colinérgicas, así como en neuronas glutamatérgicas. En una publicación posterior, mediante inmunofluorescencia, estos autores observaron que la proteína ChR2 se expresó en una alta proporción de neuronas colinérgicas, pero también en una amplia cantidad de células no neuronales (Hedrick et al., 2016). Asimismo, Luo y colaboradores (2020) observaron que los animales que resultan de la cruce entre animales de la cepa Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP) y animales de la cepa *Dlx5/6-Cre*, que expresan a la recombinasa Cre bajo el control del promotor de los genes *dlx5* y *dlx6* expresados exclusivamente en interneuronas GABAérgicas (de Lombares et al., 2019), también expresaron a la proteína ChR2 en neuronas piramidales glutamatérgicas. Adicionalmente,

Prabhakar y colaboradores (2019) reportaron que los animales de la cepa Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP) expresaron ampliamente a la proteína ChR2 en diferentes regiones cerebrales y tipos celulares, en ausencia de la recombinasa Cre. Juntos, estos resultados sugieren que la expresión inespecífica de la proteína ChR2, posterior a la recombinación Cre-LoxP, o incluso en su ausencia, es debida al uso de la cepa progenitora Gt(ROSA)26Sor(CAG-H134R/EYFP). A pesar de que el sistema Cre-LoxP es un método ampliamente utilizado en la actualidad para la inserción o delección de transgenes en tipos celulares específicos (Kim et al., 2018), aún se desconoce el mecanismo por el que, en algunas cepas de animales, un gen doblefloxeado es espontáneamente expresado en ausencia de la recombinasa Cre, fenómeno llamado recombinación ectópica (Eckardt et al., 2004; Song & Palmer, 2018). Se ha sugerido que la recombinación ectópica de un transgén podría deberse a la pérdida de las secuencias Lox-P por procesos epigenéticos, como la metilación del material genético (Eckardt et al., 2004; Song & Palmer, 2018; Lou et al., 2020). Sin embargo, lo anterior aguarda a ser corroborado de forma experimental. Estos hallazgos sugieren que los efectos que observamos sobre la excitabilidad hipocampal, la inducción de hiperexcitabilidad y la morfología microglial, podrían deberse a la estimulación optogenética de múltiples tipos celulares, además de la microglía y los macrófagos no parenquimales. A este respecto, la expresión y estimulación de la ChR2 en neuronas excitatorias o inhibitorias, es capaz de promover la inducción de hiperexcitabilidad neuronal (Osawa et al., 2013; Sessolo et al., 2015; Berglind et al., 2018; Chen et al., 2020). Por otro lado, algunos estudios han reportado que la estimulación optogenética de los astrocitos incrementa la excitabilidad neuronal (Gourine et al., 2010; Perea et al., 2014; Kovács et al., 2017). En contraste, a la fecha no existen publicaciones que den cuenta del efecto de la estimulación optogenética de los oligodendrocitos o de las células endoteliales cerebrales sobre la excitabilidad neuronal. En suma, con esta aproximación experimental no nos fue posible concluir que los efectos favorecedores de la excitabilidad hipocampal y de la hiperexcitabilidad neuronal observados en nuestros experimentos resulten de la estimulación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales. Es por ello que, valiéndonos de otra estrategia



experimental de manipulación celular específica, nos propusimos visitar nuestra pregunta de investigación.

Utilizando a la quimiogenética para manipular de forma selectiva a la microglía y a los macrófagos no parenquimales nos propusimos investigar el efecto de la activación quimiogenética de estas células sobre la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad. Para ello, se generó una cepa de animales transgénicos que expresan al DREADD hM3Dq bajo el control del promotor del gen *Cx3cr1*, que en el cerebro se encuentra expresado exclusivamente en células microgliales y en macrófagos no parenquimales (Nishiyori et al., 1998; Goldman et al., 2016; Shemer et al., 2018; Van Hove et al., 2019), permitiéndonos, de acuerdo con la literatura (Grace et al., 2018; Binning et al., 2020; Saika et al., 2021; Kladow et al., 2021), activar a la microglía y a los macrófagos no parenquimales de forma selectiva. La caracterización de la expresión del DREADD hM3Dq en la microglía hipocampal, a través de la fluorescencia de la proteína fluorescente mCitrina, nos permitió comprobar que los DREADDs hM3Dq se encuentran expresados de forma exclusiva en una alta proporción de células microgliales hipocampales (figura 20), así como en macrófagos no parenquimales de los espacios perivasculares (Anexo 4). Con lo anterior, no podemos descartar la posible expresión de los DREADDs hM3Dq en los macrófagos no parenquimales de las meninges y de los plexos coroideos, debido a que estas células también expresan al gen *Cx3cr1* (Shemer et al., 2018; Van Hove et al., 2019). Nuestros resultados son similares a lo reportado por Jung y colaboradores (2000), quienes expresaron por primera vez a la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor del gen *Cx3cr1* y observaron una colocación exclusiva con marcadores microgliales, resultado que ha sido corroborado por otros grupos de investigación (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). En este sentido, resultados similares han sido reportados en cuanto a la expresión de los DREADDs hM3Dq bajo el control del promotor del gen *Cx3cr1*, observándose una alta expresión de los DREADDs hM3Dq en células microgliales y una nula expresión en neuronas y astrocitos (Binning et al., 2020; Saika et al., 2021; Klawonn et al., 2021). Nuestros resultados mostraron que la manipulación quimiogenética de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, a través de

la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, produjo un aumento sustancial de la excitabilidad hipocampal e incluso, fue suficiente para generar hiperexcitabilidad neuronal en animales anestesiados (figuras 21 y 25). Adicionalmente, la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales potenció la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP y con PTZ, mostrando que dicho efecto es independiente del mecanismo utilizado para inducir hiperexcitabilidad (figuras 23, 24 y 25). Asimismo, la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales produjo un aumento en la liberación de IL1 $\beta$  hipocampal (anexo 7) y en la densidad microglial en el hipocampo, así como cambios en la estructura de estas células hacia una morfología hipertrófica, ~60 minutos después de la administración intracerebroventricular de CNO (figura 26). Lo anterior, es similar a lo reportado en la literatura y en resultados previos de nuestro laboratorio (Grace et al., 2018; Lorea-Hernández, 2020; Klawonn et al., 2021; Saika et al., 2021). Por ejemplo, Grace y colaboradores (2018), quienes fueron los primeros en expresar los DREADDs hM3Dq en la microglía, observaron que la activación quimiogénica de las células microgliales resultó en un aumento en la expresión y liberación de varias moléculas proinflamatorias, como la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL6, en células microgliales tipo BV2 *in vitro*. Posteriormente, Binning y colaboradores (2020), observaron que la activación quimiogénica de la microglía, a través de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, produjo un aumento de la expresión de la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL6 en el hipocampo. Por otro lado, Klawonn y colaboradores (2021), mediante la expresión viral de los DREADDs hM3Dq en la microglía, observaron que la activación quimiogénica de estas células produce un aumento en la expresión de moléculas proinflamatorias en el estriado dorsal, incluyendo la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL6. Adicionalmente, Saika y colaboradores (2021), reportaron que después de la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía, ocurrió un incremento en la expresión de IL1 $\beta$  y de TNF $\alpha$  en la médula espinal. También, en resultados previos de nuestro laboratorio, se ha observado que la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, a través de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, conlleva a un aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

en el tallo cerebral *in vitro* (Lorea-Hernández, 2020). En cuanto a los cambios observados en la morfología y densidad microglial como consecuencia de la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células y en los macrófagos no parenquimales, resultados semejantes han sido observados en la literatura y en resultados previos de nuestro laboratorio, en cursos temporales similares a los observados en esta tesis (Binning et al., 2020; Saika et al., 2021; Lorea-Hernández, 2020). Por ejemplo, Binning y colaboradores (2020) observaron que la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía es capaz de inducir un cambio morfológico en estas células y de aumentar la capacidad fagocítica de la microglía *in vitro*, 45 minutos después de la administración de CNO. Por otro lado, resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en macrófagos no parenquimales del tallo cerebral induce una morfología microglial hipertrófica, 120 minutos después de la activación *in vitro* de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales (Lorea-Hernández, 2020). De forma similar, Saika y colaboradores (2021) observaron que la manipulación quimiogénica de la microglía, a través de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, aumentó el número de células microgliales en la médula espinal y cambió la morfología de estas células hacia una forma hipertrófica, 24 horas después de la administración intratecal de CNO. En conjunto, estas evidencias, y nuestros resultados, sugieren que la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, a través de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, es capaz de inducir un cambio morfológico y de aumentar el número de células microgliales, al menos, 60 minutos después de la administración de CNO, y que estos cambios pueden ser observados hasta 24 horas después (Saika et al., 2021). Adicionalmente, este cambio estructural de la microglía hacia una morfología hipertrófica, caracterizada por un incremento del área y de los procesos de la microglía (figura 26), podría estar reflejando un incremento de la “vigilancia” de los procesos microgliales hacia los sitios con alta actividad sináptica, como lo han sugerido Eyo y colaboradores (2014), pues la inducción de hiperexcitabilidad conlleva a la liberación de moléculas quimioatrayentes, como el

ATP o el glutamato liberado por las neuronas (Beamer et al., 2019), resultando en un incremento en el número de procesos microgliales, así como en un incremento en la extensión de los procesos microgliales hacia las neuronas (Dávalos et al., 2005; Koizumi et al., 2013; Eyo et al., 2014; 2016; Peng et al., 2019; Cserép et al., 2020). En el mismo sentido, en otros contextos experimentales se han observado cambios morfológicos en la microglía, así como en la densidad de estas células, en cursos temporales similares a los observados en nuestros resultados (Roth et al., 2013; Heo et al., 2016; Schmidt-Pogoda et al., 2018; Elmadany et al., 2020; Gao et al., 2022). Por ejemplo, Roth y colaboradores (2012), utilizando microscopía de dos fotones, observaron que la microglía cortical adquiere una morfología hipertrófica y que aumenta la densidad de estas células, 30 minutos después de haber inducido un traumatismo craneoencefálico *in vivo*. Por otro lado, Heo y colaboradores (2016), también utilizando microscopía de dos fotones, reportaron que minutos después de la administración intracortical *in vivo* de un marcador fluorescente, llamado Cy3, resultó en un cambio morfológico de la microglía y en un aumento de la densidad de estas células en la zona en donde se inyectó el marcador. Adicionalmente, Gao y colaboradores (2022) mostraron que 60 minutos después de la ligación bilateral de la arteria carótida común, se observó un aumento de células microgliales positivas a bromodesoxiuridina (BrdU), que es un marcador de proliferación celular (Taupin, 2007), en la corteza cerebral. Por otro lado, en cultivos primarios de microglía, se ha observado que estas células adquieren una morfología ameboide y que se induce su migración, así como la liberación de citocinas, después de 60-180 minutos de haber aplicado una solución con de cloruro de Na<sup>+</sup> (40 mM; Schmidt-Pogoda et al., 2018). También, Elmadany y colaboradores (2020), así como El Gaamouch y colaboradores (2020), reportaron que la administración de TLQP21, que es un péptido codificado por el gen *VGF* (nombre no acronímico; Bresciani et al., 2019), induce un cambio morfológico en la microglía, así como actividad fagocítica y la migración de estas células, a partir de 30 minutos de la administración de TLQP21 en cultivos primarios de microglía y en células microgliales tipo BV2. A pesar de que aún no es claro cómo es que la activación de los DREADDs hM3Dq induce estos cambios fenotípicos en la microglía, se puede hipotetizar que su

mecanismo puede ser similar al de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gq expresados en la microglía (Alvarez-Curto et al., 2010; 2011). Todos los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gq, al ser activados, siguen una cascada de señalización intracelular clásica que involucra la dimerización de la subunidades  $G\alpha_q$  y  $G\beta/\gamma$ , la estimulación de la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés) por parte de la subunidad  $G\alpha_q$  y la hidrólisis del fosfolípido fosfatidilinositol difosfato ( $PIP_2$ , por sus siglas en inglés) por parte de la subunidad  $G\alpha$ , dando lugar al diacilglicerol (DAG) y al inositol trifosfato ( $IP_3$ , por sus siglas en inglés) (Siegel et al., 2005; Alberts et al., 2015). A su vez, el  $IP_3$  es liberado al citoplasma en forma soluble en donde activa a sus receptores en la membrana del retículo endoplásmico, provocando la salida de calcio desde el lumen de este organelo hacia el citoplasma (Siegel et al., 2005; Alberts et al., 2015). El aumento de calcio en el citoplasma de la microglía resulta en una serie de procesos fisiológicos, entre los que destacan la activación de canales de calcio activados por calcio (CRAC, por sus siglas en inglés), también llamados receptores de rianodina, que aumentan aún más la concentración citosólica de calcio (Möller, 2002; Kettenmann et al., 2011); la apertura de canales de potasio activados por calcio, resultando en la salida de potasio hacia el espacio extracelular; y en la síntesis de óxido nítrico a través de la sobrerregulación de la iNOS, mediante la fosforilación de la MAPK p38 (Möller, 2002; Kaushal et al., 2007; Kettenmann et al., 2011); así como la activación de proteínas acopladas a calcio, como la calmodulina, cuyos efectores río abajo promueven la translocación al núcleo de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y factor nuclear de células T activadas (NFAT, por sus siglas en inglés), resultando en la síntesis de moléculas proinflamatorias, la reorganización del citoesqueleto, la proliferación y la migración microglial, así como en un aumento de la actividad fagocítica de estas células (Casal et al., 2001; Möller, 2012; Nagamoto-Combs & Combs, 2010; Szabo et al., 2016; Thangthaeng et al., 2018; Franco-Bocanegra et al., 2019). En estado fisiológico (no patológico), la microglía expresa múltiples tipos de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gq (Kettenmann et al., 2011; Verkhatsky & Noda, 2014), como los receptores purinérgicos P2Y $1/2/6$ , los receptores colinérgicos M $1/3$ , los receptores noradrenérgicos  $\alpha 1A$ , los receptores

serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> y los receptores de histamina H<sub>1</sub>, que, al ser activados *in vitro*, inducen un aumento de calcio en el citosol, la síntesis de moléculas proinflamatorias, la reorganización del citoesqueleto y la proliferación y migración microglial (Kettenmann et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Gyoneva & Trayneli, 2013; Koizumi et al., 2013; Bernier et al., 2013; Glebov et al., 2014; Verkhatsky & Noda, 2014; Fukumoto et al. 2018). Lo anterior es de gran relevancia, pues supone que la señalización y los efectos producidos por la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales también pueden ser inducidos por la activación de receptores no mutantes presentes en estas células. Sin embargo, el uso de la quimiogenética permite la modulación exclusiva de los macrófagos cerebrales, mientras que la activación farmacológica de receptores no mutantes no lo permite en preparaciones *in vivo* (Urban & Roth, 2007; Ben-Shaanan et al., 2016; Dobrzanski & Kossut, 2017; Goutaudier et al., 2019), puesto que estos receptores también son expresados por otros tipos celulares en el cerebro (Siegel et al., 2005). No obstante, a pesar de que se ha comprobado que la activación de los DREADDs hM3Dq en la microglía y de los macrófagos no parenquimales resulta en un aumento en la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias, entre ellas la IL1 $\beta$  (Anexo 8; Grace et al., 2018), así como en un incremento de la actividad fagocítica microglial (Binning et al., 2020), aún falta por esclarecer si su activación también tiene como resultado la migración y la proliferación microglial, similar a lo observado tras la aplicación *in vitro* de inmunógenos como el LPS (Casal et al., 2001; Möller, 2012; Nagamoto-Combs & Combs, 2010; Szabo et al., 2016; Thangthaeng et al., 2018; Franco-Bocanegra et al., 2019; Bowyer et al., 2020), así como su persistencia a través del tiempo. Similar a lo observado con la manipulación quimiogenética de la microglía, se ha reportado un aumento en la densidad microglial y células microgliales con morfología hipertrófica en tejido extraído de pacientes con epilepsia y en modelos experimentales de epilepsia (Beach et al., 1995; De Simoni et al., 2000; Pernet et al., 2015; Sabilallah et al., 2016; Altmann et al., 2021; Di Nunzio et al., 2021), sugiriendo que estos cambios fenotípicos en la microglía podrían dar cuenta de la participación activa de estas células en el desarrollo de hiperexcitabilidad.

Por otro lado, pudimos observar que los efectos de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y sobre la inducción de hiperexcitabilidad, pero no sobre la hiperexcitabilidad ya inducida, son mediados principalmente por la señalización del IL1R (figuras 27-29). Tomando en cuenta que el receptor IL1R tipo 1 se encuentra mayoritariamente expresado en las neuronas (Viviani et al., 2006; He et al., 2019; Liu et al., 2019), nuestros resultados sugieren que la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales induce sus efectos sobre la excitabilidad neuronal a través de promover la síntesis y liberación de IL1 $\beta$  por parte de la microglía y de los macrófagos no parenquimales y, posteriormente, la activación del receptor IL1R tipo 1 en las neuronas hipocampales. En concordancia con esta hipótesis, Grace y colaboradores (2018) demostraron que los efectos producidos por la activación quimiogénica de la microglía de la médula espinal, a través de la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, sobre el umbral del dolor pueden ser bloqueados mediante la administración de la proteína IL1Ra (Grace et al., 2018). Curiosamente, la administración de la proteína IL1Ra en modelos experimentales de epilepsia resulta en un potente efecto protector, observándose menor severidad y frecuencia de la actividad convulsiva, así como menor muerte neuronal y microgliosis reactiva (Vezzani et al., 1999; 2000; Noe et al., 2013; Feng et al., 2016). Asimismo, los animales carentes del receptor IL1R tipo 1 muestran una menor susceptibilidad para desarrollar actividad convulsiva (Feng et al., 2016). Con lo anterior, decidimos investigar más a fondo los mecanismos implicados en el efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y su hiperexcitabilidad, a través de la aplicación intracerebroventricular de IL1 $\beta$  (figuras 31, 35, 33 y 34). Nuestros resultados mostraron que la administración de esta citocina proinflamatoria incrementa la excitabilidad hipocampal y exacerba la inducción de hiperexcitabilidad (figuras 31-33), similar a lo observado con la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales. Lo anterior, refuerza la hipótesis antes mencionada acerca de que los efectos inducidos por la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos

no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad son dependientes de la señalización de la IL1 $\beta$  y de su receptor IL1R tipo 1. Por otra parte, nuestros resultados también mostraron que la aplicación intracerebroventricular de IL1 $\beta$ , así como de la proteína IL1Ra, no produjo efectos sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP (figuras 30 y 34). A este respecto, se puede hipotetizar que el establecimiento de la hiperexcitabilidad es capaz de modificar la respuesta neuronal ante manipulaciones que, aplicadas en estado fisiológico, producen un efecto claro sobre la actividad epileptiforme, es decir, un efecto antiepileptiforme o proepileptiforme. Este efecto paradójico ha sido poco estudiado en la literatura, sin embargo, se ha reportado con la aplicación de benzodiazepinas y de agonistas de los receptores purinérgicos P2Y1 durante la hiperexcitabilidad ya establecida (Gaínza-Lein et al., 2019; Alves et al., 2019; Burman et al., 2019), así como con la aplicación de nociceptina durante la epileptogénesis (Carmona-Aparicio et al., 2007), con la administración de agonistas de los receptores a cannabinoides tipo 1 (CB1R, por sus siglas en inglés) en modelos de hiperexcitabilidad (Rosenberg et al., 2015; Martínez-Aguirre et al., 2022) y con la aplicación de estimulación cerebral profunda en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente a fármacos (Velasco et al., 2000; Cuéllar-Herrera et al., 2004; Rocha et al., 2007). Por ejemplo, antes de la inducción de hiperexcitabilidad, la aplicación de benzodiazepinas tiene un efecto antiepileptiforme (Mazarati et al., 1998; Jones et al., 2002; Heldt & Ressler, 2010; Burman et al., 2022), e incluso, las benzodiazepinas son ampliamente utilizadas en la clínica para prevenir la aparición de crisis epilépticas (Gaínza-Lein et al., 2019; Burman et al., 2022). Sin embargo, durante la hiperexcitabilidad ya establecida, la aplicación de benzodiazepinas pierde su efecto antiepileptiforme (Mazarati et al., 1998; Jones et al., 2002; Gaínza-Lein et al., 2019; Burman et al., 2019; 2022). Por otro lado, Alves y colaboradores (2019) mostraron que la activación de los receptores purinérgicos P2Y1 antes de la inducción de *status epilepticus* con ácido kaínico tiene efectos antiepileptiformes, disminuyendo la potencia de la actividad epileptiforme y la astrogliosis hipocampal. En contraste, la activación de los receptores purinérgicos P2Y1 durante el *status epilepticus* inducido con ácido kaínico, tiene efectos proepileptiformes, exacerbando



aún más la hiperexcitabilidad neuronal y la astrogliosis hipocampal (Alves et al., 2019). Los efectos paradójicos de las benzodiazepinas y de la activación de los receptores purinérgicos P2Y1 han sido explicados por cambios inducidos por la hiperexcitabilidad sobre la disponibilidad de los receptores GABA<sub>A</sub> y P2Y1, respectivamente, en la membrana celular de las neuronas y de las células gliales (Gaínza-Lein et al., 2019; Alves et al., 2019). Específicamente, durante la actividad epileptiforme, los receptores GABA<sub>A</sub>, que son el blanco farmacológico de las benzodiazepinas (Sigel & Ernst, 2018), disminuyen su expresión en la membrana celular de las neuronas (Goodkin et al., 2008; Heldt & Ressler, 2010; Burman et al., 2022), lo que reduce la capacidad de las benzodiazepinas para disminuir la hiperexcitabilidad neuronal (Goodkin et al., 2008; Heldt & Ressler, 2010; Burman et al., 2019; Burman et al., 2022). Por otro lado, en cuanto a los receptores purinérgicos P2Y1, estos son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gq que son activados por el ATP y el ADP (Meng & Yao, 2020). En condiciones fisiológicas, los receptores purinérgicos P2Y1 se encuentran expresados en las neuronas, de forma presináptica (Simões et al., 2018; Alves et al., 2019), por lo que, al ser activados por el ATP coliberado durante la neurotransmisión, disminuyen la actividad neuronal a través de la atenuación de la liberación de neurotransmisor (Mendoza-Fernández et al., 2000). Sin embargo, durante la actividad epileptiforme, estos receptores se sobreexpresan en las neuronas y en otros tipos celulares como la microglía (Alves et al., 2017; Alves et al., 2019). Como se mencionó anteriormente, la activación de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gq induce un aumento de calcio en el citosol y la síntesis de moléculas proinflamatorias en la microglía (Kettenmann et al., 2011). En este sentido, se ha reportado que la activación de los receptores purinérgicos P2Y1 resulta en la síntesis y liberación de IL1 $\beta$ , de TNF $\alpha$  y de IL6 (Kumagawa et al., 2022; Noguchi et al., 2013). Lo anterior, permite hipotetizar que, durante la actividad epileptiforme, la activación de los receptores purinérgicos resulta en un aumento de la hiperexcitabilidad neuronal a través de la liberación de moléculas proinflamatorias por parte de la microglía y la posterior modulación de los receptores glutamatérgicos en las neuronas por parte de estas moléculas (Vezzani et al., 2002; 2008; 2011;

2019; Vezzani & Viviani, 2015). Por otro lado, Carmona-Aparicio y colaboradores (2007) observaron que la administración intracerebroventricular de nociceptina, un péptido opioide producido endógenamente (Chiou et al., 2007), produjo efectos diferenciales sobre la hiperexcitabilidad neuronal en el modelo de *kindling* eléctrico amigdalino, dependientes de la severidad de la actividad epileptiforme. Estos autores mostraron que la hiperexcitabilidad neuronal de animales que no fueron sometidos a *kindling* eléctrico amigdalino, no se alteró tras la administración de nociceptina (Carmona-Aparicio et al., 2007). Sin embargo, en los animales sometidos a *kindling* eléctrico amigdalino y que desarrollaron crisis convulsivas focales, la administración de nociceptina produjo un efecto inhibitor de la hiperexcitabilidad, mientras que en los animales que desarrollaron crisis convulsivas generalizadas, la administración de nociceptina produjo un efecto favorecedor de la hiperexcitabilidad (Carmona-Aparicio et al., 2007). Estos resultados paradójicos han sido explicados por una expresión diferencial en el cerebro del receptor de nociceptina a través de la epileptogénesis inducida con *kindling* eléctrico amigdalino, observándose una mayor expresión durante la actividad convulsiva focal y una menor expresión durante la actividad convulsiva generalizada, en comparación con animales que no fueron sometidos a *kindling* eléctrico amigdalino (Carmona-Aparicio et al., 2007). Asimismo, se ha sugerido que la administración de agonistas de los receptores CB1R, que son receptores a cannabinoides asociados a proteínas Gi/o y que son expresados en las neuronas de forma presináptica, por lo que su activación conlleva a la supresión de la liberación del neurotransmisor (Rosenberg et al., 2015; Martínez-Aguirre et al., 2022), podría tener efectos paradójicos sobre la actividad epileptiforme dependiendo del nivel de excitabilidad neuronal (Rosenberg et al., 2015; Martínez-Aguirre et al., 2022). Uno de los ejemplos más claros es la administración del cannabinoide endógeno anandamida (Martínez-Aguirre et al., 2022). La administración de anandamida produce efectos duales sobre la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental (Abdel-Salam et al., 2019; Clement et al., 2003; Manna & Umathe, 2012). Al parecer, estos efectos son dependientes de la dosis utilizada, pues la administración de dosis bajas de este cannabinoide endógeno disminuye la actividad convulsiva inducida con PTZ

(Abdel-Salam et al., 2019), mientras que, la administración de dosis altas exacerba la actividad convulsiva inducida con PTZ y con ácido kaínico (Clement et al., 2003; Manna & Umathe, 2012). El efecto proepileptiforme de la administración de dosis altas de anandamida ha sido explicado por la activación de otros receptores, además del CB1R, como los receptores TRPV1 (Manna & Umathe, 2012), así como por la activación de los receptores CB1R en interneuronas inhibitorias (Rosenberg et al., 2015; Albayram et al., 2016; Martínez-Aguirre et al., 2022), por lo que su administración resultaría en la desinhibición del circuito neuronal, de esta forma, incrementando su excitabilidad. Por otra parte, se ha reportado que la excitabilidad neuronal exacerba la expresión de anandamida, así como de su receptor CB1R, tanto en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal como en modelos animales de hiperexcitabilidad (Gessel et al., 2013; Lazarini-Lopes et al., 2020; Rocha et al., 2020). En conjunto, estas evidencias sugieren que la activación de los receptores CB1R, por ejemplo, con anandamida, en pacientes con epilepsia o en modelos animales de hiperexcitabilidad podría propiciar un aumento de la actividad epileptiforme, incluso con la administración de dosis bajas. Evidencia de lo anterior puede ser encontrada con la administración repetitiva de extracto de *cannabis sativa* en roedores, en donde se ha observado la aparición de actividad convulsiva espontánea (Whalley et al., 2019), así como con el uso de cannabidiol en pacientes con epilepsia, en donde, si bien, la actividad epiléptica disminuye en una proporción de pacientes, también se ha reportado que la actividad epiléptica aumenta en algunos pacientes (Silva et al., 2020). Asimismo, los receptores a cannabinoides tipo 2 (CB2R, por sus siglas en inglés) también podrían estar implicados en los efectos paradójicos de los cannabinoides sobre la actividad epileptiforme (Ji et al., 2021; Martínez-Aguirre et al., 2021). Los receptores CB2R son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gi/o que se expresan en las neuronas de forma postsináptica, así como en la microglía y en los astrocitos (Pocok & Kettenmann, 2007; Kettenmann et al., 2011; Komorowska-Müller & Schmöle, 2020; Ji et al., 2021; Martínez-Aguirre et al., 2021). La activación de los receptores CB2R resulta en efectos contradictorios sobre la actividad epileptiforme (Ji et al., 2021). Por ejemplo, la delección del receptor CB2R incrementa la severidad de las crisis

convulsivas inducidas con PTZ (Shapiro et al., 2019). Por otro lado, la administración de AM1241 o de HU-308, agonistas selectivos de los receptores CB2R (De Carvalho et al., 2016; Ji et al., 2021), incrementa la severidad de las crisis convulsivas inducidas con PTZ (De Carvalho et al., 2016; Huizenga et al., 2017). Adicionalmente, la activación aguda de los receptores CB2R incrementa la actividad sináptica de las neuronas piramidales del hipocampo (Morgan et al., 2009). Sin embargo, su activación crónica resulta en la disminución de la amplitud de las corrientes inhibitorias postsinápticas en las neuronas de la corteza entorrinal (Li & Kim, 2015). El mecanismo por el que la activación de los receptores CB2R resulta en estos efectos tan variados sobre la actividad epileptiforme aún se desconoce, sin embargo, se hipotetiza que es debido a la activación inespecífica de estos receptores en las neuronas excitatorias o en las interneuronas inhibitorias (Ji et al., 2021), así como al patrón temporal de expresión de estos receptores en las neuronas, pues su expresión incrementa de forma aguda después de la inducción de *status epilepticus* con pilocarpina y disminuye días después, cuando los animales presentan crisis convulsivas espontáneas (Wu & Wong, 2018). Asimismo, la activación aguda de los receptores CB2R en la microglía resulta en una disminución de la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias por parte de la microglía (Pocok & Kettenmann, 2007; Kettenmann et al., 2011; Ma et al., 2015; Komorowska-Müller & Schmöle, 2020). En condiciones fisiológicas, la expresión de los receptores CB2R en la microglía se encuentra en niveles bajos, comparados con las células inmunes periféricas (Komorowska-Müller & Schmöle, 2020). Sin embargo, la expresión de los receptores CB2R en la microglía disminuyen aún más tras la aplicación de inmunógenos como el LPS o el IFN $\gamma$  (Maresz et al., 2005). Aunque no se ha descrito el patrón temporal de la expresión de los receptores CB2R en la microglía después de la inducción de hiperexcitabilidad, se puede hipotetizar que la expresión de estos receptores en la microglía también podría disminuir tras la inducción de actividad epileptiforme, lo que resultaría en el aumento de la actividad proinflamatoria microglial típicamente observado en los modelos experimentales de hiperexcitabilidad y de epilepsia (Vezzani & Granata, 2005; 2011; De Simoni et al., 2000; Ravizza et al., 2008; Aronica & Crino, 2011). Por otro lado, con la aplicación

de estimulación cerebral profunda de alta frecuencia en el hipocampo o en la corteza parahipocampal de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente al tratamiento farmacológico, se han observado resultados paradójicos que parecen depender de la severidad de la hiperexcitabilidad neuronal (Velasco et al., 2000; Cuéllar-Herrera et al., 2004; Rocha et al., 2007). En estos estudios se ha observado que la estimulación cerebral profunda de alta frecuencia es capaz de disminuir la frecuencia de la actividad epileptiforme interictal y el número de convulsiones por día en una gran proporción de los pacientes tratados (~60-70 %; Velasco et al., 2000; Cuéllar-Herrera et al., 2004; Rocha et al., 2007). Sin embargo, en una proporción de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente a fármacos (~30-40 %), la estimulación cerebral profunda de alta frecuencia no produjo efectos sobre la actividad epileptiforme (Velasco et al., 2000; Cuéllar-Herrera et al., 2004; Rocha et al., 2007). Al parecer, los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente a fármacos que no respondieron a la estimulación cerebral profunda presentaron, al inicio del estudio, una mayor frecuencia de las crisis epilépticas ( $28.2 \pm 14$  crisis por mes) y una mayor duración de la epilepsia ( $21.7 \pm 2.8$  años), comparados con los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente a fármacos que si respondieron a la estimulación cerebral profunda (frecuencia de las crisis epilépticas =  $11.0 \pm 2.9$  crisis por mes; duración de la epilepsia =  $14.8 \pm 2.5$  años; Cuéllar-Herrera et al., 2004; Rocha et al., 2007). Lo anterior, sugiere que el nivel de excitabilidad neuronal podría estar afectando el efecto antiepiléptico de la estimulación cerebral profunda, posiblemente a través de la modulación de los sistemas GABAérgico y/u opioide (Cuéllar-Herrera et al., 2004; Rocha et al., 2007; Martínez-Aguirre et al., 2022). En conjunto, el establecimiento de la hiperexcitabilidad neuronal conlleva a cambios moleculares en las neuronas y en las células gliales que, a su vez, pueden modificar la respuesta del sistema nervioso hacia tratamientos dirigidos a modular su actividad. En el mismo sentido, nuestros resultados mostraron que la administración intracerebroventricular de IL1 $\beta$  tiene efectos diferenciales sobre la actividad epileptiforme dependiendo de si la administración se llevó a cabo antes o durante la actividad epileptiforme (figuras 29, 30, 31 y 32). Lo anterior no ha sido abordado directamente en la literatura, sin

embargo, se puede hipotetizar que, durante la hiperexcitabilidad neuronal, el efecto proepileptiforme inducido por la administración intracerebroventricular de IL1 $\beta$  podría ser ocluido por la expresión de la proteína IL1Ra (Vezzani et al., 2002; Youn et al., 2013). La hiperexcitabilidad neuronal induce un incremento en la expresión y la liberación de IL1 $\beta$ , así como del receptor IL1R tipo 1 (Vezzani et al., 1999; Vezzani et al., 2002; Ravizza et al., 2008; Youn et al., 2013; Álvarez-Croda et al., 2015). De forma paralela, la hiperexcitabilidad neuronal también induce la expresión de la proteína IL1Ra (Vezzani et al., 2002; Youn et al., 2013). La proteína IL1Ra tiene mayor afinidad por el receptor IL1R tipo 1 que la IL1 $\beta$  y actúa como un limitante de los efectos proinflamatorios del acoplamiento de la IL1 $\beta$  con el receptor IL1R tipo 1 (Rotwell & Luheshi, 2000; Weber et al., 2010; Gabay et al., 2010; Van Den Eeckhout et al., 2021). Con lo anterior, la administración intracerebral de IL1 $\beta$  o de la proteína IL1Ra antes de la inducción de actividad epileptiforme conlleva a efectos proepileptiformes o antiepileptiformes, respectivamente (Vezzani et al., 1999; Vezzani et al., 2002; Rosenzweig et al., 2014b; Kolosowska et al., 2014; 2016; Tao et al., 2015; Pascoal et al., 2022). Sin embargo, durante la actividad epileptiforme, la administración intracerebral de estas citocinas podría no tener efecto sobre la hiperexcitabilidad neuronal debido a que el IL1R tipo 1 se encuentra bloqueado por la proteína IL1Ra endógena. Con lo anterior, nuestros resultados sugieren que, durante la hiperexcitabilidad neuronal, la IL1 $\beta$  y su acoplamiento con su receptor IL1R tipo 1 no participa de forma significativa en el efecto proepileptiforme de la manipulación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, a través de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células (figuras 25 y 30). Con respecto a la naturaleza de las moléculas proinflamatorias provenientes de la microglía y de los macrófagos no parenquimales que pudieran dar cuenta del efecto proepileptiforme de la activación quimiogénica de estas células durante la hiperexcitabilidad ya establecida, resultados previos de nuestro laboratorio y de otros grupos de trabajo han mostrado que la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales resulta en la síntesis y liberación de TNF $\alpha$ , de IL6, de óxido nítrico y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, además de la IL1 $\beta$  (Grace et al., 2018; Binning et al., 2020; Lorea-Hernández, 2020; Saika et al., 2021; Kladow et al.,

2021), por lo que la examinación del papel de estas otras moléculas proinflamatorias provenientes de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la hiperexcitabilidad ya inducida es algo que deberá ser tomado en cuenta en futuras investigaciones.

Por último, nos propusimos investigar el efecto de la inhibición selectiva de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM4Di expresados en estas células, sobre la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad. Para ello, generamos una cepa de animales que expresan a los DREADDs hM4Di bajo el control del promotor del gen *Cx3cr1*, que en el cerebro se encuentra expresado exclusivamente en la microglía y en los macrófagos no parenquimales (Nishiyori et al., 1998; Shemer et al., 2018; Van Hove et al., 2019), permitiéndonos, de acuerdo con la literatura (Grace et al., 2016; 2018; Coleman et al., 2020), inhibir la activación de la microglía y de los macrófagos no parenquimales de forma selectiva. La caracterización de la expresión de los DREADDs hM4Di, a través de la fluorescencia de la proteína fluorescente mCitrina, mostró la expresión exclusiva de este DREADD en una alta proporción de células microgliales hipocampales (figura 35) y en macrófagos no parenquimales de los espacios perivasculares (Anexo 4), lo que nos permitió evaluar el efecto de su activación sobre la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad. Con lo anterior, no podemos descartar la posible expresión de los DREADDs hM4Di en los macrófagos no parenquimales de las meninges y de los plexos coroideos, pues estas células también expresan el gen *Cx3cr1* (Shemer et al., 2018; Van Hove et al., 2019). Otros grupos de trabajo también han mostrado una alta expresión de los DREADDs hM4Di en la microglía usando al promotor del gen *Cx3cr1* (Saika et al., 2020; Yi et al, 2021a), mostrando también una expresión nula de los DREADDs hM4Di en astrocitos y neuronas (Saika et al., 2020). Nuestros resultados mostraron que la inhibición quimiogénica de la activación microglial, a través de la activación de los DREADDs hM4Di expresados en estas células, tuvo efectos inhibitorios robustos sobre la excitabilidad hipocampal (Figura 36). Como se mencionó anteriormente, los DREADDs hM4Di son receptores muscarínicos M4 mutantes acoplados a una proteína Gi/o (Urban & Roth, 2007; Ben-Shaan et al.,

2016; Dobrzanski & Kossut, 2017; Goutaudier et al., 2019). La activación de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gi/o conlleva una vía de señalización intracelular clásica que implica la dimerización de las subunidades  $G\alpha i/o$  y  $G\beta/\gamma$  y la inhibición de la proteína adenilato ciclasa, que, a su vez, inhibe la formación de AMP cíclico (Siegel et al., 2005; de Oliveira et al., 2019). Esta vía de señalización es antagónica a la vía de señalización de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gs, que estimulan a la proteína adenilato ciclasa y promueven la producción de AMP cíclico (Siegel et al., 2005). En la microglía se expresan una variedad de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gs (Kettenmann et al., 2011; Verkhratsky & Noda, 2014), entre los que se encuentran los receptores de adenosina A2A/B, los receptores noradrenérgicos  $\beta 2$  y los receptores dopaminérgicos de la familia D1, que, al ser estimulados, promueven la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias y la proliferación microglial, así como la aparición de filopodias que emergen de los procesos microgliales y la reorganización del citoesqueleto que resulta en una morfología tipo ameboide (Orr et al., 2009; Kettenmann et al., 2011; Gomes et al., 2013; Verkhratsky & Noda, 2014; Santiago et al., 2014; Kopec et al., 2018; Bernier et al., 2019), es decir, que la activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gs en la microglía resultan en un fenotipo microglial proinflamatorio. A su vez, la activación de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gs en la microglía podría contribuir a la generación de oscilaciones neuronales a través de la modulación de las sinapsis (Li et al., 2012; Akiyoshi et al., 2018; Nebeling et al., 2019; Ta et al., 2019; Stowell et al., 2019). En el mismo sentido, en la microglía también se expresan múltiples receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gi/o (Kettenmann et al., 2011; Verkhratsky & Noda, 2014), como los receptores de adenosina A1/3, los receptores purinérgicos P2Y12/13/14, los receptores a cannabinoides CB2, los receptores dopaminérgicos de la familia D2 y los receptores noradrenérgicos  $\alpha 2$ , cuya activación promueve la extensión de los procesos microgliales y la migración de estas células, así como efectos protectores como la inhibición de la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias y el mantenimiento de una morfología ramificada (Kettenmann et al., 2011; Koizumi et al., 2013; Verkhratsky & Noda,



2014; Dominguez-Meijide et al., 2017), es decir, que la activación de receptores metabotrópicos microgliales acoplados a proteínas Gi/o resulta en la inhibición de la activación proinflamatoria de la microglía y de los macrófagos no parenquimales. A este respecto, Merlini y colaboradores (2021) recientemente mostraron que la supresión de la señalización Gi en la microglía exacerba la actividad electrofisiológica epileptiforme y las crisis convulsivas inducidas con pilocarpina, e incluso, es capaz de inducir hiperexcitabilidad y crisis convulsivas espontáneas por sí misma. Juntas, estas evidencias indican que, en condiciones fisiológicas, en la microglía existe una fina regulación entre las vías de señalización de las proteínas Gi/o y Gs que repercute en el control de la excitabilidad neuronal, probablemente a través de la regulación de la actividad sináptica mediante el contacto físico de los procesos microgliales con los botones sinápticos, de la fagocitosis de los botones sinápticos o a través de la liberación de mediadores microgliales como el BDNF (Trang et al., 2009; Li et al., 2012; Antonucci et al., 2012; Ferrini & De Koninck, 2013; Luo et al., 2016; Akiyoshi et al., 2018; Nebeling et al., 2019; Huang et al., 2021). Por lo tanto, la inhibición de la excitabilidad hipocampal que observamos como consecuencia de la activación de los receptores hM4Di expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales (figura 36), podría explicarse por la inhibición de las vías intracelulares asociadas a las proteínas Gs de los receptores metabotrópicos microgliales que, a su vez, podrían estar sosteniendo la excitabilidad neuronal del circuito hipocampal. Adicionalmente, la activación de los receptores hM4Di expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales, también se ha visto asociada a una disminución de la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias, como la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL6 (Grace et al., 2016; Grace et al., 2018; Coleman et al., 2020; Yi et al., 2021a). Sin embargo, nuestros resultados descartan que el efecto de la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal sean el resultado de la inhibición de la liberación de moléculas proinflamatorias desde la microglía y los macrófagos no parenquimales, como la IL1 $\beta$ , ya que la aplicación de la proteína IL1Ra no tuvo efectos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal en los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre (figura

27). Sin embargo, no se puede descartar la participación de otras moléculas proinflamatorias liberadas por la microglía y los macrófagos no parenquimales activados quimiogénicamente, como el TNF $\alpha$  y la IL6, entre otras, aunque tampoco se ha descrito la existencia de liberación tónica o constitutiva de estas moléculas en estado fisiológico en el cerebro (Li et al., 2014; Morini et al., 2015). Lo anterior, aguarda a ser explorado de forma experimental en futuras investigaciones. Adicionalmente, nuestros resultados también mostraron que la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales disminuye la inducción de hiperexcitabilidad, independientemente del mecanismo utilizado para inducirla (figuras 37 y 38). Lo anterior podría ser explicado por el efecto antiinflamatorio de la activación de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales. Desde los estudios pioneros de Grace y colaboradores (2016; 2018), se ha observado que la activación de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía tiene un potente efecto inhibitor de la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias provenientes de la microglía, como la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL6, entre otras, ante la exposición *in vitro* a inmunógenos como el LPS o la quimiocina CCL2. Estos efectos han sido ampliamente corroborados por otros grupos de trabajo, en donde se ha observado que la activación de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía inhibe la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias provenientes de la microglía ante condiciones patológicas crónicas como la constricción del nervio ciático, la quimioterapia, la transección del nervio espinal L4 o la exposición a etanol (Coleman et al., 2020; Yi et al., 2021a). En este sentido, la inducción experimental de hiperexcitabilidad conlleva a un aumento en la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias, principalmente de la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL6 (Voutsinos-Porche et al., 2004; Ravizza et al., 2008; Álvarez-Croda et al., 2015; Vinet et al., 2016; Li et al., 2017), condición que pareciera ser indispensable para el desarrollo de esta actividad patológica (Vezzani et al., 1999; 2000; 2004; 2008; 2011; 2019; Vezzani & Granata, 2005). En suma, se puede hipotetizar que el efecto antiepiléptico de la activación de los DREADDs hM4Di expresados en la microglía y en los macrófagos no parenquimales puede ser debido a la inhibición de la síntesis y liberación de

estas moléculas proinflamatorias durante la inducción de hiperexcitabilidad. En contraste, la inhibición quimiogénica de la activación microglial y de los macrófagos no parenquimales no mostró efectos sobre la hiperexcitabilidad ya inducida con 4-AP (figura 39), sugiriendo que el mantenimiento de la hiperexcitabilidad podría no depender de un tono proinflamatorio microglial, como también lo sugieren nuestros resultados utilizando a la proteína IL1Ra y a la IL1 $\beta$  (figuras 30 y 34).

A pesar de las evidencias expuestas en esta tesis, que sugieren una relación entre la activación de los macrófagos cerebrales y los efectos inducidos por la HIC sobre la excitabilidad neuronal y la hiperexcitabilidad, aún quedan por demostrar de forma experimental varios puntos. Primero, que la manipulación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, sea capaz de modular los efectos inducidos por la HIC sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad. Segundo, que la manipulación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs hM4Di expresados en estas células, pueda evitar los efectos de la HIC sobre excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad. Y tercero, utilizar marcadores exclusivos de la microglía para expresar a los DREADDs hM3Dq y hM4Di en estas células, como la proteína *tmem119* (Kaiser & Feng, 2019) y comparar sus efectos sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad, con los efectos descritos en esta tesis. Asimismo, futuras investigaciones estarán enfocadas en evaluar el rol de la activación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, así como de la inhibición selectiva de la activación de estas células, sobre la actividad convulsiva y la epileptogénesis en animales en libre movimiento, así como en el mantenimiento de la epilepsia experimental.

## Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo de tesis nos permiten concluir que:

- La inducción experimental de HIC incrementó la excitabilidad hipocampal en la banda de frecuencia gamma, sugiriendo que los pacientes con el SAOS podrían tener alterados los circuitos inhibitorios en el hipocampo (Kann et al., 2014; Merchant et al., 2012).
- La inducción experimental de HIC exacerbó la hiperexcitabilidad neuronal, sugiriendo que los pacientes con el SAOS podrían tener una alta susceptibilidad para desarrollar actividad epiléptica, probablemente a través de promover el desarrollo de neuroinflamación y activación microglial (Smith et al. 2013; Oyarce & Iturriaga, 2018; Shi et al., 2018; Gong et al., 2020; Wu et al., 2021).
- Los efectos de la inducción experimental de HIC sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad neuronal fueron revertidos después de un periodo de ReOx, sugiriendo que la aplicación de intervenciones terapéuticas en contra del SAOS en pacientes con epilepsia, como la CPAP o las intervenciones quirúrgicas de las vías respiratorias superiores (como la tonsilectomía, la adenoidectomía y la uvuloplastía) e inferiores (como la traqueostomía), podrían contribuir al control de la actividad epiléptica (Vaughn et al., 1996; Chihorek et al., 2007; Manni & Terzaghi, 2010; Vendrame et al., 2011; Segal et al., 2012).
- La manipulación farmacológica de la microglía con LPS no produjo efectos sobre la excitabilidad hipocampal y la hiperexcitabilidad inducida de forma experimental, lo que se suma a la controversia respecto al papel de la microglía en la inducción de hiperexcitabilidad derivado del uso de herramientas experimentales para modular a la microglía de forma no selectiva (Sayyah et al., 2003b; Mirrione et al., 2010; Ahmadi et al., 2013; Eslami et al., 2015).
- La manipulación optogenética en animales Cx3cr1/ChR2 exacerbó la excitabilidad hipocampal y la inducción de actividad epileptiforme. Aunque esta estrategia experimental no resultó ser selectiva.
- La manipulación de la microglía y de los macrófagos no parenquimales con quimiogenética, a través de la activación de los DREADDs hM3Dq expresados en estas células, exacerbó la excitabilidad hipocampal y promovió la inducción de

hiperexcitabilidad en una forma dependiente de la señalización de la citocina proinflamatoria IL1 $\beta$ , indicando que, por sí misma, la activación proinflamatoria de la microglía es capaz de modular a la actividad neuronal y de promover la epilepsia, además de que permite ver que intervenciones terapéuticas encaminadas en bloquear la señalización de la IL1 $\beta$  podrían ser benéficas para el control de las crisis epilépticas (Vezzani et al., 1999; 2000; Noe et al., 2013; Feng et al., 2016).

- La manipulación de la microglía y de los macrófagos no parenquimales con quimiogenética, a través de la activación de los DREADDs hM4Di expresados en estas células, inhibe la excitabilidad hipocampal y la inducción de hiperexcitabilidad, sugiriendo que la microglía y los macrófagos no parenquimales ejercen un papel activo en el mantenimiento de la actividad hipocampal posiblemente a través de la activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gs (Li et al., 2012; Akiyoshi et al., 2018; Nebeling et al., 2019; Ta et al., 2019; Stowell et al., 2019), además de que nos permite proponer a la activación de la microglía y de los macrófagos no parenquimales como un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de la hiperexcitabilidad y posiblemente de la epilepsia (Vezzani et al., 2019).

## REFERENCIAS

- Aalbers, M. W., Rijkers, K., Majoie, H. J., Dings, J. T., Schijns, O. E., Schipper, S., De Baets, M. H., Kessels, A., Vles, J. S., & Hoogland, G. (2014). The influence of neuropathology on brain inflammation in human and experimental temporal lobe epilepsy. *Journal of neuroimmunology*, 271 (1-2), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.03.016>
- Aarli J. A. (2000). Epilepsy and the immune system. *Archives of neurology*, 57 (12), 1689–1692. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.12.1689>
- Abdel-Salam, O. M. E., Sleem, A.A., Sayed, M. A. E. M., Youness, E. & Shaffie, N. (2019). Neuroprotective effects of low dose anandamide in pentilene tetrazole-induced kindling in rats. *Biomedical & pharmacology journal*, 12 (1), 25-40. <http://dx.doi.org/10.13005/bpj/1610>
- Abel, T. J., Woodroffe, R. W., Nourski, K. V., Moritani, T., Capizzano, A. A., Kirby, P., Kawasaki, H., Howard, M., & Werz, M. A. (2018). Role of the temporal pole in temporal lobe epilepsy seizure networks: an intracranial electrode investigation. *Journal of neurosurgery*, 129 (1), 165–173. <https://doi.org/10.3171/2017.3.JNS162821>
- Ackerman, R.F. & Moshé, S.L. (2010). Excitation/Inhibition interactions and seizures: the brain's lifelong balancing act. En Panayiotopoulos C.P. (Ed). *Atlas of epilepsies* (pp. 5-9). Reino Unido: Springer Reference. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-84882-128-6>
- Adaya-Villanueva, A., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Márquez-Ramos, A., & Peña-Ortega, F. (2010). Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides. *Peptides*, 31 (9), 1761–1766. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.003>
- Agrafiotis, M., Galanou, A., Fletsios, D., Chassiotou, A., Chloros, D., & Steiropoulos, P. (2022). Functional Comorbidity Index and health-related quality of life in patients with obstructive sleep apnea. *Advances in respiratory medicine*, 10.5603/ARM.a2022.0001. Advance online publication. <https://doi.org/10.5603/ARM.a2022.0001>
- Ahmadi, A., Sayyah, M., Khoshkholgh-Sima, B., Choopani, S., Kazemi, J., Sadegh, M., Moradpour, F., & Nahrevanian, H. (2013). Intra-hippocampal injection of lipopolysaccharide inhibits kindled seizures and retards kindling rate in adult rats. *Experimental brain research*, 226 (1), 107–120. <https://doi.org/10.1007/s00221-013-3415-6>
- Akashiba, T., Inoue, Y., Uchimura, N., Ohi, M., Kasai, T., Kawana, F., Sakurai, S., Takegami, M., Tachikawa, R., Tanigawa, T., Chiba, S., Chin, K., Tsuiki, S., Tonogi, M., Nakamura, H., Nakayama, T., Narui, K., Yagi, T., Yamauchi, M., Yamashiro, Y., ... Momomura, S. I. (2022). Sleep Apnea Syndrome (SAS) Clinical Practice Guidelines 2020. *Respiratory investigation*, 60 (1), 3–32. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2021.08.010>
- Akhlaghi, Z., Sayyah, M., Mokhtari, M., & Ahmadi, A. (2012). Effect of intra-amygdala injection of lipopolysaccharide on kindling epileptogenesis in adult rats. *Archives of Iranian medicine*, 15 (9), 557–559. <https://doi.org/10.12159/AIM.009>
- Akiyoshi, R., Wake, H., Kato, D., Horiuchi, H., Ono, R., Ikegami, A., Haruwaka, K., Omori, T., Tachibana, Y., Moorhouse, A. J., & Nabekura, J. (2018). Microglia Enhance Synapse Activity to Promote Local Network Synchronization. *eNeuro*, 5 (5), ENEURO.0088-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0088-18.2018>
- Aktan F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences*, 75 (6), 639–653. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042>
- Alarcón, R., Fuenzalida, C., Santibáñez, M., & von Bernhardi, R. (2005). Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *The Journal of biological chemistry*, 280 (34), 30406–30415. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414686200>

- Albayram, Ö., Passlick, S., Bilkei-Gorzo, A., Zimmer, A., & Steinhäuser, C. (2016). Physiological impact of CB1 receptor expression by hippocampal GABAergic interneurons. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 468 (4), 727–737. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1782-5>
- Alberti, A., Sarchielli, P., Gallinella, E., Floridi, A., Floridi, A., Mazzotta, G., & Gallai, V. (2003). Plasma cytokine levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome: a preliminary study. *Journal of sleep research*, 12 (4), 305–311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2003.00361.x>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell*. 6a edición. Estados Unidos: Garland Science.
- Alcantara-Gonzalez, D., Villasana-Salazar, B., & Peña-Ortega, F. (2019). Single amyloid-beta injection exacerbates 4-aminopyridine-induced seizures and changes synaptic coupling in the hippocampus. *Hippocampus*, 29 (12), 1150–1164. <https://doi.org/10.1002/hipo.23129>
- Alekseeva, O.S., Kirk, O.V., Gilerovich, E.G. & Korzhevskii, D.E. (2019). Microglia of the brain: Origin, structure, functions. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 55 (4), 257:268. <https://doi.org/10.1134/S002209301904001X>
- Almeida-Silva, L. F., Engel, T., Reschke, C. R., Conroy, R. M., Langa, E., & Henshall, D. C. (2016). Distinct behavioral and epileptic phenotype differences in 129/P mice compared to C57BL/6 mice subject to intraamygdala kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy & behavior*, 64 (Pt A), 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.09.031>
- Almendros, I., Acerbi, I., Puig, F., Montserrat, J. M., Navajas, D., & Farré, R. (2007). Upper-airway inflammation triggered by vibration in a rat model of snoring. *Sleep*, 30 (2), 225–227. <https://doi.org/10.1093/sleep/30.2.225>
- Alpizar, Y. A., Boonen, B., Sanchez, A., Jung, C., López-Requena, A., Naert, R., Steelant, B., Luyts, K., Plata, C., De Vooght, V., Vanoirbeek, J., Meseguer, V. M., Voets, T., Alvarez, J. L., Hellings, P. W., Hoet, P., Nemery, B., Valverde, M. A., & Talavera, K. (2017). TRPV4 activation triggers protective responses to bacterial lipopolysaccharides in airway epithelial cells. *Nature communications*, 8 (1), 1059. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01201-3>
- Altmann, A., Ryten, M., Di Nunzio, M., Ravizza, T., Tolomeo, D., Reynolds, R. H., Somani, A., Bacigaluppi, M., Iori, V., Miccotti, E., Di Sapia, R., Cerovic, M., Palma, E., Ruffolo, G., Botía, J. A., Absil, J., Alhusaini, S., Alvim, M., Auvinen, P., Bargallo, N., ... Sisodiya, S. M. (2022). A systems-level analysis highlights microglial activation as a modifying factor in common epilepsies. *Neuropathology and applied neurobiology*, 48 (1), e12758. <https://doi.org/10.1111/nan.12758>
- Alvarado-Martínez, R., Salgado-Puga, K., & Peña-Ortega, F. (2013). Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell. *PLoS one*, 8 (9), e75745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075745>
- Álvarez-Croda, D. M., Santiago-García, J., Medel-Matus, J. S., Martínez-Quiroz, J., Puig-Lagunes, A. A., Beltrán-Parrazal, L., & López-Meraz, M. L. (2016). Hippocampal distribution of IL-1 $\beta$  and IL-1RI following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in the developing rat. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88 (Suppl 1), 653–663. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150296>
- Alvarez-Curto, E., Prihandoko, R., Tautermann, C. S., Zwier, J. M., Padiani, J. D., Lohse, M. J., Hoffmann, C., Tobin, A. B., & Milligan, G. (2011). Developing chemical genetic approaches to explore G protein-coupled receptor function: validation of the use of a receptor activated solely by synthetic ligand (RASSL). *Molecular pharmacology*, 80 (6), 1033–1046. <https://doi.org/10.1124/mol.111.074674>

- Alvarez-Curto, E., Ward, R. J., Pediani, J. D., & Milligan, G. (2010). Ligand regulation of the quaternary organization of cell surface M3 muscarinic acetylcholine receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer (FRET) imaging and homogeneous time-resolved FRET. *The Journal of biological chemistry*, 285 (30), 23318–23330. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.122184>
- Alves, M., De Diego Garcia, L., Conte, G., Jimenez-Mateos, E. M., D'Orsi, B., Sanz-Rodriguez, A., Prehn, J., Henshall, D. C., & Engel, T. (2019). Context-Specific Switch from Anti- to Pro-epileptogenic Function of the P2Y1 Receptor in Experimental Epilepsy. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 39 (27), 5377–5392. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0089-19.2019>
- Alves, M., Gomez-Villafuertes, R., Delanty, N., Farrell, M. A., O'Brien, D. F., Miras-Portugal, M. T., Hernandez, M. D., Henshall, D. C., & Engel, T. (2017). Expression and function of the metabotropic purinergic P2Y receptor family in experimental seizure models and patients with drug-refractory epilepsy. *Epilepsia*, 58 (9), 1603–1614. <https://doi.org/10.1111/epi.13850>
- Alyu, F. & Dikmen, M. (2016). Inflammatory aspects of epileptogenesis: contribution of molecular inflammatory mechanisms. *Acta Neuropsychiatrica*, 29 (1), 1-16. <https://doi.org/10.1017/neu.2016.47>
- Amhaoul, H., Hamaide, J., Bertoglio, D., Reichel, S. N., Verhaeghe, J., Geerts, E., Van Dam, D., De Deyn, P. P., Kumar-Singh, S., Katsifis, A., Van Der Linden, A., Staelens, S., & Dedeurwaerdere, S. (2015). Brain inflammation in a chronic epilepsy model: Evolving pattern of the translocator protein during epileptogenesis. *Neurobiology of disease*, 82, 526–539. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.09.004>
- Antonucci, F., Alpár, A., Kacza, J., Caleo, M., Verderio, C., Giani, A., Martens, H., Chaudhry, FA., Allegra, M., Grosche, J., Michalski, D., Erck, C., Hoffman, A., Harkany, T., Matteoli, M. & Härtig, W. (2012). Cracking down on inhibition: selective removal of GABAergic interneurons from hippocampal network. *The Journal of Neuroscience*, 32 (6), 1989:2001. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2720-11.2012>
- Arcuri, C., Mecca, C., Bianchi, R., Giambanco, I. & Donato, R. (2017). The pathophysiological role of microglia in dynamic surveillance, phagocytosis and structural remodeling of the developing CNS. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 191. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00191>
- Arcuri, C., Mecca, C., Giambanco, I., & Donato, R. (2019). Parenchymal and non-parenchymal immune cells in the brain: A critical role in regulating CNS functions. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 77, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.04.005>
- Arias-Cavieres, A., Fonteh, A., Castro-Rivera, C. I., & Garcia, A. J., 3rd (2021). Intermittent Hypoxia causes targeted disruption to NMDA receptor dependent synaptic plasticity in area CA1 of the hippocampus. *Experimental neurology*, 344, 113808. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113808>
- Arias-Gil, G., Ohl, F. W., Takagaki, K., & Lippert, M. T. (2016). Measurement, modeling, and prediction of temperature rise due to optogenetic brain stimulation. *Neurophotonics*, 3 (4), 045007. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.3.4.045007>
- Arnoux, I., Hoshiko, M., Sanz Diez, A. & Audinat, E. (2014). Paradoxical effects of minocycline in the developing mouse somatosensory cortex. *Glia*, 62, 399:410. <https://doi.org/10.1002/glia.22612>
- Aronica, E., & Crino, P. B. (2011). Inflammation in epilepsy: clinical observations. *Epilepsia*, 52 (Suppl 3), 26–32. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03033.x>



- Aronica, E., & Gorter, J. A. (2007). Gene expression profile in temporal lobe epilepsy. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 13 (2), 100–108. <https://doi.org/10.1177/1073858406295832>
- Aronica, E., Ravizza, T., Zurolo, E., & Vezzani, A. (2012). Astrocyte immune responses in epilepsy. *Glia*, 60 (8), 1258–1268. <https://doi.org/10.1002/glia.22312>
- Augusto-Olivera, M., Arrifano, G.P., Lopes-Araújo, A., Santos-Sacramento, L., Takeda, P.Y., Anthony, D.C., Malva, J.O. & Crespo-Lopez, M.A. (2019). What do microglia really do in healthy adult brain? *Cells*, 8 (10), 1293:1310. <https://doi.org/10.3390/cells8101293>
- Auvin, S., Shin, D., Mazarati, A., Nakagawa, J., Miyamoto, J. & Sankar, R. (2007). Inflammation exacerbates seizure-induced injury in the immature brain. *Epilepsia*, 48 (Suppl. 5), 27:34. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01286.x>
- Avanzini G. & de Boer, H.M. (2010). The epilepsy treatment gap: industrialized and resource-poor countries. En Panayiotopoulos C.P. (Ed). *Atlas of epilepsies* (pp. 1399-1411). Reino Unido: Springer Reference.
- Avdic, U., Ahl, M., Chugh, D., Ali, I., Chary, K., Sierra, A., & Ekdahl, C. T. (2018). Nonconvulsive status epilepticus in rats leads to brain pathology. *Epilepsia*, 59 (5), 945–958. <https://doi.org/10.1111/epi.14070>
- Avignone, E., Lepleux, M., Angibaud, J., & Nägerl, U. V. (2015). Altered morphological dynamics of activated microglia after induction of status epilepticus. *Journal of neuroinflammation*, 12, 202. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0421-6>
- Avoli, M., & Jefferys, J. G. (2016). Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. *Journal of neuroscience methods*, 260, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.10.006>
- Avoli, M., & Williamson, A. (1996). Functional and pharmacological properties of human neocortical neurons maintained in vitro. *Progress in neurobiology*, 48 (6), 519–554. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00050-x](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00050-x)
- Badawy, R. A., Harvey, A. S., & Macdonell, R. A. (2009a). Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: understanding the mechanisms of epilepsy - part 1. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 16 (3), 355–365. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2008.08.026>
- Badawy, R. A., Harvey, A. S., & Macdonell, R. A. (2009b). Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: Understanding the mechanisms of epilepsy - part 2. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 16 (4), 485–500. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2008.10.001>
- Balosso, S., Maroso, M., Sanchez-Alavez, M., Ravizza, T., Frasca, A., Bratfai, T. & Vezzani, A. (2008). A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effect of interleukin-1 $\beta$ . *Brain*, 131, 3256:2365. <https://doi.org/10.1093/brain/awn271>
- Balosso, S., Ravizza, T., Perego, C., Peschon, J., Campbell, I. L., De Simoni, M. G., & Vezzani, A. (2005). Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Annals of neurology*, 57 (6), 804–812. <https://doi.org/10.1002/ana.20480>
- Balzano, T., Arenas, Y. M., Dadsetan, S., Forteza, J., Gil-Perotin, S., Cubas-Nuñez, L., Casanova, B., Gracià, F., Varela-Andrés, N., Montoliu, C., Llansola, M., & Felipo, V. (2020). Sustained hyperammonemia induces TNF-a IN Purkinje neurons by activating the TNFR1-NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of neuroinflammation*, 17 (1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01746-z>
- Barbarosie, M., & Avoli, M. (1997). CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 17 (23), 9308–9314. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-23-09308.1997>

- Barnett, A. M., Crews, F. T., & Coleman, L. G. (2021). Microglial depletion and repopulation: a new era of regenerative medicine? *Neural regeneration research*, 16 (6), 1204–1205. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.300439>
- Baronio, D., Martinez, D., Fiori, C. Z., Bambini-Junior, V., Forgiarini, L. F., Pase da Rosa, D., Kim, L. J., & Cerski, M. R. (2013). Altered aquaporins in the brains of mice submitted to intermittent hypoxia model of sleep apnea. *Respiratory physiology & neurobiology*, 185 (2), 217–221. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.10.012>
- Batista, C., Gomes, G. F., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B. L., & de Oliveira, A. (2019). Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*, 20 (9), 2293. <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>.
- Beach, T.G., Woodhurst, W.B., MacDonald, D.B. & Jones, M.W. (1995). Reactive microglia in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience Letters*, 191, 27:30. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)11548-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)11548-1)
- Beamer, E., Conte, G., & Engel, T. (2019). ATP release during seizures - A critical evaluation of the evidence. *Brain research bulletin*, 151, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.12.021>
- Benjamini, Y., Krieger, A.M., & Yekutieli, D. (2006) Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. *Biometrika*. 93 (3), 491-507. <https://doi.org/10.1142/S0219720014500188>
- Bennett, M. L., Bennett, F. C., Liddelow, S. A., Ajami, B., Zamanian, J. L., Fernhoff, N. B., Mulinyawe, S. B., Bohlen, C. J., Adil, A., Tucker, A., Weissman, I. L., Chang, E. F., Li, G., Grant, G. A., Hayden Gephart, M. G., & Barres, B. A. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (12), E1738–E1746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
- Ben-Shaanan, T., Schiller, M. & Rolls, A. (2017). Studying brain-regulation immunity with optogenetics and chemogenetics: A new experimental platform. *Brain, Behavior, and Immunity*, 65, 1:8. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.024>
- Benson, M. J., Manzanero, S., & Borges, K. (2015). Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. *Epilepsia*, 56 (6), 895–905. <https://doi.org/10.1111/epi.12960>
- Berg, T.T. (2010). Epilepsies. En Panayiotopoulos C.P. (Ed). *Atlas of epilepsies* (pp. 5-9). Reino Unido: Springer Reference.
- Berglind, F., Andersson, M., & Kokaia, M. (2018). Dynamic interaction of local and transhemispheric networks is necessary for progressive intensification of hippocampal seizures. *Scientific reports*, 8 (1), 5669. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23659-x>
- Bernier, L., Bohlen, C.J., York, E.M., Choi, H.B., Kamyabi, A., Dissing-Olesen, L., Hefendehl, J.K., Collins, H.Y., Stevens, B., Barres, B.A. & MacVicar, B.A. (2019). Nanoscale surveillance of the brain by microglia via cAMP-regulated filopodia. *Cell Reports*, 27, 2895:2908. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.010>
- Bernier, L.P., Ase, A.R., Boué-Grabot, E. & Séguéla, P. (2013). Inhibition of P2X4 function by P2Y6 UDP receptors in microglia. *Glia*, 61 (12), 2038:2049. <https://doi.org/10.1002/glia.22574>
- Bertani, I., Iori, V., Trusel, M., Maroso, M., Foray, C., Mantovani, S., Tonini, R., Vezzani, A., & Chiesa, R. (2017). Inhibition of IL-1 $\beta$  Signaling Normalizes NMDA-Dependent Neurotransmission and Reduces Seizure Susceptibility in a Mouse Model of Creutzfeldt-Jakob Disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 37 (43), 10278–10289. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1301-17.2017>

- Bilousova, TV., Dansie, L., Ngo, M., Aye, JR., Charles, JR., Ethell, DW. & Ethell IM. (2009). Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioral performance in the fragile X mouse model. *Journal of Medical Genetics*, 46, 94:102. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.061796>
- Binning, W., Hogan-Cann, A. E., Yae Sakae, D., Maksoud, M., Ostapchenko, V., Al-Onaizi, M., Matovic, S., Lu, W. Y., Prado, M., Inoue, W., & Prado, V. F. (2020). Chronic hM3Dq signaling in microglia ameliorates neuroinflammation in male mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 88, 791–801. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.041>
- Björkman, S. T., Miller, S. M., Rose, S. E., Burke, C., & Colditz, P. B. (2010). Seizures are associated with brain injury severity in a neonatal model of hypoxia-ischemia. *Neuroscience*, 166 (1), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.067>
- Blecharz-Lang, K. G., Wagner, J., Fries, A., Nieminen-Kelhä, M., Rösner, J., Schneider, U. C., & Vajkoczy, P. (2018). Interleukin 6-Mediated Endothelial Barrier Disturbances Can Be Attenuated by Blockade of the IL6 Receptor Expressed in Brain Microvascular Endothelial Cells. *Translational stroke research*, 9 (6), 631–642. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0614-2>
- Blinzinger, K. & Kreutzberg, G. (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Zeitschrift für Zellforschung*, 85, 145:157.
- Bloomfield, P.S., Selvaraj, S., Varonese, M., Rizzo, G., Bertoldo, A., Owen, D.R., Bloomfield, M.A.P., Bonoldi, I., Lakl, N., Turkheimer, F., McGuire, P., de Paola, V. & Howes, O.D. (2016). Microglial activity in people at ultra high risk of psychosis and in schizophrenia: An [<sup>11</sup>C]PBR28 PET brain imaging study. *The American Journal of Psychiatry*, 173, 44:52. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.14101358>
- Blumenfeld, H., Varghese, G. I., Purcaro, M. J., Motelow, J.E., Enev, M., McNally, K.A., Levin, A.R., Hirsch, L.J., Tikofsky, R., Zubal, I.G., Paige, A.L. & Spencer, S.S. (2009). Cortical and subcortical networks in human secondarily generalized tonic-clonic seizures. *Brain*, 132 (4), 999:1012. <https://doi.org/10.1093/brain/awp028>
- Boccazzi, M., Van Steenwinckel, J., Schang, A. L., Faivre, V., Le Charpentier, T., Bokobza, C., Csaba, Z., Verderio, C., Fumagalli, M., Mani, S., & Gressens, P. (2021). The immune-inflammatory response of oligodendrocytes in a murine model of preterm white matter injury: the role of TLR3 activation. *Cell death & disease*, 12 (2), 166. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03446-9>
- Bodea, L. G., Wang, Y., Linnartz-Gerlach, B., Kopatz, J., Sinkkonen, L., Musgrove, R., Kaoma, T., Muller, A., Vallar, L., Di Monte, D. A., Balling, R., & Neumann, H. (2014). Neurodegeneration by activation of the microglial complement-phagosome pathway. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 34 (25), 8546–8556. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5002-13.2014>
- Bowyer, J.F., Sarkar, S., Burks, S.M., Hess, J.N., Tolani, S., O'Callaghan, J.P. & Hanig, J.P. (2020). Microglial activation and responses to vasculature that result from an acute LPS exposure. *Neurotoxicology*, 77, 181:192. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.01.014>
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8 (9), 1263:1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>
- Brackhan, M., Bascuñana, P., Postema, JM., Ross, TL., Bengel FM., Bankstahl, M. & Bankstahl, JP. (2018). Serial quantitative TSPO-targeted PET reveals peak microglia activation up to 2 weeks after an epileptogenic brain insult. *Journal of Nuclear Medicine*, 57 (8), 1302:1308. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.172494>
- Brady, L. S., Lynn, A. B., Herkenham, M., & Gottesfeld, Z. (1994). Systemic interleukin-1 induces early and late patterns of c-fos mRNA expression in brain. *The Journal of*

- neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 14 (8), 4951–4964. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-08-04951.1994>
- Brasier A. R. (2010). The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovascular research*, 86 (2), 211–218. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq076>
- Brawek, B. & Garaschuk, O. (2013). Microglial calcium signaling in the adult, aged and diseased brain. *Cell Calcium*, 53, 159:169. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.12.003>
- Bresciani, E., Possenti, R., Coco, S., Rizzi, L., Meanti, R., Molteni, L., Locatelli, V., & Torsello, A. (2019). TLQP-21, A VGF-Derived Peptide Endowed of Endocrine and Extraendocrine Properties: Focus on In Vitro Calcium Signaling. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 130. <https://doi.org/10.3390/ijms21010130>
- Brückner, C. & Heinemann, E. (2000). Effects of standard anticonvulsant drugs on different patterns of epileptiform discharges induced by 4-aminopyridine in combined entorhinal cortex-hippocampal slices. *Brain Research*, 859 (1), 15:20. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02348-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02348-3)
- Burman, R. J., Rosch, R. E., Wilmshurst, J. M., Sen, A., Ramantani, G., Akerman, C. J., & Raimondo, J. V. (2022). Why won't it stop? The dynamics of benzodiazepine resistance in status epilepticus. *Nature reviews. neurology*, 10.1038/s41582-022-00664-3. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00664-3>
- Burman, R. J., Selfe, J. S., Lee, J. H., van den Berg, M., Calin, A., Codadu, N. K., Wright, R., Newey, S. E., Parrish, R. R., Katz, A. A., Wilmshurst, J. M., Akerman, C. J., Trevelyan, A. J., & Raimondo, J. V. (2019). Excitatory GABAergic signalling is associated with benzodiazepine resistance in status epilepticus. *Brain: a journal of neurology*, 142 (11), 3482–3501. <https://doi.org/10.1093/brain/awz283>
- Burton, M. D., Sparkman, N. L., & Johnson, R. W. (2011). Inhibition of interleukin-6 trans-signaling in the brain facilitates recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior. *Journal of neuroinflammation*, 8, 54. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-54>
- Busche, M. A., & Konnerth, A. (2015). Neuronal hyperactivity--A key defect in Alzheimer's disease? *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 37 (6), 624–632. <https://doi.org/10.1002/bies.201500004>
- Butler, T., Ichise, M., Teich, A.F., Gerard, E., Osborne, J., French, J., Devinsky, O., Kuzniecky, R., Gilliam, F., Pervez, B.S., Provenzano, F., Goldsmith, S., Vallabhajosula, S., Stern, E. & Silbersweig, D. (2011). Imaging inflammation in a patient with Epilepsy due to focal cortical displasia. *The Journal of Neuroimaging*, 23, 129:131. <https://doi.org/10.1111/j.1552-6569.2010.00572.x>
- Butler, T., Li, Y., Tsui, W., Friedman, D., Maoz, A., Wang, X., Harvey, P., Tanzi, E., Morim, S., Kang, Y., Mosconi, L., Talos, D., Kuzniecky, R., Vallhabjosula, S., Thesen, T., Glodzik, L., Ichise, M., Silbersweig, D., Stern, E., de Leon, M.J. & French, J. (2016). Transient and chronic seizure-induced inflammation in human focal epilepsy. *Epilepsia*, 57 (9), e191:e194. <https://doi.org/10.1111/epi.13457>
- Buttini, M., Limonta, S., & Boddeke, H. W. (1996). Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochemistry international*, 29 (1), 25–35. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(95\)00141-7](https://doi.org/10.1016/0197-0186(95)00141-7)
- Buzsáki, G., & Schomburg, E. W. (2015). What does gamma coherence tell us about inter-regional neural communication? *Nature neuroscience*, 18 (4), 484–489. <https://doi.org/10.1038/nn.3952>
- Buzsáki, G., & Watson, B. O. (2012). Brain rhythms and neural syntax: implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, 14 (4), 345–367. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2012.14.4/gbuzsaki>

- Buzsáki, G., Buhl, D.L., Harris, K.D., Csicsvari, J., Czéh, B & Morozov, A. (2003). Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience*, 116 (1), 201:211. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00669-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00669-3)
- Cai, L., Wang, Z., Meyer, J. M., Ji, A., & van der Westhuyzen, D. R. (2012). Macrophage SR-BI regulates LPS-induced pro-inflammatory signaling in mice and isolated macrophages. *Journal of lipid research*, 53 (8), 1472–1481. <https://doi.org/10.1194/jlr.M023234>
- Cain, D. P., Raithby, A., & Corcoran, M. E. (1989). Urethane anesthesia blocks the development and expression of kindled seizures. *Life sciences*, 44 (17), 1201–1206. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90315-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90315-9)
- Calvo-Rodríguez, M., de la Fuente, C., García-Durillo, M., García-Rodríguez, C., Villalobos, C., & Núñez, L. (2017). Aging and amyloid  $\beta$  oligomers enhance TLR4 expression, LPS-induced  $Ca^{2+}$  responses, and neuron cell death in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0802-0>
- Camacho-Hernández, N. P., Lorea-Hernández, J. J., & Peña-Ortega, F. (2019). Microglial modulators reduce respiratory rhythm long-term facilitation in vitro. *Respiratory physiology & neurobiology*, 265, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.07.012>
- Camacho-Hernández, P., Lorea-Hernández, J. J., Pinedo-Vargas, L., & Peña-Ortega, F. (2022). Perinatal inflammation and gestational intermittent hypoxia disturbs respiratory rhythm generation and long-term facilitation in vitro: Partial protection by acute minocycline. *Respiratory physiology & neurobiology*, 297, 103829. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2021.103829>
- Campanelli, F., Natale, G., Marino, G., Ghiglieri, V., & Calabresi, P. (2022). Striatal glutamatergic hyperactivity in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 168, 105697. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105697>
- Canessa, N., Castronovo, V., Cappa, S. F., Aloia, M. S., Marelli, S., Falini, A., Alemanno, F., & Ferini-Strambi, L. (2011). Obstructive sleep apnea: brain structural changes and neurocognitive function before and after treatment. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183 (10), 1419–1426. <https://doi.org/10.1164/rccm.201005-0693OC>
- Carmona-Aparicio, L., Peña, F., Borsodi, A., & Rocha, L. (2007). Effects of nociceptin on the spread and seizure activity in the rat amygdala kindling model: their correlations with 3H-leucyl-nociceptin binding. *Epilepsy research*, 77 (2-3), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.08.007>
- Casal, C., Tusell, J.M., & Serratosa, J. (2001). Role of calmodulin in the differentiation/activation of microglial cells. *Brain Research*, 902, 101:107. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02380-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02380-0)
- Castañeda-Cabral, J. L., Ureña-Guerrero, M. E., Beas-Zárate, C., Colunga-Durán, A., Nuñez-Lumbreras, M., Orozco-Suárez, S., Alonso-Vanegas, M., Guevara-Guzmán, R., Deli, M. A., & Rocha, L. (2020). Increased expression of proinflammatory cytokines and iNOS in the neocortical microvasculature of patients with temporal lobe epilepsy. *Immunologic research*, 68 (3), 169–176. <https://doi.org/10.1007/s12026-020-09139-3>
- Cavalheiro, E.A. (1995). The pilocarpine model of epilepsy. *Italian Journal of Neurological Sciences*, 16 (1-2), 33:37. <https://doi.org/10.1007/BF02229072>
- Cederberg, D. & Siesjö, P. (2010). What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Child's Nervous System*, 26 (2), 221:226. <https://doi.org/10.1007/s00381-009-1029-x>

- Cervantes-Villagrana, R. D., Cervantes-Villagrana, A. R., & Presno-Bernal, J. M. (2014). Mecanismos de señalización involucrados en la resolución de la inflamación. *Gaceta médica de México*, 150 (5), 440-449.
- Chang, P., Walker, M. C., & Williams, R. S. (2014). Seizure-induced reduction in PIP3 levels contributes to seizure-activity and is rescued by valproic acid. *Neurobiology of disease*, 62, 296–306. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.017>
- Chao, C. C., Hu, S., Ehrlich, L., & Peterson, P. K. (1995). Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain, behavior, and immunity*, 9 (4), 355–365. <https://doi.org/10.1006/brbi.1995.1033>
- Chen, B., Xu, C., Wang, Y., Lin, W., Wang, Y., Chen, L., Cheng, H., Xu, L., Hu, T., Zhao, J., Dong, P., Guo, Y., Zhang, S., Wang, S., Zhou, Y., Hu, W., Duan, S., & Chen, Z. (2020). A disinhibitory nigra-parafascicular pathway amplifies seizure in temporal lobe epilepsy. *Nature communications*, 11 (1), 923. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14648-8>
- Chen, W., Sheng, J., Guo, J., Gao, F., Zhao, X., Dai, J., Wang, G., & Li, K. (2015). Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances voltage-gated Na<sup>+</sup> currents in primary culture of mouse cortical neurons. *Journal of neuroinflammation*, 12, 126. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0349-x>
- Chiang A. A. (2006). Obstructive sleep apnea and chronic intermittent hypoxia: a review. *The Chinese Journal of Physiology*, 49(5), 234–243.
- Chiang, C., Ladas, T.P, González-Reyes, L.E. & Durand, D.M. (2014). Seizure suppression by high frequency optogenetic stimulation using in vitro and in vivo animal models of epilepsy. *Brain Stimulation*, 7 (6), 890:899. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2014.07.034>
- Chiang, C., Lin, C.K., Ju, M. & Durand, D.M. (2013). High frequency stimulation can suppress globally seizures induced by 4-AP in the rat hippocampus: an acute in vivo study. *Brain Stimulation*, 6, 180:189. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2012.04.008>
- Chiavegato, A., Zurolo, E., Losi, G., Aronica, E., & Carmignoto, G. (2014). The inflammatory molecules IL-1 $\beta$  and HMGB1 can rapidly enhance focal seizure generation in a brain slice model of temporal lobe epilepsy. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 155. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00155>
- Chihorek, A. M., Abou-Khalil, B., & Malow, B. A. (2007). Obstructive sleep apnea is associated with seizure occurrence in older adults with epilepsy. *Neurology*, 69 (19), 1823–1827. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000279334.78298.d5>
- Chiou, L. C., Liao, Y. Y., Fan, P. C., Kuo, P. H., Wang, C. H., Riemer, C., & Prinssen, E. P. (2007). Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Current drug targets*, 8 (1), 117–135. <https://doi.org/10.2174/138945007779315605>
- Chitu, V., Gokhan, Ş., Nandi, S., Mehler, M. F., & Stanley, E. R. (2016). Emerging Roles for CSF-1 Receptor and its Ligands in the Nervous System. *Trends in neurosciences*, 39 (6), 378–393. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.03.005>
- Cho, W. H., Barcelon, E., & Lee, S. J. (2016). Optogenetic Glia Manipulation: Possibilities and Future Prospects. *Experimental Neurobiology*, 25 (5), 197–204. <https://doi.org/10.5607/en.2016.25.5.197>
- Chu, V. T., Weber, T., Graf, R., Sommermann, T., Petsch, K., Sack, U., Volchkov, P., Rajewsky, K., & Kühn, R. (2016). Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. *BMC biotechnology*, 16, 4. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0234-4>
- Clarkson, B., Kahoud, R. J., McCarthy, C. B., & Howe, C. L. (2017). Inflammatory cytokine-induced changes in neural network activity measured by waveform analysis of high-

- content calcium imaging in murine cortical neurons. *Scientific reports*, 7 (1), 9037. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09182-5>
- Clement, A. B., Hawkins, E. G., Lichtman, A. H., & Cravatt, B. F. (2003). Increased seizure susceptibility and proconvulsant activity of anandamide in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23 (9), 3916–3923. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-09-03916.2003>
- Coleman, L.G., Zou, J., Crews, F.T. 2020. Microglial depletion and repopulation in brain slice culture normalizes sensitized proinflammatory signaling. *Journal of Neuroinflammation*, 17 (1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1678-y>
- Colonna, M. & Butovski, O. (2017). Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *The Annual Review of Immunology*, 35, 441:468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- Cornford, E. M., Hyman, S., Cornford, M. E., Landaw, E. M., & Delgado-Escueta, A. V. (1998). Interictal seizure resections show two configurations of endothelial Glut1 glucose transporter in the human blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 18 (1), 26–42. <https://doi.org/10.1097/00004647-199801000-00003>
- Costero, I. (1930). Estudio del comportamiento de la microglía cultivada “in vitro”. *Memorias de la real sociedad española de historia natural*, 14 (2): 123-182.
- Crosio, C., Valle, C., Casciati, A., Iaccarino, C., & Carri, M. T. (2011). Astroglial inhibition of NF- $\kappa$ B does not ameliorate disease onset and progression in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PloS one*, 6 (3), e17187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017187>
- Cserép, C., Pósfai, B., Lénart, N., Fekete, R., László, Z.I., Lele, Z., Orsolits, B., Molnár, G., Heindl, S., Schwarcz, A., Ujvári, K., Környei, Z., Tóth, K., Szabadits, E., Sperlágh, B., Baranyi, M., Csiba, L., Hortobágyi, T., Maglóczky, Z., Martinecz, B., Szabó, G., Erdélyi, F., Szipöcs, Tamkun, M.M., Gesierich, B., Duering, M., Katona, I., Liesz, A., Tamás, G., Dénes, A. 2020. Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science*, 367, 528-537. <https://doi.org/10.1126/science.aax6752>
- Cuéllar-Herrera, M., Velasco, M., Velasco, F., Velasco, A. L., Jiménez, F., Orozco, S., Briones, M., & Rocha, L. (2004). Evaluation of GABA system and cell damage in parahippocampus of patients with temporal lobe epilepsy showing antiepileptic effects after subacute electrical stimulation. *Epilepsia*, 45 (5), 459–466. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.43503.x>
- Cuesta, M., Boudreau, P., Dubeau-Laramée, G., Cermakian, N., & Boivin, D. B. (2016). Simulated Night Shift Disrupts Circadian Rhythms of Immune Functions in Humans. *Journal of immunology*, 196 (6), 2466–2475. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502422>
- Cui, J., Bressler, S.L., Ding, M. & Liang, H. (2008). BSMART: a MATLAB/C toolbox for analysis of multichannel neural time series. *Neural Networks*, 21 (8), 1094:1104.
- Cummins T. R. (2007). Setting up for the block: the mechanism underlying lidocaine's use-dependent inhibition of sodium channels. *The Journal of physiology*, 582 (Pt 1), 11. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.136671>
- Cunha, C., Gomes, C., Vaz, A.R. & Brites, D. (2016). Exploring new inflammatory biomarkers and pathways during LPS-induced M1 polarization. *Mediators of Inflammation*, 2016 (6986175), 1:18. <https://doi.org/10.1155/2016/6986175>
- da Silva, M. P., Magalhães, K. S., de Souza, D. P., & Moraes, D. (2021). Chronic intermittent hypoxia increases excitability and synaptic excitation of protruder and retractor

- hypoglossal motoneurons. *The Journal of physiology*, 599 (6), 1917–1932. <https://doi.org/10.1113/JP280788>
- Dashzeveg, S., Oka, Y., Purevtogtokh, M., Tumurbaatar, E., Lkhagvasuren, B., Luvsannorov, O., & Boldbaatar, D. (2021). Obstructive Sleep Apnea in a Clinical Population: Prevalence, Predictive Factors, and Clinical Characteristics of Patients Referred to a Sleep Center in Mongolia. *International journal of environmental research and public health*, 18 (22), 12032. <https://doi.org/10.3390/ijerph182212032>
- Daulatzai M. A. (2012). Pathogenesis of cognitive dysfunction in patients with obstructive sleep apnea: a hypothesis with emphasis on the nucleus tractus solitarius. *Sleep disorders*, 2012, 251096. <https://doi.org/10.1155/2012/251096>
- Dauphinee, S. M., & Karsan, A. (2006). Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 86 (1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700366>
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L. & Gan W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8 (6), 752:758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- de Carvalho, C. R., Hoeller, A. A., Franco, P. L., Martini, A. P., Soares, F. M., Lin, K., Prediger, R. D., Whalley, B. J., & Walz, R. (2016). The cannabinoid CB2 receptor-specific agonist AM1241 increases pentylentetrazole-induced seizure severity in Wistar rats. *Epilepsy research*, 127, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.08.011>
- de Lombares, C., Heude, E., Alfama, G., Fontaine, A., Hassouna, R., Vernochet, C., de Chaumont, F., Olivo-Marin, C., Ey, E., Parnaudeau, S., Tronche, F., Bourgeron, T., Luquet, S., Levi, G., & Narboux-Nême, N. (2019). Dlx5 and Dlx6 expression in GABAergic neurons controls behavior, metabolism, healthy aging and lifespan. *Aging*, 11 (17), 6638–6656. <https://doi.org/10.18632/aging.102141>
- De Oliviera, P.G., Ramos, M.R., Amaro, A.J., Dias, R.A. & Vierira, S.I. (2019). Gi/o-protein coupled receptors in the aging brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11:89. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00089>
- De Sarro, G., Russo, E., Ferreri, G., Giuseppe, B., Flocco, M. A., Di Paola, E. D., & De Sarro, A. (2004). Seizure susceptibility to various convulsant stimuli of knockout interleukin-6 mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 77 (4), 761–766. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.01.012>
- De Simoni, M. G., Del Bo, R., De Luigi, A., Simard, S., & Forloni, G. (1995). Central endotoxin induces different patterns of interleukin (IL)-1 beta and IL-6 messenger ribonucleic acid expression and IL-6 secretion in the brain and periphery. *Endocrinology*, 136 (3), 897–902. <https://doi.org/10.1210/endo.136.3.7867598>
- De Simoni, M. G., Perego, C., Ravizza, T., Moneta, D., Conti, M., Marchesi, F., De Luigi, A., Garattini, S., & Vezzani, A. (2000). Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *The European journal of neuroscience*, 12 (7), 2623–2633. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00140.x>
- Deisseroth K. (2011). Optogenetics. *Nature Methods*, 8 (1), 26–29. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.324>
- Deisseroth K. (2015). Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nature Neuroscience*, 18 (9), 1213–1225. <https://doi.org/10.1038/nn.4091>
- Del Río Hortega, P. (1921). El tercer elemento de los centros nerviosos: histogénesis y evolución normal; éxodo y distribución regional de la microglía. *Memorias de la real sociedad española de historia natural*, 11 (6): 213-268.



- Del Río-Hortega Bereciartu J. (2020). Pío del Río-Hortega: The Revolution of Glia. *Anatomical record*, 303 (5), 1232–1241. <https://doi.org/10.1002/ar.24266>
- Del Río-Hortega, P. (1919a). El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. *Boletín de la sociedad española de biología*, 9: 68–82.
- Del Río-Hortega, P. (1919b). El tercer elemento de los centros nerviosos. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos. *Boletín de la sociedad española de biología*, 9: 91–103.
- Del Río-Hortega, P. (1919c). El tercer elemento de los centros nerviosos. III. Naturaleza probable de la microglía. *Boletín de la sociedad española de biología*, 9: 108–120.
- Del Río-Hortega, P. (1919d). El tercer elemento de los centros nerviosos. IV. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Boletín de la sociedad española de biología*, 9: 154–166
- Delhaye, S., Paul, S., Blakqori, G., Minet, M., Weber, F., Staeheli, P., & Michiels, T. (2006). Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (20), 7835–7840. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602460103>
- Dempsey, J. A., Veasey, S. C., Morgan, B. J., & O'Donnell, C. P. (2010). Pathophysiology of sleep apnea. *Physiological reviews*, 90 (1), 47–112. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2008>
- Desjardins, P., Sauvageau, A., Bouthillier, A., Navarro, D., Hazell, A. S., Rose, C., & Butterworth, R. F. (2003). Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. *Neurochemistry international*, 42 (4), 299–303. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(02\)00101-8](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(02)00101-8)
- Devinsky, O., Ehrenberg, B., Barthlen, G. M., Abramson, H. S., & Luciano, D. (1994). Epilepsy and sleep apnea syndrome. *Neurology*, 44 (11), 2060–2064. <https://doi.org/10.1212/wnl.44.11.2060>
- Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T., Jette, N., Scheffer, I.E., de Curtis, M. & Perucca, P. (2018). Epilepsy. *Nature Reviews*, 3 (18024), 1:24. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.24>
- Diagana M., Bhalia, D., Ngoungou, E.B. & Preux, P.M. (2010). Epidemiology of epilepsies in resource-poor countries. En Panayiotopoulos C.P. (Ed). *Atlas of epilepsies* (pp. 57-63). Reino Unido: Springer Reference.
- Dinkelacker, V., Xin, X., Baulac, M., Samson, S., & Dupont, S. (2016). Interictal epileptic discharge correlates with global and frontal cognitive dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & behavior*, 62, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.07.009>
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry*, 139 Suppl 2 (Suppl 2), 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- Dixit, A. B., Banerjee, J., Srivastava, A., Tripathi, M., Sarkar, C., Kakkar, A., Jain, M., & Chandra, P. S. (2016). RNA-seq analysis of hippocampal tissues reveals novel candidate genes for drug refractory epilepsy in patients with MTLE-HS. *Genomics*, 107 (5), 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2016.04.001>
- Doherty, M. J., Rostad, S. W., Kraemer, D. L., Vossler, D. G., & Haltiner, A. M. (2007). Neocortical gliosis in temporal lobe epilepsy: gender-based differences. *Epilepsia*, 48 (8), 1455–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01046.x>
- Dominguez-Meijide, A., Rodriguez-Perez, A.I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, J. & Labandeira-Garcia, J.L. (2017). Dopamine modulates astroglial and microglial activity via glial renin-angiotensin system in cultures. *Brain, Behavior, and Immunity*, 62, 277:290. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.02.013>

- Donegan, J. J., Girotti, M., Weinberg, M. S., & Morilak, D. A. (2014). A novel role for brain interleukin-6: facilitation of cognitive flexibility in rat orbitofrontal cortex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 34 (3), 953–962. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3968-13.2014>
- Dong, J., Zhan, X., Sun, H., Fang, F., & Wei, Y. (2022). Olfactory dysfunction is associated with cognitive impairment in patients with obstructive sleep apnea: a cross-sectional study. *European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 10.1007/s00405-021-07194-6. <https://doi.org/10.1007/s00405-021-07194-6>
- Doorn, J.J., Brevé, J.J., Drukarch, B., Boddeke, H.W., Huitinga, I., Lucassen, P.J. & van Dam, A.M. (2015). Brain region-specific gene expression profiles in freshly isolated rat microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 9:84. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00084>
- Dou, Y., Wu, H. J., Li, H. Q., Qin, S., Wang, Y. E., Li, J., Lou, H. F., Chen, Z., Li, X. M., Luo, Q. M., & Duan, S. (2012). Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell research*, 22 (6), 1022–1033. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.10>
- Drabek, T., Janata, A., Jackson, E. K., End, B., Stezoski, J., Vagni, V. A., Janesko-Feldman, K., Wilson, C. D., van Rooijen, N., Tisherman, S. A., & Kochanek, P. M. (2012). Microglial depletion using intrahippocampal injection of liposome-encapsulated clodronate in prolonged hypothermic cardiac arrest in rats. *Resuscitation*, 83 (4), 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2011.09.016>
- Dudvarski-Stankovic, N., Teodorczyk, M., Ploen, R., Zipp, F., & Schmidt, M. (2016). Microglia-blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. *Acta neuropathologica*, 131 (3), 347–363. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1524-y>
- Dumitrascu, R., Heitmann, J., Seeger, W., Weissmann, N., & Schulz, R. (2013). Obstructive sleep apnea, oxidative stress and cardiovascular disease: lessons from animal studies. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 234631. <https://doi.org/10.1155/2013/234631>
- Duperray, A., Barbe, D., Raguenez, G., Weksler, B. B., Romero, I. A., Couraud, P. O., Perron, H., & Marche, P. N. (2015). Inflammatory response of endothelial cells to a human endogenous retrovirus associated with multiple sclerosis is mediated by TLR4. *International immunology*, 27 (11), 545–553. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv025>
- Eckardt, D., Theis, M., Döring, B., Speidel, D., Willecke, K., & Ott, T. (2004). Spontaneous ectopic recombination in cell-type-specific Cre mice removes loxP-flanked marker cassettes in vivo. *Genesis*, 38 (4), 159–165. <https://doi.org/10.1002/gene.20011>
- Eichhoff, G., Brawek, B. & Garaschuk, O. (2011). Microglial calcium signal acts as a rapid sensor of single neuron damage in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813, 1014:1024. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.018>
- Ekdahl, C.T. (2012). Microglial activation – tuning and pruning adult neurogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 41. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00041>
- El Gaamouch, F., Audrain, M., Lin, W. J., Beckmann, N., Jiang, C., Hariharan, S., Heeger, P. S., Schadt, E. E., Gandy, S., Ehrlich, M. E., & Salton, S. R. (2020). VGF-derived peptide TLQP-21 modulates microglial function through C3aR1 signaling pathways and reduces neuropathology in 5xFAD mice. *Molecular neurodegeneration*, 15 (1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-0357-x>
- Elmadany, N., de Almeida Sassi, F., Wendt, S., Loggiacco, F., Visser, J., Haage, V., Hernandez, D. P., Mertins, P., Hambardzumyan, D., Wolf, S., Kettenmann, H., & Semtner, M. (2020). The VGF-derived Peptide TLQP21 Impairs Purinergic Control of

- Chemotaxis and Phagocytosis in Mouse Microglia. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 40 (17), 3320–3331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1458-19.2020>
- Elmore, M. R., Najafi, A. R., Koike, M. A., Dagher, N. N., Spangenberg, E. E., Rice, R. A., Kitazawa, M., Matusow, B., Nguyen, H., West, B. L., & Green, K. N. (2014). Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*, 82 (2), 380–397. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.040>
- Engel, J. & Schwartzkroin, P.A. (2006). What should be modeled? En Pitkänen, A., *Models of seizures and epilepsy* (pp. 35-44). Estados Unidos de América: Elsevier Academic Press.
- Engel, J. (1996). Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*, 26 (1), 141:150. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(96\)00043-5](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(96)00043-5)
- Engel, J., Jr, Pitkänen, A., Loeb, J. A., Dudek, F. E., Bertram, E. H., 3rd, Cole, A. J., Moshé, S. L., Wiebe, S., Jensen, F. E., Mody, I., Nehlig, A., & Vezzani, A. (2013). Epilepsy biomarkers. *Epilepsia*, 54 Suppl 4 (4), 61–69. <https://doi.org/10.1111/epi.12299>
- Eslami, M., Sayyah, M., Soleimani, M., Alizadeh, L. & Hadjighassem, M. (2015). Lipopolysaccharide preconditioning prevents acceleration of kindling epileptogenesis induced by traumatic brain injury. *Journal of Neuroimmunology*, 289, 143:151. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.11.003>
- Evans, M. S., & Viola-McCabe, K. E. (1996). Midazolam inhibits long-term potentiation through modulation of GABAA receptors. *Neuropharmacology*, 35 (3), 347–357. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00182-4](https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00182-4)
- Eyo, U.B., Gu, N., De, S., Dong, H., Richardson, J.R., & Wu, L.J. (2015). Modulation of microglial process convergence toward neuronal dendrites by extracellular calcium. *Journal of Neuroscience*, 35 (6), 2417-2422. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3279-14.2015>
- Eyo, U.B., Murugan, M. & Wu, L.J. (2016). Microglia-neuron communication in epilepsy. *Glia*, 65 (1), 1:14. <https://doi.org/10.1002/glia.23006>
- Eyo, U.B., Peng, J., Swiatkowski, P., Mukherjee, A., Bispo, A. & Wu, L.J. (2014). Neuronal hyperactivity recruits microglial processes via neuronal NMDA receptors and microglial P2Y12 receptors after status epilepticus. *The journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience*, 34 (32), 10528-10540. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0416-14.2014>
- Ezpeleta, D., Morales, F., & Giménez-Roldán, S. (2019). Nicolás Achúcarro y la histopatología de la rabia: una invitación histórica de Nissl y Alzheimer. *Neurosciences and History*, 7(4), 122-136.
- Fabene, P.F., Bramanti, P. & Constantin, G. (2010). The emerging role for chemokines in Epilepsy. *Journal of Neuroimmunology*, 224, 22:27. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.05.016>
- Färber, K. & Kettenmann, H. (2006). Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia*, 54, 656:665. <https://doi.org/10.1002/glia.20412>
- Färber, K., Cheung, G., Mitchell, D., Wallis, R., Weihe, E., Schwaeble, W., & Kettenmann, H. (2009). C1q, the recognition subcomponent of the classical pathway of complement, drives microglial activation. *Journal of neuroscience research*, 87 (3), 644–652. <https://doi.org/10.1002/jnr.21875>
- Ferando, I., & Mody, I. (2015). In vitro gamma oscillations following partial and complete ablation of  $\delta$  subunit-containing GABAA receptors from parvalbumin interneurons. *Neuropharmacology*, 88, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.09.010>

- Ferreira, R., Santos, T., Gonçalves, J., Baltazar, G., Ferreira, L., Agasse, F. & Bernardino, L. (2012). Histamine modulates microglia function. *Journal of neuroinflammation*, 9 (1), 90:106. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-90>
- Ferrini, F., & De Koninck, Y. (2013). Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural plasticity*, 2013, 429815. <https://doi.org/10.1155/2013/429815>
- Finkel T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology*, 194 (1), 7–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., & Zuberi, S. M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58 (4), 522–530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Jr, Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55 (4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J., Jr (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46 (4), 470–472. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>
- Foldvary-Schaefer, N., Stephenson, L., & Bingaman, W. (2008). Resolution of obstructive sleep apnea with epilepsy surgery? Expanding the relationship between sleep and epilepsy. *Epilepsia*, 49 (8), 1457–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01677.x>
- Forcelli P. A. (2017). Applications of optogenetic and chemogenetic methods to seizure circuits: Where to go next? *Journal of Neuroscience Research*, 95 (12), 2345–2356. <https://doi.org/10.1002/jnr.24135>
- Fragoso, J. M., Vargas Alarcón, G., Jiménez Morales, S., Reyes Hernández, O. D., & Ramírez Bello, J. (2014). El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. *Gaceta medica de Mexico*, 150 (4), 334–344.
- Francisco, S., Billod, J. M., Merino, J., Punzón, C., Gallego, A., Arranz, A., Martin-Santamaria, S., & Fresno, M. (2022). Induction of TLR4/TLR2 Interaction and Heterodimer Formation by Low Endotoxic Atypical LPS. *Frontiers in immunology*, 12, 748303. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.748303>
- Franco-Bocanegra, D.K., McAuley, C., Nicoll, J.A.R. & Boche, D. (2019). Molecular mechanisms of microglial motility: Changes in ageing and Alzheimer's disease. *Cells*, 8 (6), 639:660. <https://doi.org/10.3390/cells8060639>
- Franklin, K. & Paxinos, G. (2007). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Estados Unidos: Academic Press.
- Frantseva, M.V., Perez, J.L., Carlen, P.L. (1998). Changes in membrane and synaptic properties of thalamocortical circuitry caused by hydrogen peroxide. *Journal of Neurophysiology*, 80 (3), 1317:1326. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.3.1317>
- Freilich, R.W., Woodbury, M.E. & Ikezu, T. (2012). Integrated expression profiles of mRNA and miRNA in polarized primary murine microglia. *PLoS ONE*, 8 (11), e79416:e79416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079416>
- Fricker, M., Oliva-Martín, M. J., & Brown, G. C. (2012). Primary phagocytosis of viable neurons by microglia activated with LPS or A $\beta$  is dependent on calreticulin/LRP

- phagocytic signalling. *Journal of neuroinflammation*, 9, 196.  
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-196>
- Fujii, M., Ohya, S., Yamamura, H., & Imaizumi, Y. (2012). Development of recombinant cell line co-expressing mutated Nav1.5, Kir2.1, and hERG for the safety assay of drug candidates. *Journal of biomolecular screening*, 17 (6), 773–784.  
<https://doi.org/10.1177/1087057112442102>
- Fujiwara-Tsukamoto, Y., Isomura, Y., Kaneda, K., & Takada, M. (2004). Synaptic interactions between pyramidal cells and interneurone subtypes during seizure-like activity in the rat hippocampus. *The Journal of physiology*, 557(Pt 3), 961–979.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.059915>
- Fukumoto, Y., Tanaka, K., Parajuli, B., Shibata, K., Yoshioka, H., Kanemaru, K., Gachet, C., Ikenaka, K., Koizumi S. & Kinouchi, H. (2018). Neuroprotective effects of microglial P2Y1 receptors against ischemic neuronal injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 39 (11), 2144:2156. <https://doi.org/10.1177/0271678X18805317>
- Fung, K. Y., Wang, C., Nyegaard, S., Heit, B., Fairn, G. D., & Lee, W. L. (2017). SR-BI Mediated Transcytosis of HDL in Brain Microvascular Endothelial Cells Is Independent of Caveolin, Clathrin, and PDZK1. *Frontiers in physiology*, 8, 841.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00841>
- Gabay, C., Lamacchia, C., & Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature reviews. Rheumatology*, 6 (4), 232–241.  
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.4>
- Gaines, J., Vgontzas, A. N., Fernandez-Mendoza, J., He, F., Calhoun, S. L., Liao, D., & Bixler, E. O. (2017). Increased inflammation from childhood to adolescence predicts sleep apnea in boys: A preliminary study. *Brain, behavior, and immunity*, 64, 259–265.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.04.011>
- Gaínza-Lein, M., Fernández, I. S., Ulate-Campos, A., Loddenkemper, T., & Ostendorf, A. P. (2019). Timing in the treatment of status epilepticus: From basics to the clinic. *Seizure*, 68, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.05.021>
- Gale, S. D., & Hopkins, R. O. (2004). Effects of hypoxia on the brain: neuroimaging and neuropsychological findings following carbon monoxide poisoning and obstructive sleep apnea. *Journal of the International Neuropsychological Society: JINS*, 10(1), 60–71.  
<https://doi.org/10.1017/S1355617704101082>
- Gao, H., Han, Z., Huang, S., Bai, R., Ge, X., Chen, F., & Lei, P. (2017). Intermittent hypoxia caused cognitive dysfunction relate to miRNAs dysregulation in hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 335, 80–87.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.025>
- Gao, H., Ju, F., Ti, R., Zhang, Y., & Zhang, S. (2022). Differential Regulation of Microglial Activation in Response to Different Degree of Ischemia. *Frontiers in immunology*, 13, 792638. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.792638>
- Garcia, A. J., 3rd, Zanella, S., Dashevskiy, T., Khan, S. A., Khuu, M. A., Prabhakar, N. R., & Ramirez, J. M. (2016). Chronic Intermittent Hypoxia Alters Local Respiratory Circuit Function at the Level of the preBötzing Complex. *Frontiers in neuroscience*, 10, 4.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00004>
- García-Marín, V., García-López, P. & Freire, M. (2007). Cajal's contributions to glia research. *TRENDS in Neurosciences*, 30 (9), 479:487.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.06.008>
- Garlanda, C., Dinarello, C.A. & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 famili: Back to the future. *Immunity*, 39 (6), 1003:1018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>
- Gayle, D. A., Ling, Z., Tong, C., Landers, T., Lipton, J. W., & Carvey, P. M. (2002). Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis

- factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide. *Brain research. Developmental brain research*, 133 (1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(01\)00315-7](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(01)00315-7)
- Gesell, F. K., Zoerner, A. A., Brauer, C., Engeli, S., Tsikas, D., & Tipold, A. (2013). Alterations of endocannabinoids in cerebrospinal fluid of dogs with epileptic seizure disorder. *BMC veterinary research*, 9, 262. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-262>
- Glebov, K., Löchner, M., Jabs, R., Lau, T., Merkel, O., Schloss, P., Steinhäuser, C. & Walter, J. (2014). Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells. *Glia*, 63 (4), 626:634. <https://doi.org/10.1002/glia.22772>
- Godoy, B., Murgas, P., Tichauer, J., & Von Bernhardt, R. (2012). Scavenger receptor class A ligands induce secretion of IL1 $\beta$  and exert a modulatory effect on the inflammatory activation of astrocytes in culture. *Journal of neuroimmunology*, 251(1-2), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.06.004>
- Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordão, M. J., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Amann, L., Staszewski, O., Kierdorf, K., Krueger, M., Locatelli, G., Hochgerner, H., Zeiser, R., Epelman, S., Geissmann, F., Priller, J., Rossi, F. M., Bechmann, I., Kerschensteiner, M., Linnarsson, S., ... Prinz, M. (2016). Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nature immunology*, 17 (7), 797–805. <https://doi.org/10.1038/ni.3423>
- Gölz, L., Memmert, S., Rath-Deschner, B., Jäger, A., Appel, T., Baumgarten, G., Götz, W., & Frede, S. (2014). LPS from *P. gingivalis* and hypoxia increases oxidative stress in periodontal ligament fibroblasts and contributes to periodontitis. *Mediators of inflammation*, 2014, 986264. <https://doi.org/10.1155/2014/986264>
- Gomes, C. Ferreira, R., George, J., Sanches, R., Rodrigues, D., Gonçalves, N. & Cunha, R.A. (2013). Activation of microglial cells triggers a release of BDNF inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 1, 10:16. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-16>
- Gómez-Eguílaz, M., Ramón-Trapero, J. L., Pérez-Martínez, L., & Blanco, J. R. (2018). The beneficial effect of probiotics as a supplementary treatment in drug-resistant epilepsy: a pilot study. *Beneficial microbes*, 9 (6), 875–881. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0018>
- Gong, L. J., Wang, X. Y., Gu, W. Y., & Wu, X. (2020). Pinocembrin ameliorates intermittent hypoxia-induced neuroinflammation through BNIP3-dependent mitophagy in a murine model of sleep apnea. *Journal of Neuroinflammation*, 17 (1), 337. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02014-w>
- Goodkin, H. P., Joshi, S., Mtchedlishvili, Z., Brar, J., & Kapur, J. (2008). Subunit-specific trafficking of GABA(A) receptors during status epilepticus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28 (10), 2527–2538. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3426-07.2008>
- Gorter, J.A., van Vliet, E.A. & Aronica, E. (2015). Status epilepticus, blood-brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. *Epilepsy and Behavior*, 49, 13:16. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.047>
- Gourine, A. V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M. F., Lane, S., Teschemacher, A. G., Spyer, K. M., Deisseroth, K., & Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*, 329 (5991), 571–575. <https://doi.org/10.1126/science.1190721>
- Goussakov, I., Synowiec, S., Aksenov, D. P., & Drobyshevsky, A. (2021). Occlusion of activity dependent synaptic plasticity by late hypoxic long term potentiation after neonatal intermittent hypoxia. *Experimental neurology*, 337, 113575. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113575>

- Goutaudier, R., Coizet, V., Carcenac, C. & Carnicella, S. (2019). DREADDs: The power of the lock, the weakness of the key. Favoring the pursuit of specific conditions rather than specific ligands. *eNeuro*, 6 (5), 1:5. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0171-19.2019>
- Grace, P.M., Strand, K.A., Galer, E.L., Urban, D.J., Wang, X., Baratta, M.V., Fabisiak, T., Anderson, N.D., Cheng, K., Greene, L.I., Berkelhammer, D., Zhang, Y., Ellis, A.L., Yin, H.H., Campeau, S., Rice, K., Roth, B.L. Maier, S.F. & Watkins, L.R. (2016). Morphine paradoxically prolongs neuropathic pain in rats by amplifying spinal NLRP3 inflammasome activation. *PNAS*, 113 (24), E441:E3450. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602070113>
- Grace, P.M., Wang, X.W., Strand, K.A., Baratta, M.V., Zhang, Y., Galer, E.L., Yin, H., Maier, S.F. & Watkins, L.R. (2018). DREADDED microglia in pain: Implications for spinal inflammatory signaling in male rats. *Experimental Neurology*, 304, 125:131. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.03.005>
- Graeber, M.B. (2010). Changing face of microglia. *Science*, 330 (6005), 783:788. <https://doi.org/10.1126/science.1190929>
- Gross, A., Benninger, F., Madar, R., Illouz, T., Griffioen, K., Steiner, I., Offen, D., & Okun, E. (2017). Toll-like receptor 3 deficiency decreases epileptogenesis in a pilocarpine model of SE-induced epilepsy in mice. *Epilepsia*, 58 (4), 586–596. <https://doi.org/10.1111/epi.13688>
- Grosselin, Skola, D., Coufal, N.G., Holtman, I.R., Schlachetzki, J.M.C., Sajti, E., Jaeger, B.N., O'Connor, C., Fitzpatrick, C., Pasillas, M.P., Pena, M., Adair, A., Gonda, D.D., Levy, M.L., Ransohoff, R.M., Gage, F.H. & Glass, C.K. (2017). An environmental-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science*, 256 (6344), eaa13222. <https://doi.org/10.1126/science.aal3222>
- Guerrero-Zúñiga, S., Gaona-Pineda, E. B., Cuevas-Nasu, L., Torre-Bouscoulet, L., Reyes-Zúñiga, M., Shamah-Levy, T., & Perez-Padilla, R. (2018). Prevalencia de síntomas de sueño y riesgo de apnea obstructiva del sueño en México. *Salud pública de México*, 60 (3), 347–355. <https://doi.org/10.21149/9280>
- Gullo, F., Amadeo, A., Donvito, G., Lecchi, M., Costa, B., Constanti, A. & Wanke, E. (2014). Atypical “seizure-like” activity in cortical reverberating networks in vitro can be caused by LPS-induced inflammation: a multi-electrode array study from a hundred neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8 (361), 1:18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00361>
- Gustafsson, B., Galvan, M., Grafe, P., & Wigström, H. (1982). A transient outward current in a mammalian central neurone blocked by 4-aminopyridine. *Nature*, 299 (5880), 252–254. <https://doi.org/10.1038/299252a0>
- Gyoneva, S. & Traynelis, S.F. (2013). Norepinephrine modulates the motility of resting microglia and activated microglia via different adrenergic receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 15291:15302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.458901>
- Hahn, E., & Burrell, B. (2015). Pentylentetrazol-induced seizure-like behavior and neural hyperactivity in the medicinal leech. *Invertebrate neuroscience: IN*, 15 (1), 177. <https://doi.org/10.1007/s10158-014-0177-1>
- Hahnenkamp, K., Durieux, M. E., Hahnenkamp, A., Schauerte, S. K., Hoenemann, C. W., Vegh, V., Theilmeier, G., & Hollmann, M. W. (2006). Local anaesthetics inhibit signalling of human NMDA receptors recombinantly expressed in *Xenopus laevis* oocytes: role of protein kinase C. *British journal of anaesthesia*, 96 (1), 77–87. <https://doi.org/10.1093/bja/aei271>
- Hailer, N.P., Vogt, C., Korf, H. & Dehghani, F. (2005). Interleukin-1b exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation

- after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice culture. *European Journal of Neuroscience*, 22, 2347:2360. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04067.x>
- Hall, M. B., Habash, N. M., Haas, N. A., & Schwarz, J. M. (2022). A method for the selective depletion of microglia in the dorsal hippocampus in the juvenile rat brain. *Journal of neuroscience methods*, 374, 109567. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2022.109567>
- Han, X., Li, Q., Lan, X., El-Mufti, L., Ren, H., & Wang, J. (2019). Microglial Depletion with Clodronate Liposomes Increases Proinflammatory Cytokine Levels, Induces Astrocyte Activation, and Damages Blood Vessel Integrity. *Molecular neurobiology*, 56 (9), 6184–6196. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1502-9>
- Hanlon, L. A., Huh, J. W., & Raghupathi, R. (2016). Minocycline Transiently Reduces Microglia/Macrophage Activation but Exacerbates Cognitive Deficits Following Repetitive Traumatic Brain Injury in the Neonatal Rat. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 75 (3), 214–226. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlv021>
- Harik, N., Harik, S. I., Kuo, N. T., Sakai, K., Przybylski, R. J., & LaManna, J. C. (1996). Time-course and reversibility of the hypoxia-induced alterations in cerebral vascularity and cerebral capillary glucose transporter density. *Brain research*, 737 (1-2), 335–338. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00965-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00965-1)
- Hasegawa-Ishii, S., Inaba, M., Umegaki, H., Unno, K., Wakabayashi, K., & Shimada, A. (2016). Endotoxemia-induced cytokine-mediated responses of hippocampal astrocytes transmitted by cells of the brain-immune interface. *Scientific reports*, 6, 25457. <https://doi.org/10.1038/srep25457>
- Hashim, S. N., Abdullah, B., Abdullah, J. M., Tharakan, J., & Musa, Y. (2013). Quality of life of epilepsy patients with obstructive sleep apnea in Malaysia. *Biomedical Research*, 24(2), 230-234.
- Heckers, S., & Konradi, C. (2015). GABAergic mechanisms of hippocampal hyperactivity in schizophrenia. *Schizophrenia research*, 167 (1-3), 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.09.041>
- Hedrick, T., & Waters, J. (2015). Acetylcholine excites neocortical pyramidal neurons via nicotinic receptors. *Journal of neurophysiology*, 113 (7), 2195–2209. <https://doi.org/10.1152/jn.00716.2014>
- Hedrick, T., Danskin, B., Larsen, R. S., Ollerenshaw, D., Groblewski, P., Valley, M., Olsen, S., & Waters, J. (2016). Characterization of Channelrhodopsin and Archaelrhodopsin in Cholinergic Neurons of Cre-Lox Transgenic Mice. *PloS one*, 11 (5), e0156596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156596>
- Heindl, S., Gesierich, B., Benakis, C., Llovera, G., Duering, M., & Liesz, A. (2018). Automated Morphological Analysis of Microglia After Stroke. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 106. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00106>
- Heinemann, U., Kann, O., & Schuchmann, S. (2006). An overview of in vitro seizure models in acute and organotypic slices. In Pitkänen, A., Schwartzkroin, P.A. & Moshé, S.L. (Eds.). *Models of Seizures and Epilepsy* (pp. 35-44). Estados Unidos: Elsevier Academic Press.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*, 374 (Pt 1), 1–20. <https://doi.org/10.1042/BJ20030407>
- Heldt, S. A., & Ressler, K. J. (2010). Amygdala-specific reduction of alpha1-GABAA receptors disrupts the anticonvulsant, locomotor, and sedative, but not anxiolytic, effects of benzodiazepines in mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30 (21), 7139–7151. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0693-10.2010>



- Heltovics, G., Boda, B., & Szente, M. (1995). Anticonvulsive effect of urethane on aminopyridine-induced epileptiform activity. *Neuroreport*, 6 (3), 577–580. <https://doi.org/10.1097/00001756-199502000-00042>
- Heo, C., Park, H., Kim, Y. T., Baeg, E., Kim, Y. H., Kim, S. G., & Suh, M. (2016). A soft, transparent, freely accessible cranial window for chronic imaging and electrophysiology. *Scientific reports*, 6, 27818. <https://doi.org/10.1038/srep27818>
- Hernández-Soto, R., Villasana-Salazar, B., Pinedo-Vargas, L., & Peña-Ortega, F. (2021). Chronic intermittent hypoxia alters main olfactory bulb activity and olfaction. *Experimental Neurology*, 340, 113653. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113653>
- Hetier, E., Ayala, J., Denéfle, P., Bousseau, A., Rouget, P., Mallat, M & Prochiantz, A. (1988). Brain macrophages synthesize interleukin-1 and interleukin-1 mRNAs in vitro. *The Journal of Neuroscience Research*, 21, 391:397. <https://doi.org/10.1002/jnr.490210230>
- Hewapathirane, D. S., Dunfield, D., Yen, W., Chen, S., & Haas, K. (2008). In vivo imaging of seizure activity in a novel developmental seizure model. *Experimental neurology*, 211 (2), 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.02.012>
- Hiragi, T., Ikegaya, Y., & Koyama, R. (2018). Microglia after Seizures and in Epilepsy. *Cells*, 7 (4), 26. <https://doi.org/10.3390/cells7040026>
- Hocker, S., Tatum, W.O., LaRoche, S. & Freeman, W.D. (2014). Refractory and super-refractory status epilepticus-an update. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 14 (6), 452:461. <https://doi.org/10.1007/s11910-014-0452-x>
- Hoffmann, A., Kann, O., Ohlemeyer, C., Hanisch, UK. & Kettenmann, H. (2003). Elevation of basal intracellular calcium as a central element of activation of brain macrophages (microglia): Suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function. *The Journal of Neuroscience*, 23 (11), 4410:4419. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-11-04410.2003>
- Höllinger, P., Khatami, R., Gugger, M., Hess, C. W., & Bassetti, C. L. (2006). Epilepsy and obstructive sleep apnea. *European neurology*, 55 (2), 74–79. <https://doi.org/10.1159/000092306>
- Huang, L., Jin, J., Chen, K., You, S., Zhang, H., Sideris, A., Norcini, M., Recio-Pinto, E., Wang, J., Gan, W. B., & Yang, G. (2021). BDNF produced by cerebral microglia promotes cortical plasticity and pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. *PLoS Biology*, 19 (7), e3001337. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001337>
- Huang, L., Jin, J., Chen, K., You, S., Zhang, H., Sideris, A., Norcini, M., Recio-Pinto, E., Wang, J., Gan, W. B., & Yang, G. (2021). BDNF produced by cerebral microglia promotes cortical plasticity and pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. *PLoS biology*, 19 (7), e3001337. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001337>
- Huanhuan, J., Hongfei, L., Jiahui, T., Jiayu, H.U., Wei, Y., Tingting, S. & Cuiying, W. (Mayo 2021). Effects of chronic intermittent hypoxia/reoxygenation on body weight and glucose metabolism in rats. Comunicación presentada en: the thirdly congress of asian society of sleep medicine ASSM 2021. Beijing, China.
- Hughes J. R. (2008). Gamma, fast, and ultrafast waves of the brain: their relationships with epilepsy and behavior. *Epilepsy & behavior: E&B*, 13 (1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2008.01.011>
- Huizenga, M. N., Wicker, E., Beck, V. C., & Forcelli, P. A. (2017). Anticonvulsant effect of cannabinoid receptor agonists in models of seizures in developing rats. *Epilepsia*, 58 (9), 1593–1602. <https://doi.org/10.1111/epi.13842>

- Husemann, J., Loike, J.D., Anankov, R., Febbraio, M. & Silverstein, S.C. (2002). Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology, their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia*, 40, 195:205. <https://doi.org/10.1002/glia.10148>
- Ikeda, M., Tsuno, S., Sugiyama, T., Hashimoto, A., Yamoto, K., Takeuchi, K., Kishi, H., Mizuguchi, H., Kohsaka, S. & Yoshioka, T. (2013). Ca<sup>2+</sup> spiking activity caused by the activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels mediates TNF- $\alpha$  release from microglial cells under chronic purinergic stimulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833, 2573:2585. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.022>
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y. & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba 1. *Molecular Brain research*, 57, 1:9. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00040-0)
- Jaseja, H., Goyal, M., & Mishra, P. (2021). Drug-Resistant Epilepsy and Obstructive Sleep Apnea: Exploring a Link Between the Two. *World Neurosurgery*, 146, 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.11.099>
- Jensen, F. E., Applegate, C., Burchfiel, J., & Lombroso, C. T. (1991). Differential effects of perinatal hypoxia and anoxia on long term seizure susceptibility in the rat. *Life sciences*, 49 (5), 399–407. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90448-k](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90448-k)
- Jensen, F.E., Applegate, C.D., Holtzman, D., Belin, T.R., Burchfiel, J.L., (1991). Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Ann. Neurol.* 29 (6), 629–937. <https://doi.org/10.1002/ana.410290610>.
- Jensen, F.E., Holmes, G.L., Lombroso, C.T., Blume, H.K., Firkusny, I.R., (1992). Age-dependent changes in long-term seizure susceptibility and behavior after hypoxia in rats. *Epilepsia* 33 (6), 917–980. <https://doi.org/10.1111/j.15281157.1992.tb01746.x>.
- Jensen, F.E., Wang, C., Stafstrom, C.E., Liu, Z., Geary, C., Stevens, M.C., (1998). Acute and chronic increases in excitability in rat hippocampal slices after perinatal hypoxia in vivo. *J. Neurophysiol.* 79 (1), 73–81. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.1.73>
- Ji, X., Zeng, Y., & Wu, J. (2021). The CB2 Receptor as a Novel Therapeutic Target for Epilepsy Treatment. *International journal of molecular sciences*, 22 (16), 8961. <https://doi.org/10.3390/ijms22168961>
- Jonas, R. A., Yuan, T. F., Liang, Y. X., Jonas, J. B., Tay, D. K., & Ellis-Behnke, R. G. (2012). The spider effect: morphological and orienting classification of microglia in response to stimuli in vivo. *PloS one*, 7 (2), e30763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030763>
- Josephson I. R. (1988). Lidocaine blocks Na, Ca and K currents of chick ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 20 (7), 593–604. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(88\)80117-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(88)80117-2)
- Jun, J., Reinke, C., Bedja, D., Berkowitz, D., Bevans-Fonti, S., Li, J., Barouch, L. A., Gabrielson, K., & Polotsky, V. Y. (2010). Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 209 (2), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.017>
- Jung, S., Alberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A. & Littman, D.R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and Cellular Biology*, 20 (11), 4106:4114. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000>
- Kabba, J. A., Xu, Y., Christian, H., Ruan, W., Chenai, K., Xiang, Y., Zhang, L., Saavedra, J. M., & Pang, T. (2018). Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cellular and molecular neurobiology*, 38 (1), 53–71. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0504-2>
- Kaiser, T., & Feng, G. (2019). Tmem119-EGFP and Tmem119-CreERT2 Transgenic Mice for Labeling and Manipulating Microglia. *eNeuro*, 6 (4), ENEURO.0448-18.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0448-18.2019>

- Kalueff, A. V., Lehtimäki, K. A., Ylinen, A., Honkaniemi, J., & Peltola, J. (2004). Intranasal administration of human IL-6 increases the severity of chemically induced seizures in rats. *Neuroscience letters*, 365 (2), 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.04.061>
- Kan, A. A., de Jager, W., de Wit, M., Heijnen, C., van Zuiden, M., Ferrier, C., van Rijen, P., Gosselaar, P., Hessel, E., van Nieuwenhuizen, O., & de Graan, P. N. (2012). Protein expression profiling of inflammatory mediators in human temporal lobe epilepsy reveals co-activation of multiple chemokines and cytokines. *Journal of neuroinflammation*, 9, 207. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-207>
- Kanaan, A., Farahani, R., Douglas, R. M., Lamanna, J. C., & Haddad, G. G. (2006). Effect of chronic continuous or intermittent hypoxia and reoxygenation on cerebral capillary density and myelination. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 290 (4), R1105–R1114. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00535.2005>
- Kann, O., Papageorgiou, I. E., & Draguhn, A. (2014). Highly energized inhibitory interneurons are a central element for information processing in cortical networks. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34 (8), 1270–1282. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.104>
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 70 (5), 220:233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>
- Karlstetter, M., Nothdurfer, C., Aslanidis, A., Moeller, K., Horn, F., Scholz, R., Neumann, H., Weber, B.H., Rupprecht, R. & Langmann, T. (2014). Translocator protein (18 kDa) (TSPO) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 11:13. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-3>
- Käufer, C., Chhatbar, C., Bröer, S., Walzl, I., Ghita, L., Gerhauser, I., Kalinke, U., & Löscher, W. (2018). Chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 regulate viral encephalitis-induced hippocampal damage but not seizures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115 (38), E8929–E8938. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806754115>
- Kaushal, V., Koeberle, P.D., Wang, Y. & Schichter, L.C. (2007). The Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel KCNN4/KCa3.1 contributes to microglia activation and nitric oxide-dependent neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*, 27 (1), 234:244. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3593-06.2007>
- Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J. K., & Ji, R. R. (2008). Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28 (20), 5189–5194. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3338-07.2008>
- Kaya, Z., Tretter, T., Schlichting, J., Leuschner, F., Afanasyeva, M., Katus, H. A., & Rose, N. R. (2005). Complement receptors regulate lipopolysaccharide-induced T-cell stimulation. *Immunology*, 114 (4), 493–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02113.x>
- Keeley, S., Fenton, A. A., & Rinzel, J. (2017). Modeling fast and slow gamma oscillations with interneurons of different subtype. *Journal of neurophysiology*, 117 (3), 950–965. <https://doi.org/10.1152/jn.00490.2016>
- Keller, A.F., Gravel, M. & Kriz J. (2011). Treatment with minocycline after disease onset alters astrocyte reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice. *Experimental Neurology*, 228, 69:79. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.12.010>

- Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G. D., Herzog, E. D., Volk, H. D., Kramer, A., & Maier, B. (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (50), 21407–21412. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906361106>
- Kettenmann, H., Hanisch, U., Noda, M. & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiology Reviews*, 91, 461:553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F. & Verkhratsky, A. (2012). Microglia: New roles for the synaptic stripper. *Cell Press*, 77 (1), 10:18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Kheirandish-Gozal, L., & Gozal, D. (2019). Obstructive Sleep Apnea and Inflammation: Proof of Concept Based on Two Illustrative Cytokines. *International journal of molecular sciences*, 20 (3), 459. <https://doi.org/10.3390/ijms20030459>
- Kheirandish-Gozal, L., & Gozal, D. (2019). Obstructive Sleep Apnea and Inflammation: Proof of Concept Based on Two Illustrative Cytokines. *International journal of molecular sciences*, 20 (3), 459. <https://doi.org/10.3390/ijms20030459>
- Kheirandish-Gozal, L., Bhattacharjee, R., Bandla, H., & Gozal, D. (2014). Antiinflammatory therapy outcomes for mild OSA in children. *Chest*, 146 (1), 88–95. <https://doi.org/10.1378/chest.13-2288>
- Khuu, M. A., Pagan, C. M., Nallamotheu, T., Hevner, R. F., Hodge, R. D., Ramirez, J. M., & Garcia, A. J., 3rd (2019). Intermittent Hypoxia Disrupts Adult Neurogenesis and Synaptic Plasticity in the Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 39 (7), 1320–1331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1359-18.2018>
- Kiernan, E. A., Smith, S. M., Mitchell, G. S., & Watters, J. J. (2016). Mechanisms of microglial activation in models of inflammation and hypoxia: Implications for chronic intermittent hypoxia. *The Journal of physiology*, 594 (6), 1563–1577. <https://doi.org/10.1113/JP271502>
- Kigerl, K.A., de Rivero, J.P., Dietrich, W.D., Popovich, P.G. & Keane, R.W. (2014). Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Experimental Neurology*, 258, 5:16. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.001>
- Kim, H., Kim, M., Im, S. K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory animal research*, 34 (4), 147–159. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>
- Kim, I., Misna, L.M., Yoon, S., Le, B., Yu, S., Xu, D. & Koh, S. (2015). A postnatal peak in microglial development in the mouse hippocampus is correlated with heightened sensitivity to seizure triggers. *Brain and Behavior*, 5 (12), e00403. <https://doi.org/10.1002/brb3.403>
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). *Inmunología de Kuby*. 6ª Ed. McGraw Hill.
- Klawonn, A. M., Fritz, M., Castany, S., Pignatelli, M., Canal, C., Similä, F., Tejada, H. A., Levinsson, J., Jaarola, M., Jakobsson, J., Hidalgo, J., Heilig, M., Bonci, A., & Engblom, D. (2021). Microglial activation elicits a negative affective state through prostaglandin-mediated modulation of striatal neurons. *Immunity*, 54 (2), 225–234.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.016>
- Klement, W., Garbelli, R., Zub, E., Rossini, L., Tassi, L., Girard, B., Blaquiere, M., Bertaso, F., Perroy, J., de Bock, F. & Marchi, N. (2018). Seizure progression and inflammatory mediators promote pericytosis and pericyte-microglia clustering at the cerebrovasculature. *Neurobiology of Disease*, 113, 70:81. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.02.002>

- Koh, S., Ward, S. L., Lin, M., & Chen, L. S. (2000). Sleep apnea treatment improves seizure control in children with neurodevelopmental disorders. *Pediatric neurology*, 22 (1), 36–39. [https://doi.org/10.1016/s0887-8994\(99\)00114-9](https://doi.org/10.1016/s0887-8994(99)00114-9)
- Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K. & Kohsaka, S. (2013). Purinergic receptors in microglia: Functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P2 receptors. *Glia*, 61, 47:54. <https://doi.org/10.1002/glia.22358>
- Kolosowska, K., Maciejak, P., Szyndler, J., Turzynska, D., Sobolewska, A. & Plaznik, A. (2014). The role of interleukin-1 $\beta$  in the pentylenetetrazole-induced kindling of seizures, in the rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 731, 31:37. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.03.008>
- Kolosowska, K., Maciejak, P., Szyndler, J., Turzynska, D., Sobolewska, A. & Plaznik, A. (2016). The role of IL-1 $\beta$  and glutamate in the effects of lipopolysaccharide on the hippocampal electrical kindling of seizures. *Journal of Neuroimmunology*, 298, 146:152. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.07.018>
- Komorowska-Müller, J. A., & Schmöle, A. C. (2020). CB2 Receptor in Microglia: The Guardian of Self-Control. *International journal of molecular sciences*, 22 (1), 19. <https://doi.org/10.3390/ijms22010019>
- König, C., Morch, E., Eitner, A., Möller, C., Turnquist, B., Schaible, H. G., & Ebersberger, A. (2016). Involvement of Spinal IL-6 Trans-Signaling in the Induction of Hyperexcitability of Deep Dorsal Horn Neurons by Spinal Tumor Necrosis Factor-Alpha. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 36 (38), 9782–9791. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4159-15.2016>
- Kopec, A.M., Smith, C.J., Ayre, N.R., Sweat, S.C. & Bilbo, S.D. (2018). Microglial dopamine receptor elimination defines sex-specific nucleus accumbens development and social behavior in adolescent rats. *Nature Communications*, 9, 3769:3785. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06118-z>
- Korbecki, J., Simińska, D., Gąssowska-Dobrowolska, M., Listos, J., Gutowska, I., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2021). Chronic and Cycling Hypoxia: Drivers of Cancer Chronic Inflammation through HIF-1 and NF- $\kappa$ B Activation: A Review of the Molecular Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 22 (19), 10701. <https://doi.org/10.3390/ijms221910701>
- Kosonowska, E., Janeczko, K., & Setkowicz, Z. (2015). Inflammation induced at different developmental stages affects differently the range of microglial reactivity and the course of seizures evoked in the adult rat. *Epilepsy & Behavior*, 49, 66:70. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.063>
- Kovács, A., Bordás, C., Bíró, T., Hegyi, Z., Antal, M., Szücs, P., & Pál, B. (2017). Direct presynaptic and indirect astrocyte-mediated mechanisms both contribute to endocannabinoid signaling in the pedunclopontine nucleus of mice. *Brain structure & function*, 222 (1), 247–266. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1214-0>
- Kovács, Z., Dobolyi, A., Juhász, G., & Kékesi, K. A. (2014). Lipopolysaccharide induced increase in seizure activity in two animal models of absence epilepsy WAG/Rij and GAERS rats and Long Evans rats. *Brain research bulletin*, 104, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.03.003>
- Kramis, R., Vanderwolf, C.H. & Bland, B.H. (1975) Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: Relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane and pentobarbital. *Experimental Neurology*, 49, 58:85. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(75\)90195-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(75)90195-8)
- Krasnow, S. M., Knoll, J. G., Verghese, S. C., Levasseur, P. R., & Marks, D. L. (2017). Amplification and propagation of interleukin-1 $\beta$  signaling by murine brain endothelial

- and glial cells. *Journal of neuroinflammation*, 14 (1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0908-4>
- Krbot, K., Hermann, P., Krbot Skoric, M., Zerr, I., Sepulveda-Falla, D., Goebel, S., Matschke, J., Krasemann, S. & Glatzel, M. (2018). Distinct microglia profile in Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease is independent of disease kinetics. *Neuropathology*, 38 (6), 591:600. <https://doi.org/10.1111/neup.12517>
- Kremer, D., Schichel, T., Förster, M., Tzekova, N., Bernard, C., van der Valk, P., van Horssen, J., Hartung, H.P., Perrón, H. & Küry, P. (2013). Human endogenous retrovirus type W envelope protein inhibits oligodendroglial precursor cell differentiation. *Annals of Neurology*, 74 (5), 721:732. <https://doi.org/10.1002/ana.23970>
- Kreutzberg, G. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neuroscience*, 19, 312:318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- Kreutzberg, G.W. (1984). 100 years of Nissl staining. *Trends in Neuroscience*, 7 (7), 236:237. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(84\)80213-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(84)80213-1)
- Kuhle, S., Hoffmann, D. U., Mitra, S., & Urschitz, M. S. (2020). Anti-inflammatory medications for obstructive sleep apnoea in children. *The Cochrane database of systematic reviews*, 1 (1), CD007074. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007074.pub3>
- Kumagawa, T., Moro, N., Maeda, T., Kobayashi, M., Furukawa, Y., Shijo, K., & Yoshino, A. (2022). Anti-inflammatory effect of P2Y1 receptor blocker MRS2179 in a rat model of traumatic brain injury. *Brain research bulletin*, 181, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.01.008>
- Kundap, U. P., Paudel, Y. N., Kumari, Y., Othman, I., & Shaikh, M. F. (2019). Embelin Prevents Seizure and Associated Cognitive Impairments in a Pentylenetetrazole-Induced Kindling Zebrafish Model. *Frontiers in pharmacology*, 10, 315. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00315>
- Kuo, C. Y., Hsiao, H. T., Lo, I. H., & Nikolai, T. (2021). Association Between Obstructive Sleep Apnea, Its Treatment, and Alzheimer's Disease: Systematic Mini-Review. *Frontiers in aging neuroscience*, 12, 591737. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.591737>
- Kyrargyri, V., Vega-Flores, G., Gruart, A., Delgado-García, J. M., & Probert, L. (2015). Differential contributions of microglial and neuronal IKK $\beta$  to synaptic plasticity and associative learning in alert behaving mice. *Glia*, 63 (4), 549–566. <https://doi.org/10.1002/glia.22756>
- La, E., & Fischer, S. M. (2001). Transcriptional regulation of intracellular IL-1 receptor antagonist gene by IL-1 alpha in primary mouse keratinocytes. *Journal of immunology*, 166 (10), 6149–6155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.10.6149>
- Labarca, G., Gower, J., Lamperti, L., Dreyse, J., & Jorquera, J. (2020). Chronic intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea: a narrative review from pathophysiological pathways to a precision clinical approach. *Sleep & breathing*, 24 (2), 751–760. <https://doi.org/10.1007/s11325-019-01967-4>
- Lacedonia, D., Salerno, F. G., Carpagnano, G. E., Sabato, R., Depalo, A., & Foschino-Barbaro, M. P. (2011). Effect of CPAP-therapy on bronchial and nasal inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome. *Rhinology*, 49 (2), 232–237. <https://doi.org/10.4193/Rhino10.052>
- Lachos, J., Zattoni, M., Wieser, H. G., Fritschy, J. M., Langmann, T., Schmitz, G., Errede, M., Virgintino, D., Yonekawa, Y., & Frei, K. (2011). Characterization of the gene expression profile of human hippocampus in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsy research and treatment*, 2011, 758407. <https://doi.org/10.1155/2011/758407>

- Laczay, B., & Faulx, M. D. (2021). Obstructive Sleep Apnea and Cardiac Arrhythmias: A Contemporary Review. *Journal of clinical medicine*, 10 (17), 3785. <https://doi.org/10.3390/jcm10173785>
- Lang, B. & Hart, Y. (2010). Autoimmune epilepsy. En Panayiotopoulos C.P. (Ed). *Atlas of epilepsies* (pp. 5:9). Reino Unido: Springer Reference.
- Laprell, L., Schulze, C., Brehme, M. L., & Oertner, T. G. (2021). The role of microglia membrane potential in chemotaxis. *Journal of Neuroinflammation*, 18 (1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02048-0>
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P. & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39 (1), 151:170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-w](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-w)
- Lazarini-Lopes, W., da Silva-Júnior, R., Servilha-Menezes, G., Do Val-da Silva, R. A., & Garcia-Cairasco, N. (2020). Cannabinoid Receptor Type 1 (CB1R) Expression in Limbic Brain Structures After Acute and Chronic Seizures in a Genetic Model of Epilepsy. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 14, 602258. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.602258>
- Leal, B., Chaves, J., Carvalho, C., Rangel R., Santos, A., Bertencourt, A., Lopes, J., Ramalheira, J., Silva, B.M., da Silva, A.M. & Costa, P.P. (2017a). Brain expression of inflammatory mediators in mesial temporal lobe epilepsy patients. *Journal of Neuroimmunology*, 131, 82:88. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.10.014>
- Leal, G., Bramham, C.R. & Duarte, C.B. (2017b). BDNF and hippocampal plasticity. *Vitamins and Hormones*, 104, 153:195. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.10.004>
- Lehenkari, P. P., Kellinsalmi, M., Näpänkangas, J. P., Ylitalo, K. V., Mönkkönen, J., Rogers, M. J., Azhayev, A., Väänänen, H. K., & Hassinen, I. E. (2002). Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Molecular pharmacology*, 61 (5), 1255–1262. <https://doi.org/10.1124/mol.61.5.1255>
- Lei, F., Cui, N., Zhou, C., Chodosh, J., Vavvas, D. G., & Paschalis, E. I. (2020). CSF1R inhibition by a small-molecule inhibitor is not microglia specific; affecting hematopoiesis and the function of macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117 (38), 23336–23338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922788117>
- Leow-Dyke, S., Allen, C., Denes, A., Nilsson, O., Maysami, S., Bowie, A. G., Rothwell, N. J., & Pinteaux, E. (2012). Neuronal Toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro. *Journal of neuroinflammation*, 9, 230. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-230>
- Levy, N., Milikovsky, D.Z., Baranauskas, G., Vinogradov, E., David, Y., Ketzeff, M., Abutbul, S., Weissberg, I., Kamintsky, L., Fleidervish, I., Friedman, A. & Monsonego, A. (2017). Differential TGF- $\beta$  signaling in glial subsets underlies IL-6-mediated epileptogenesis in mice. *Journal of Immunology*, 195, 1713:1722. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401446>
- Li, M., Li, Z., Ren, H., Jin, W. N., Wood, K., Liu, Q., Sheth, K. N., & Shi, F. D. (2017). Colony stimulating factor 1 receptor inhibition eliminates microglia and attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37 (7), 2383–2395. <https://doi.org/10.1177/0271678X16666551>
- Li, X., Chen, W., Sheng, J, Cao, D. & Wang, W. (2014). Interleukin-6 inhibits voltage-gated sodium channel activity of cultured rat spinal cord neurons. *Acta Neuropsychiatrica*, 26 (3), 170:177. <https://doi.org/10.1017/neu.2013.49>

- Li, Y., & Kim, J. (2015). Neuronal expression of CB2 cannabinoid receptor mRNAs in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, 311, 253–267. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.041>
- Li, Y., Du, X., Liu, C., Wen, Z. & Du, J. (2012). Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Developmental Cell*, 23, 1189:1202. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.027>
- Liguori, C., Mercuri, N. B., Izzi, F., Romigi, A., Cordella, A., Sancesario, G., & Placidi, F. (2017). Obstructive Sleep Apnea is Associated With Early but Possibly Modifiable Alzheimer's Disease Biomarkers Changes. *Sleep*, 40 (5), 10.1093/sleep/zsx011. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsx011>
- Lin, W. C., Huang, C. C., Chen, H. L., Chou, K. H., Chen, P. C., Tsai, N. W., Chen, M. H., Friedman, M., Lin, H. C., & Lu, C. H. (2016). Longitudinal brain structural alterations and systemic inflammation in obstructive sleep apnea before and after surgical treatment. *Journal of Translational Medicine*, 14 (1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0887-8>
- Liu, B., Jiang, J. W., Wilson, B. C., Du, L., Yang, S. N., Wang, J. Y., Wu, G. C., Cao, X. D., & Hong, J. S. (2000). Systemic infusion of naloxone reduces degeneration of rat substantia nigral dopaminergic neurons induced by intranigral injection of lipopolysaccharide. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 295 (1), 125–132.
- Liu, F., & Wang, X. (2017). Diagnosis and treatment of epilepsy and sleep apnea comorbidity. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 17 (5), 475–485. <https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1262259>
- Liu, F., Liu, T. W., & Kang, J. (2018). The role of NF- $\kappa$ B-mediated JNK pathway in cognitive impairment in a rat model of sleep apnea. *Journal of thoracic disease*, 10 (12), 6921–6931. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.12.05>
- Liu, L., Yang T.M., Liedtke, W. & Simon, S.A. (2006). Chronic IL-1 $\beta$  signaling potentiates voltage-dependent sodium currents in trigeminal nociceptive neurons. *Journal of Neurophysiology*, 95 (3), 1478:1490. <https://doi.org/10.1152/jn.00509.2005>
- Liu, N., Zhang, D., Zhu, M., Luo, S., & Liu, T. (2015). Minocycline inhibits hyperpolarization-activated currents in rat substantia gelatinosa neurons. *Neuropharmacology*, 95, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.001>
- Liu, T., Jiang, C., Fujita, T., Luo, S. & Kumamoto, E. (2013). Enhancement by interleukin-1 $\beta$  of AMPA and NMDA receptor-mediated currents in adult rat spinal superficial dorsal horn neurons. *Molecular Pain*, 28,9:16. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-9-16>
- Liu, X. & Quan, N. (2018). Microglia and CNS interleukin-1: Beyond immunological concepts. *Frontiers in Neurology*, 9 (8), 1:11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00008>
- Liu, X., Ma, Y., Ouyang, R., Zeng, Z., Zhan, Z., Lu, H., Cui, Y., Dai, Z., Luo, L., He, C., Li, H., Zong, D., & Chen, Y. (2020). The relationship between inflammation and neurocognitive dysfunction in obstructive sleep apnea syndrome. *Journal of Neuroinflammation*, 17 (1), 229. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01905-2>
- Liu, Y., Zhou, L. J., Wang, J., Li, D., Ren, W. J., Peng, J., Wei, X., Xu, T., Xin, W. J., Pang, R. P., Li, Y. Y., Qin, Z. H., Murugan, M., Mattson, M. P., Wu, L. J., & Liu, X. G. (2017). TNF- $\alpha$  Differentially Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spinal Cord by Microglia-Dependent Mechanisms after Peripheral Nerve Injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 37 (4), 871–881. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2235-16.2016>
- Liu, Y.U., Ying, Y, Li, Y., Eyo, U.B., Chen, T., Zheng, J., Umpierre, A.D., Zhu, J., Bosco, D.B., Dong, H. & Wu, L. (2019). Neuronal network activity controls microglial process



- surveillance in awake mice via norepinephrine signaling. *Nature Neuroscience*, 22, 1771:1781. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0511-3>
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & growth factor reviews*, 22 (4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Lorea-Hernández, J.J., Morales, T., Rivera-Angulo, A.J., Alcatara-González, D. & Peña-Ortega, F. (2016). Microglia modulate respiratory rhythm generation and autoresuscitation. *Glia*, 64, 603:619. <https://doi.org/10.1002/glia.22951>
- Lorea-Hernández, J.J.I. (2020). Mecanismos celulares que subyacen la modulación de los ritmos respiratorios por actividad microglial [Tesis de doctorado, UNAM]. TESIUNAM.
- Löscher W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20 (5), 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.003>
- Löscher W. (2016). Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. *Epilepsy research*, 126, 157–184. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.05.016>
- Love, S., Kock, P., Urbach, H. & Dawson, T.P. (2004). Chronic granulomatous herpes simplex encephalitis in children. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63 (11), 1173:1181. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.11.1173>
- Lund, S., Christensen, K. V., Hedtjärn, M., Mortensen, A. L., Hagberg, H., Falsig, J., Hasseldam, H., Schratzenholz, A., Pörzgen, P., & Leist, M. (2006). The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *Journal of neuroimmunology*, 180 (1-2), 71–87. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.07.007>
- Luo, C., Koyama, R. & Ikegaya, Y. (2016). Microglia engulf viable newborn cells in the epileptic dentate gyrus. *Glia*, 64 (9), 1508:1517. <https://doi.org/10.1002/glia.23018>
- Luo, L., Ambrozkiwicz, M. C., Benseler, F., Chen, C., Dumontier, E., Falkner, S., Furlanis, E., Gomez, A. M., Hoshina, N., Huang, W. H., Hutchison, M. A., Itoh-Maruoka, Y., Lavery, L. A., Li, W., Maruo, T., Motohashi, J., Pai, E. L., Pelkey, K. A., Pereira, A., Philips, T., ... Craig, A. M. (2020). Optimizing Nervous System-Specific Gene Targeting with Cre Driver Lines: Prevalence of Germline Recombination and Influencing Factors. *Neuron*, 106 (1), 37–65.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.008>
- Lüttjohann, A., Fabene, P. F., & van Luijckelaar, G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & behavior*, 98 (5), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>
- Ma, L., Jia, J., Liu, X., Bai, F., Wang, Q., & Xiong, L. (2015). Activation of murine microglial N9 cells is attenuated through cannabinoid receptor CB2 signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, 458 (1), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.073>
- Macey P. M. (2012). Is brain injury in obstructive sleep apnea reversible?. *Sleep*, 35 (1), 9–10. <https://doi.org/10.5665/sleep.1572>
- Maganti, R., Gerber, P., Drees, C. & Chung, S. (2008). Nonconvulsive status epilepticus. *Epilepsy & Behavior*, 12, 572:586. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2007.12.002>
- Magliulo, G., De Vincentiis, M., Iannella, G., Ciofalo, A., Pasquariello, B., Manno, A., Angeletti, D., & Polimeni, A. (2018). Olfactory evaluation in obstructive sleep apnoea patients. *Acta otorinolaryngologica Italica: organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaryngologia e chirurgia cervico-facciale*, 38 (4), 338–345. <https://doi.org/10.14639/0392-100X-1981>

- Malow, B. A., Levy, K., Maturen, K., & Bowes, R. (2000). Obstructive sleep apnea is common in medically refractory epilepsy patients. *Neurology*, 55 (7), 1002–1007. <https://doi.org/10.1212/wnl.55.7.1002>
- Manna, S. S., & Umathe, S. N. (2012). Involvement of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the pro-convulsant effect of anandamide in pentylenetetrazole-induced seizures. *Epilepsy research*, 100 (1-2), 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.02.003>
- Manni, R., & Terzaghi, M. (2010). Comorbidity between epilepsy and sleep disorders. *Epilepsy research*, 90 (3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.05.006>
- Manni, R., Terzaghi, M., Arbasino, C., Sartori, I., Galimberti, C. A., & Tartara, A. (2003). Obstructive sleep apnea in a clinical series of adult epilepsy patients: frequency and features of the comorbidity. *Epilepsia*, 44 (6), 836–840. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2003.55702.x>
- Maresz, K., Carrier, E. J., Ponomarev, E. D., Hillard, C. J., & Dittel, B. N. (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *Journal of neurochemistry*, 95 (2), 437–445. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03380.x>
- Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Liu, J., Aronica, E., Iyer, A. M., Rossetti, C., Molteni, M., Casalgrandi, M., Manfredi, A. A., Bianchi, M. E., & Vezzani, A. (2010). Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nature medicine*, 16 (4), 413–419. <https://doi.org/10.1038/nm.2127>
- Martínez-Aguirre, C., Cinar, R., & Rocha, L. (2022). Targeting Endocannabinoid System in Epilepsy: For Good or for Bad. *Neuroscience*, 482, 172–185. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.12.013>
- Martínez-García, I., Hernández-Soto, R., Villasana-Salazar, B., Ordaz, B., & Peña-Ortega, F. (2021). Alterations in Piriform and Bulbar Activity/Excitability/Coupling Upon Amyloid- $\beta$  Administration in vivo Related to Olfactory Dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 82 (s1), S19–S35. <https://doi.org/10.3233/JAD-201392>
- März, P., Cheng, J. G., Gadiant, R. A., Patterson, P. H., Stoyan, T., Otten, U., & Rose-John, S. (1998). Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (6), 3251–3256. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3251>
- Masuda, T., Amann, L., Sankowski, R., Staszewski, O., Lenz, M., D Errico, P., Snaidero, N., Costa Jordão, M. J., Böttcher, C., Kierdorf, K., Jung, S., Priller, J., Misgeld, T., Vlachos, A., Meyer-Luehmann, M., Knobeloch, K. P., & Prinz, M. (2020). Novel Hexb-based tools for studying microglia in the CNS. *Nature immunology*, 21 (7), 802–815. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0707-4>
- Maurousset, A., De Toffol, B., Praline, J., Biberon, J., & Limousin, N. (2017). High incidence of obstructive sleep apnea syndrome in patients with late-onset epilepsy. *Neurophysiologie clinique*, 47 (1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2016.11.002>
- McCarter, A. R., Timm, P. C., Shepard, P. W., Sandness, D. J., Luu, T., McCarter, S. J., Dueffert, L., Dresow, M., Feemster, J. C., Cascino, G. D., So, E. L., Worrell, G. A., Britton, J. W., Sherif, A., Jaliparthi, K., Chahal, A. A., Somers, V. K., & St Louis, E. K. (2018). Obstructive sleep apnea in refractory epilepsy: A pilot study investigating frequency, clinical features, and association with risk of sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsia*, 59 (10), 1973–1981. <https://doi.org/10.1111/epi.14548>

- McIntyre, D. C., Poulter, M. O., & Gilby, K. (2002). Kindling: some old and some new. *Epilepsy research*, 50 (1-2), 79–92. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(02\)00071-2](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(02)00071-2)
- McKinsey, G. L., Lizama, C. O., Keown-Lang, A. E., Niu, A., Santander, N., Larphaveesarp, A., Chee, E., Gonzalez, F. F., & Arnold, T. D. (2020). A new genetic strategy for targeting microglia in development and disease. *eLife*, 9, e54590. <https://doi.org/10.7554/eLife.54590>
- Medel-Matus, J., Álvarez-Croda, D., Martínez-Quiroz, J., Beltrán-Parrazal, L., Morgado-Valle, C. & López-Meraz, L. (2014). IL-1 $\beta$  increases necrotic neuronal cell death in the developing rat hippocampus after status epilepticus by activating type I IL-1 receptor (IL-1RI). *International Journal of Developmental Neuroscience*, 38, 232:240. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.09.006>
- Mei, L., Li, X., Wang, S., Si, R., Ji, T., Xu, Z., Peng, Y., Liu, Y., Li, H., Zhang, J., Guo, Y., Tian, J., Zhou, G., Huang, H., Tai, J., Liu, J., & Ni, X. (2021). The Impacts of Obstructive Sleep Apnea Severity on Brain White Matter Integrity and Cognitive Functions in Children: A Diffusion Tensor Imaging Study. *Nature and science of sleep*, 13, 2125–2135. <https://doi.org/10.2147/NSS.S329408>
- Mendoza-Fernández, V., Andrew, R. D., & Barajas-López, C. (2000). ATP inhibits glutamate synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 293 (1), 172–179.
- Meng, F., & Yao, L. (2020). The role of inflammation in epileptogenesis. *Acta Epileptologica*, 2 (1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s42494-020-00024-y>
- Mercado-Gómez, O.F., Córdoba-Dávalos, L., García-Betanzo, D., Rocha, L., Alonso-Vanegas, M.A., Cienfuegos, J., Guevara-Guzman, R. (2018). Overexpression of inflammatory-related and nitric oxide synthase genes in olfactory bulbs from frontal lobe epilepsy patients. *Epilepsy Research*, 148, 37:43. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.09.012>
- Merchant, H., de Lafuente, V., Peña-Ortega, F., & Larriva-Sahd, J. (2012). Functional impact of interneuronal inhibition in the cerebral cortex of behaving animals. *Progress in neurobiology*, 99 (2), 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.08.005>
- Merlini, M., Rafalski, V. A., Ma, K., Kim, K. Y., Bushong, E. A., Rios Coronado, P. E., Yan, Z., Mendiola, A. S., Sozmen, E. G., Ryu, J. K., Haberl, M. G., Madany, M., Sampson, D. N., Petersen, M. A., Bardehle, S., Tognatta, R., Dean, T., Jr, Acevedo, R. M., Cabriga, B., Thomas, R., ... Akassoglou, K. (2021). Microglial Gi-dependent dynamics regulate brain network hyperexcitability. *Nature neuroscience*, 24 (1), 19–23. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00756-7>
- Mihály, A., Bencsik, K., & Solymosi, T. (1990). Naltrexone potentiates 4-aminopyridine seizures in the rat. *Journal of neural transmission. General section*, 79 (1-2), 59–67. <https://doi.org/10.1007/BF01251001>
- Milano, S., Paolino, M. C., Peraita-Adrados, R., Montesano, M., Barberi, S., & Villa, M. P. (2009). Prevalence of EEG paroxysmal activity in a population of children with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep*, 32 (4), 522–529. <https://doi.org/10.1093/sleep/32.4.522>
- Mirabella, F., Desiato, G., Mancinelli, S., Fossati, G., Rasile, M., Morini, R., Markicevic, M., Grimm, C., Amegandjin, C., Termanini, A., Peano, C., Kunderfranco, P., di Cristo, G., Zerbi, V., Menna, E., Lodato, S., Matteoli, M., & Pozzi, D. (2021). Prenatal interleukin 6 elevation increases glutamatergic synapse density and disrupts hippocampal connectivity in offspring. *Immunity*, 54 (11), 2611–2631.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.10.006>

- Mirrione, M. M., Konomos, D. K., Gravanis, I., Dewey, S. L., Aguzzi, A., Heppner, F. L., & Tsirka, S. E. (2010). Microglial ablation and lipopolysaccharide preconditioning affects pilocarpine-induced seizures in mice. *Neurobiology of disease*, 39 (1), 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.04.001>
- Mitchell, M. R., & Plant, S. (1988). Effect of lidocaine on action potentials, currents and contractions in the absence and presence of ouabain in guinea-pig ventricular cells. *Quarterly journal of experimental physiology*, 73 (3), 379–390. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1988.sp003154>
- Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H.J. & Meyermann, R. (2000). Local distribution of microglia in the normal adult central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathologica*, 101, 249:255. <https://doi.org/10.1007/s004010000284>
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A. W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A. J., Yoshimura, Y., & Nabekura, J. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature communications*, 7, 12540. <https://doi.org/10.1038/ncomms12540>
- Mo, M., Eyo, U. B., Xie, M., Peng, J., Bosco, D. B., Umpierre, A. D., Zhu, X., Tian, D. S., Xu, P., & Wu, L. J. (2019). Microglial P2Y12 Receptor Regulates Seizure-Induced Neurogenesis and Immature Neuronal Projections. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 39 (47), 9453–9464. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0487-19.2019>
- Möller, T. (2012). Calcium signaling in microglial cells. *Glia*, 40 (2), 184:194. <https://doi.org/10.1002/glia.10152>
- Möller, T., Bard, F., Bhattacharya, A., Biber, K., Campbell, B., Dale, E., Eder, C., Gan, L., Garden, G., Hughes, Z., Pearse, D., Staal, R., Sayed, F., Wes, P. & Boddeke, H. (2016). Critical data-based re-evaluation of minocycline as a putative specific microglia inhibitor. *Glia*, 64, 1788:1794. <https://doi.org/10.1002/glia.23007>
- Mondragón-Rodríguez, S., Gu, N., Manseau, F., & Williams, S. (2018). Alzheimer's Transgenic Model Is Characterized by Very Early Brain Network Alterations and  $\beta$ -CTF Fragment Accumulation: Reversal by  $\beta$ -Secretase Inhibition. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 121. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00121>
- Montgomery, S. M., & Buzsáki, G. (2007). Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (36), 14495–14500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701826104>
- Moraes, D.J. & Machado, B.H., 2015. Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Journal of Physiology*. 593 (3), 619–634. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283085>.
- Morgan, B. J., Bates, M. L., Rio, R. D., Wang, Z., & Dopp, J. M. (2016). Oxidative stress augments chemoreflex sensitivity in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Respiratory physiology & neurobiology*, 234, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.09.001>
- Morgan, N. H., Stanford, I. M., & Woodhall, G. L. (2009). Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. *Neuropharmacology*, 57 (4), 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.07.017>
- Morimoto, K., Fahnestock, M., & Racine, R. J. (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in neurobiology*, 73 (1), 1–60. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.03.009>
- Morini, R., Ghirardini, E., Butti, E., Verderio, C., Martino, G. & Matteoli, M. (2015). Subventricular zone neural progenitors reverse TNF-alpha effects in cortical neurons.

- Stem Cell Research & Therapy, 6 (166), 1:8. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0158-2>
- Morita-Takemura, S., Nakahara, K., Hasegawa-Ishii, S., Isonishi, A., Tatsumi, K., Okuda, H., Tanaka, T., Kitabatake, M., Ito, T., & Wanaka, A. (2019). Responses of perivascular macrophages to circulating lipopolysaccharides in the subfornical organ with special reference to endotoxin tolerance. *Journal of neuroinflammation*, 16 (1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1431-6>
- Motamedi, V., Kanefsky, R., Matsangas, P., Mithani, S., Jeromin, A., Brock, M. S., Mysliwiec, V., & Gill, J. (2018). Elevated tau and interleukin-6 concentrations in adults with obstructive sleep apnea. *Sleep medicine*, 43, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.11.1121>
- Motoki, K., Kishi, H., Hori, E., Tajiri, K., Nishijo, H. & Muraguchi, A. (2009). The direct excitatory effect of IL-1 $\beta$  on cerebellar Purkinje cell. *Biophysical Research Communications*, 379 (3), 665:668. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.023>
- Müller, C. J., Bankstahl, M., Gröticke, I., & Löscher, W. (2009). Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. *European journal of pharmacology*, 619 (1-3), 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.07.020>
- Murugan, M., Sivakumar, V., Lu, J., Ling, E. A., & Kaur, C. (2011). Expression of N-methyl D-aspartate receptor subunits in amoeboid microglia mediates production of nitric oxide via NF- $\kappa$ B signaling pathway and oligodendrocyte cell death in hypoxic postnatal rats. *Glia*, 59 (4), 521–539. <https://doi.org/10.1002/glia.21121>
- Mutlu, M., Vuralkan, E., Akin, I., Firat, H., Ardic, S., Akaydin, S., & Miser, E. (2017). Alteration of serum levels of inflammatory cytokines and polysomnographic indices after uvulopalatal flap surgery in obstructive sleep apnea. *Ear, nose, & throat journal*, 96 (2), 65–68. <https://doi.org/10.1177/014556131709600208>
- Nadeem, R., Molnar, J., Madbouly, E. M., Nida, M., Aggarwal, S., Sajid, H., Naseem, J., & Loomba, R. (2013). Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Journal of clinical sleep medicine JCSM: official publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 9 (10), 1003–1012. <https://doi.org/10.5664/jcsm.3070>
- Nagamoto-Combs, K. & Combs, C.K. (2010). Microglial phenotype is regulated by activity of the transcription factor, NFAT (nuclear factor of activated T cells). *The Journal of Neuroscience*, 30 (28), 9641:9646. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0828-10.2010>
- Nakai, Y., Sugiura, A., Brown, E.C., Sonoda, M., Jeong, J.W., Rothermel, R., Luat, A.F., Sood, S. & Asano, E. (2018). Four-dimensional functional cortical maps of visual and auditory language: Intracranial recording. *Epilepsia*, 60 (1), 255:267. <https://doi.org/10.1111/epi.14648>
- Nardou, R., Yamamoto, S., Bhar, A., Burnashev, N., Ben-Ari, Y., & Khalilov, I. (2011). Phenobarbital but Not Diazepam Reduces AMPA/kainate Receptor Mediated Currents and Exerts Opposite Actions on Initial Seizures in the Neonatal Rat Hippocampus. *Frontiers in cellular neuroscience*, 5, 16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2011.00016>
- Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420 (6917), 846–852. <https://doi.org/10.1038/nature01320>
- Nebeling, F.C., Poll, S., Schmid, L.C., Mittag, M., Steffen, J., Keppler, K. & Fuhrmann, M. (2019). Microglia motility depends on neuronal activity and promotes structural plasticity in the hippocampus. *bioRxiv*, Enero, 2019, 1:28. <https://doi.org/10.1101/515759>
- Nie, Y., Wang, Z., Chai, G., Xiong, Y., Li, B., Zhang, H., Xin, R., Qian, X., Tang, Z., Wu, J., & Zhao, P. (2019). Dehydrocostus Lactone Suppresses LPS-induced Acute Lung Injury and Macrophage Activation through NF- $\kappa$ B Signaling Pathway Mediated by p38 MAPK and Akt. *Molecules*, 24 (8), 1510. <https://doi.org/10.3390/molecules24081510>

- Nieto-Posadas, A., Flores-Martínez, E., Lorea-Hernández, J. J., Rivera-Angulo, A. J., Pérez-Ortega, J. E., Bargas, J., & Peña-Ortega, F. (2014). Change in network connectivity during fictive-gasping generation in hypoxia: prevention by a metabolic intermediate. *Frontiers in Physiology*, 5, 265. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00265>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308 (5726), 1314:1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- Nishiyori, A., Minami, M., Ohtani, Y., Takami, S., Yamamoto, J., Kawaguchi, N., Kume, T., Akaike, A. & Satoh, M. (1998). Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Letters*; 429 (2): 167:172. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00583-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00583-3)
- Nissinen, J., Halonen, T., Koivisto, E., & Pitkänen, A. (2000). A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy research*, 38 (2-3), 177–205. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(99\)00088-1](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(99)00088-1)
- Noguchi, Y., Shinozaki, Y., Fujishita, K., Shibata, K., Imura, Y., Morizawa, Y., Gachet, C., & Koizumi, S. (2013). Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y(1) receptor-mediated pathways in astrocytes. *PloS one*, 8 (2), e57898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057898>
- Nutile-McMenemy, N., Effenbein, A. & DeLedo, J.A. (2007). Minocycline decreases in vitro microglial motility, b1-integrin, and Kv1.3 channel expression. *Journal of Neurochemistry*, 103, 2035:2046. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04889.x>
- Oertner, T. & Matus, A. (2005). Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium*, 37, 477:482. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.01.016>
- Oliver, K. M., Garvey, J. F., Ng, C. T., Veale, D. J., Fearon, U., Cummins, E. P., & Taylor, C. T. (2009). Hypoxia activates NF-kappaB-dependent gene expression through the canonical signaling pathway. *Antioxidants & redox signaling*, 11 (9), 2057–2064. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2400>
- Organización Mundial de la Salud (2019). Epilepsia. Fecha de recuperación: 1 de enero del 2022, de la URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy#:~:text=Rates%20of%20disease&text=Globally%2C%20an%20estimated%20five%20million,as%20139%20per%20100%20000>.
- Organización Panamericana de la Salud (2011). Estrategia y plan de acción sobre la epilepsia. Estados Unidos: Organización Panamericana de la Salud.
- Orr, A. G., Orr, A. L., Li, X. J., Gross, R. E., & Traynelis, S. F. (2009). Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. *Nature neuroscience*, 12 (7), 872–878. <https://doi.org/10.1038/nn.2341>
- Osawa, S., Iwasaki, M., Hosaka, R., Matsuzaka, Y., Tomita, H., Ishizuka, T., Sugano, E., Okumura, E., Yawo, H., Nakasato, N., Tominaga, T., & Mushiake, H. (2013). Optogenetically induced seizure and the longitudinal hippocampal network dynamics. *PloS one*, 8(4), e60928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060928>
- Osorio, I., Shnyra, A., Santacruz, K., Brewington, R., & Morrison, D. (2007). Rasmussen's encephalitis: interleukin-10-dependent Tc2 cell polarization may explain its pathophysiology and clinical course. *Epilepsy & behavior*, 10 (1), 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2006.09.006>
- Owens, J., Jr, Robbins, C. A., Wenzel, H. J., & Schwartzkroin, P. A. (1997). Acute and chronic effects of hypoxia on the developing hippocampus. *Annals of neurology*, 41 (2), 187–199. <https://doi.org/10.1002/ana.410410210>
- Oyarce, M. P., & Iturriaga, R. (2018). Proinflammatory Cytokines in the Nucleus of the Solitary Tract of Hypertensive Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. *Advances*

- in *Experimental Medicine and Biology*, 1071, 69–74. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91137-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91137-3_8)
- Palop, J. J., & Mucke, L. (2016). Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 17 (12), 777–792. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.141>
- Palsson-McDermott, E.M. & O'Neill, L.A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113 (2), 153:62.
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333 (6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Papageorgiou, I. E., Lewen, A., Galow, L. V., Cesetti, T., Scheffel, J., Regen, T., Hanisch, U. K., & Kann, O. (2016). TLR4-activated microglia require IFN- $\gamma$  to induce severe neuronal dysfunction and death in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (1), 212–217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513853113>
- Pappalardo, L.W., Black, J.A. & Waxman, S.G. (2016). Sodium channels in astroglia and microglia. *Glia*, 64, 1628:1645. <https://doi.org/10.1002/glia.22967>
- Pardo-Peña, K., Lorea-Hernández, J. J., Camacho-Hernández, N. P., Ordaz, B., Villasana-Salazar, B., Morales-Villagrán, A., & Peña-Ortega, F. (2018b). Hydrogen peroxide extracellular concentration in the ventrolateral medulla and its increase in response to hypoxia in vitro: Possible role of microglia. *Brain Research*, 1692, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.032>
- Pardo-Peña, K., Sánchez-Lira, A., Salazar-Sánchez, J. & Morales-Villagrán, A. (2018a). A novel online fluorescence method for in-vivo measurement of hydrogen peroxide during oxidative stress produced in a temporal lobe epilepsy model. *Neuroreport*, 29 (8), 621:630. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001007>
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., 3rd, Lafaille, J. J., Hempstead, B. L., Littman, D. R., & Gan, W. B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, 155 (7), 1596–1609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>
- Pascoal, V., Marchesini, R. B., Athié, M., Matos, A., Conte, F. F., Pereira, T. C., Secolin, R., Gilioli, R., Malheiros, J. M., Polli, R. S., Tannús, A., Covolan, L., Pascoal, L. B., Vieira, A. S., Cavalheiro, E. A., Cendes, F., & Lopes-Cendes, I. (2022). Modulating Expression of Endogenous Interleukin 1 Beta in the Acute Phase of the Pilocarpine Model of Epilepsy May Change Animal Survival. *Cellular and molecular neurobiology*, 10.1007/s10571-022-01190-y. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01190-y>
- Patankar, P.S., Joshi, S.S. & Choudhari, K.A. (2014). Air-embolism and cerebral ischaemia following epidural hydrogen peroxide irrigation in a closed lumbar cavity. *British journal of Neurosurgery*, 28 (4), 556:558. <https://doi.org/10.3109/02688697.2013.865706>
- Payne, R. J., Kost, K. M., Frenkiel, S., Zeitouni, A. G., Sejean, G., Sweet, R. C., Naor, N., Hernandez, L., & Kimoff, R. J. (2006). Laryngeal inflammation assessed using the reflux finding score in obstructive sleep apnea. *Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 134 (5), 836–842. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2006.01.012>
- Peixoto, H. M., Cruz, R., Moulin, T. C., & Leão, R. N. (2020). Modeling the Effect of Temperature on Membrane Response of Light Stimulation in Optogenetically-Targeted Neurons. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 14, 5. <https://doi.org/10.3389/fncom.2020.00005>

- Peña, F. & Tapia, R. (2000). Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: Role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience*, 101 (3), 574:561. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00400-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00400-0)
- Peña, F., & Alavez-Pérez, N. (2006). Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus in vitro. *Epilepsia*, 47 (1), 47–54. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00369.x>
- Peña, F., & Tapia, R. (1999). Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *Journal of neurochemistry*, 72 (5), 2006–2014. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0722006.x>
- Peña, F., Vargas, J. & Tapia, R. (2002). Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo. *Neuropharmacology*, 42, 807:812. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(02\)00024-2](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00024-2)
- Peña-Ortega, F. (2016). Pharmacological tools to activate microglia and their possible use to study neural network patho-physiology. *Current Neuropharmacology*, 14 (0), 1.22. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666160928151546>
- Peng, J., Liu, Y., Umpierre, A.D., Xie, M., Tian, D., Richardson, J.R. & Wu, L. (2019). Microglial P2Y<sub>12</sub> receptor regulates ventral hippocampal CA1 neuronal excitability and innate fear in mice. *Molecular Brain*, 12 (1), 71:83. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0492-x>
- Perea, G., Yang, A., Boyden, E. S., & Sur, M. (2014). Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nature communications*, 5, 3262. <https://doi.org/10.1038/ncomms4262>
- Pfeiffer, T., Avignone, E. & Nägerl, U.V. (2016). Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines. *Scientific Reports*, 8, 1:9. <https://doi.org/10.1038/srep32422>
- Piccirillo J. F. (2000). Outcomes research and obstructive sleep apnea. *The Laryngoscope*, 110 (3 Pt 3), 16–20. <https://doi.org/10.1097/00005537-200003002-00005>
- Piña-Crespo, J. C., & Daló, N. L. (1992). Low doses of urethane effectively inhibit spinal seizures evoked by sudden cooling of toad isolated spinal cord. *Life sciences*, 51 (7), 461–465. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90022-h](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90022-h)
- Pintado, C., Revilla, E., Vizuete, M.L., Jiménez, S., García-Cuervo, L., Vitorica, J., Ruano, D. & Castaño, A. (2011). Regional difference in inflammatory response to LPS-injection in the brain: Role of microglia cell density. *Journal of neuroimmunology*, 238, 44:51. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.06.017>
- Piperidou, C., Karlovasitou, A., Triantafyllou, N., Terzoudi, A., Constantinidis, T., Vadikolias, K., Heliopoulos, I., Vassilopoulos, D., & Balogiannis, S. (2008). Influence of sleep disturbance on quality of life of patients with epilepsy. *Seizure*, 17 (7), 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2008.02.005>
- Piskorska, B., Miziak, B., Czuczwar, S. J., & Borowicz, K. K. (2013). Safety issues around misuse of antiepileptics. *Expert opinion on drug safety*, 12 (5), 647–657. <https://doi.org/10.1517/14740338.2013.796363>
- Pitkänen, A., Kharatishvili, I., Karhunen, H., Lukasiuk, K., Immonen, R., Nairismägi, J., Gröhn, O., & Nissinen, J. (2007). Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia*, 48 (Suppl 2), 13–20. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01063.x>
- Pitkänen, A., Löscher, W., Vezzani, A., Becker, A. J., Simonato, M., Lukasiuk, K., Gröhn, O., Bankstahl, J. P., Friedman, A., Aronica, E., Gorter, J. A., Ravizza, T., Sisodiya, S.



- M., Kokaia, M., & Beck, H. (2016). Advances in the development of biomarkers for epilepsy. *The Lancet. Neurology*, 15 (8), 843–856. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00112-5)
- Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Dudek, F.E. & Staley, K.J. (2015). Epileptogenesis. *Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 18 (5), a022822. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022822>
- Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., Thompson, P., Chan, E.K.L., Ledesma, J., Roe, B. Clifron, S., Vogel, S.N. & Beutler, B. (1998). Genetic and physical mapping of the LPS locus: identification of the Toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 240 (170), 340:355.
- Pontrelli, P., Conserva, F., & Gesualdo, L. (2019). The Role of Lysine 63-Linked Ubiquitylation in Health and Ubiquitin Proteasome System: Current Insights into Mechanism Cellular Regulation and Disease, 69. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83659>
- Pourcet, B., & Duez, H. (2020). Circadian Control of Inflammasome Pathways: Implications for Circadian Medicine. *Frontiers in immunology*, 11, 1630. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01630>
- Powell, F. L., Milsom, W. K., & Mitchell, G. S. (1998). Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respiration physiology*, 112 (2), 123–134. [https://doi.org/10.1016/s0034-5687\(98\)00026-7](https://doi.org/10.1016/s0034-5687(98)00026-7)
- Pribiag, H., & Stellwagen, D. (2013). TNF- $\alpha$  downregulates inhibitory neurotransmission through protein phosphatase 1-dependent trafficking of GABA(A) receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33 (40), 15879–15893. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0530-13.2013>
- Provenzano, F., Pérez, M. J., & Deleidi, M. (2021). Redefining Microglial Identity in Health and Disease at Single-Cell Resolution. *Trends in molecular medicine*, 27 (1), 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.09.001>
- Psarropoulou, C., & Avoli, M. (1996). Developmental features of 4-aminopyridine induced epileptogenesis. *Brain research. Developmental brain research*, 94 (1), 52–59. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(96\)00040-5](https://doi.org/10.1016/0165-3806(96)00040-5)
- Punjabi N. M. (2008). The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5 (2), 136–143. <https://doi.org/10.1513/pats.200709-155MG>
- Qiang, J, Zhu, L., Li, Q., Belevych, N., Chen, Q., Zhao, F., Herness, S. & Quan, N. (2012). Interleukin-1R3 mediates interleukin-1-induced potassium current increase through fast activation of Akt kinase. *PNAS*, 109 (30), 12189:12194.
- Qin, L., Li, G., Qian, X., Liu, Y., Wu, X., Liu, B., Hong, J. S., & Block, M. L. (2005). Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia*, 52 (1), 78–84. <https://doi.org/10.1002/glia.20225>
- Quan, N., Sundar, S. K., & Weiss, J. M. (1994). Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. *Journal of neuroimmunology*, 49 (1-2), 125–134. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(94\)90188-0](https://doi.org/10.1016/0165-5728(94)90188-0)
- Rakhade, S. N., Fitzgerald, E. F., Klein, P. M., Zhou, C., Sun, H., Haganir, R. L., & Jensen, F. E. (2012). Glutamate receptor 1 phosphorylation at serine 831 and 845 modulates seizure susceptibility and hippocampal hyperexcitability after early life seizures. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32 (49), 17800–17812. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6121-11.2012>
- Rakhade, S. N., Klein, P. M., Huynh, T., Hilario-Gomez, C., Kosaras, B., Rotenberg, A., & Jensen, F. E. (2011). Development of later life spontaneous seizures in a rodent model

- of hypoxia-induced neonatal seizures. *Epilepsia*, 52 (4), 753–765. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.02992.x>
- Rakitin, A., Vbo, R., Veikat, V., Ounapuu A., Liigant, A. & Haldre, S. (2018). Creutzfeldt-Jakob disease presenting as nonconvulsive status epilepticus. *Case Reports in Neurological Medicine*, 3092018. <https://doi.org/10.1155/2018/3092018>
- Raley-Susman, K. M., Kass, I. S., Cottrell, J. E., Newman, R. B., Chambers, G., & Wang, J. (2001). Sodium influx blockade and hypoxic damage to CA1 pyramidal neurons in rat hippocampal slices. *Journal of neurophysiology*, 86 (6), 2715–2726. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.6.2715>
- Ramón y Cajal, S. (1913). Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trabajos del laboratorio de investigaciones biológicas*, 11: 255-315.
- Rana, A., & Musto, A. E. (2018). The role of inflammation in the development of epilepsy. *Journal of neuroinflammation*, 15 (1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1192-7>
- Rannikko, E. H., Weber, S. S., & Kahle, P. J. (2015). Exogenous  $\alpha$ -synuclein induces toll-like receptor 4 dependent inflammatory responses in astrocytes. *BMC neuroscience*, 16, 57. <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0192-0>
- Ransohoff, R.M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19 (8), 978:991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>
- Ravizza, T., Gagliardi, B., Noé, F., Boer, K., Aronica, E., & Vezzani, A. (2008). Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease*, 29 (1), 142–160. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.08.012>
- Raza, M., Shaheen, F., Choudhary, M. I., Rahman, A. U., Sombati, S., & DeLorenzo, R. J. (2002). In vitro inhibition of pentylenetetrazole and bicuculline-induced epileptiform activity in rat hippocampal pyramidal neurons by aqueous fraction isolated from *Delphinium denudatum*. *Neuroscience letters*, 333 (2), 103–106. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01027-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01027-3)
- Reale, M., Velluto, L., Di Nicola, M., D'Angelo, C., Costantini, E., Marchioni, M., Cerroni, G., & Guarnieri, B. (2020). Cholinergic Markers and Cytokines in OSA Patients. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3264. <https://doi.org/10.3390/ijms21093264>
- Rektor, I., Kuba, R., & Brázdil, M. (2002). Interictal and ictal EEG activity in the basal ganglia: an SEEG study in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 43 (3), 253:262. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.28001.x>
- Reyes-Garcia, S. Z., Scorza, C. A., Araújo, N. S., Ortiz-Villatoro, N. N., Jardim, A. P., Centeno, R., Yacubian, E., Faber, J., & Cavalheiro, E. A. (2018). Different patterns of epileptiform-like activity are generated in the sclerotic hippocampus from patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy. *Scientific reports*, 8 (1), 7116. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25378-9>
- Riazi, K., Galic, M.A. & Pittman, Q.J. (2010). Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: Cytokines and brain excitability. *Epilepsy Research*, 89, 34:42. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.09.004>
- Ribeiro-Xavier, A.L., Kress, B.T., Goldman, S.A., Lacerda de Menezes, JR. & Nedergaard, M. (2015). A distinct population of microglia supports adult neurogenesis in the subventricular zone. *The Journal of Neuroscience*, 35 (34), 11848:11861. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1217-15.2015>
- Riha R. L. (2021). Defining obstructive sleep apnoea syndrome: a failure of semantic rules. *Breathe*, 17 (3), 210082. <https://doi.org/10.1183/20734735.0082-2021>

- Rocha, L., Cinar, R., Guevara-Guzmán, R., Alonso-Vanegas, M., San-Juan, D., Martínez-Juárez, I., Castañeda-Cabral, J. L., & Carmona-Cruz, F. (2020). Endocannabinoid System and Cannabinoid 1 Receptors in Patients With Pharmacoresistant Temporal Lobe Epilepsy and Comorbid Mood Disorders. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 14, 52. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00052>
- Rocha, L., Cuellar-Herrera, M., Velasco, M., Velasco, F., Velasco, A. L., Jiménez, F., Orozco-Suarez, S., & Borsodi, A. (2007). Opioid receptor binding in parahippocampus of patients with temporal lobe epilepsy: its association with the antiepileptic effects of subacute electrical stimulation. *Seizure*, 16 (7), 645–652. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2007.05.007>
- Rodgers, K.M., Hutchinson, M.R., Maier, S.F., Watkins, L.R. & Barth, D.S. (2009). The cortical innate immune response increases local neuronal excitability leading to seizures. *Brain*, 132 (9), 2478:2486. <https://doi.org/10.1093/brain/awp177>
- Rodriguez-Alvarez, N., Jimenez-Mateos, E. M., Dunleavy, M., Waddington, J. L., Boylan, G. B., & Henshall, D. C. (2015). Effects of hypoxia-induced neonatal seizures on acute hippocampal injury and later-life seizure susceptibility and anxiety-related behavior in mice. *Neurobiology of disease*, 83, 100–114. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.023>
- Rojas-García, K, D. (2018). Modulación de la actividad del bulbo olfatorio mediada por la microglía [Tesis de maestría, UNAM]. TESIUNAM.
- Rose-John S. (2018). Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10 (2), a028415. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415>
- Rosenberg, E. C., Tsien, R. W., Whalley, B. J., & Devinsky, O. (2015). Cannabinoids and Epilepsy. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 12 (4), 747–768. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0375-5>
- Rosenzweig, I., Williams, S. C., & Morrell, M. J. (2014a). The impact of sleep and hypoxia on the brain: potential mechanisms for the effects of obstructive sleep apnea. *Current opinion in pulmonary medicine*, 20 (6), 565–571. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000099>
- Rosenzweig, J. M., Lei, J., & Burd, I. (2014b). Interleukin-1 receptor blockade in perinatal brain injury. *Frontiers in pediatrics*, 2, 108. <https://doi.org/10.3389/fped.2014.00108>
- Rossi, J., Balthasar, N., Olson, D., Scott, M., Berglund, E., Lee, C. E., Choi, M. J., Lauzon, D., Lowell, B. B., & Elmquist, J. K. (2011). Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell metabolism*, 13 (2), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.010>
- Roth, T. L., Nayak, D., Atanasijevic, T., Koretsky, A. P., Latour, L. L., & McGavern, D. B. (2014). Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. *Nature*, 505 (7482), 223–228. <https://doi.org/10.1038/nature12808>
- Rothwell, N. J., & Luheshi, G. N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends in neurosciences*, 23 (12), 618–625. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01661-1](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01661-1)
- Rothwell, N. J., & Luheshi, G. N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends in neurosciences*, 23 (12), 618–625. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01661-1](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01661-1)
- Row, B. W., Liu, R., Xu, W., Kheirandish, L., & Gozal, D. (2003). Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 167 (11), 1548–1553. <https://doi.org/10.1164/rccm.200209-1050OC>
- Rubinstein I. (1995). Nasal inflammation in patients with obstructive sleep apnea. *The Laryngoscope*, 105 (2), 175–177. <https://doi.org/10.1288/00005537-199502000-00012>

- Sabilallah, M., Fontanaud, P., Linck, N., Boussadia, B., Peyroutou, R., Lasgouzes, T., Rassendren F., Marchi, N. & Hirbec, H. E. (2016). Evidence for status epilepticus and pro-inflammatory changes after intranasal kainic acid administration in mice. *PloS One*, 11 (3), e0150793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150793>
- Saika, F., Matsuzaki, S., Kishioka, S., & Kiguchi, N. (2021). Chemogenetic Activation of CX3CR1-Expressing Spinal Microglia Using Gq-DREADD Elicits Mechanical Allodynia in Male Mice. *Cells*, 10 (4), 874. <https://doi.org/10.3390/cells10040874>
- Saika, F., Matsuzaki, S., Kobayashi, D., Ideguchi, Y., Nakamura, T. Y., Kishioka, S., & Kiguchi, N. (2020). Chemogenetic Regulation of CX3CR1-Expressing Microglia Using Gi-DREADD Exerts Sex-Dependent Anti-Allodynic Effects in Mouse Models of Neuropathic Pain. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 925. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00925>
- Santa-Cecília, F. V., Socias, B., Ouidja, M. O., Sepulveda-Diaz, J. E., Acuña, L., Silva, R. L., Michel, P. P., Del-Bel, E., Cunha, T. M., & Raisman-Vozari, R. (2016). Doxycycline Suppresses Microglial Activation by Inhibiting the p38 MAPK and NF-κB Signaling Pathways. *Neurotoxicity research*, 29 (4), 447–459. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9592-2>
- Santiago, A.R., Baptista, F.I., Santos, P.F., Cristóvão, G., Ambrósio, A.F., Cunha, R.A. & Gomes, C.A. (2014). Role of microglía adenosine A2A receptors in retinal and brain neurodegenerative diseases. *Mediators of Inflammation*, 2014, 465694. <https://doi.org/10.1155/2014/465694>
- Sapin, E., Peyron, C., Roche, F., Gay, N., Carcenac, C., Savasta, M., Levy, P., & Dematteis, M. (2015). Chronic Intermittent Hypoxia Induces Chronic Low-Grade Neuroinflammation in the Dorsal Hippocampus of Mice. *Sleep*, 38 (10), 1537–1546. <https://doi.org/10.5665/sleep.5042>
- Sasaki, T., Beppu, K., Tanaka, K., Fukasawa, Y., Shigemoto, R. & Matsui, K. (2012). Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *PNAS*, 109 (50), 20720:20725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213458109>
- Sateia M. J. (2014). International classification of sleep disorders-third edition: highlights and modifications. *Chest*, 146 (5), 1387–1394. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0970>
- Satoh, J., Kino, Y., Asahina, N., Takitani, M., Miyoshi, J., Ishida, T., & Saito, Y. (2016). TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 36 (1), 39–49. <https://doi.org/10.1111/neup.12235>
- Sawada M. (2012). Estrategia de reparación nerviosa/regeneración de la vaina de mielina utilizando células gliales de control de la función óptica [Artículo en japonés]. *Rinsho Shinkeigaku*, 52 (11), 1357–1359. <https://doi.org/10.5692/clinicalneuro.52.1357>
- Sayed, B. A., Christy, A. L., Walker, M. E., & Brown, M. A. (2010). Meningeal mast cells affect early T cell central nervous system infiltration and blood-brain barrier integrity through TNF: a role for neutrophil recruitment? *Journal of immunology*, 184 (12), 6891–6900. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000126>
- Sayyah, M., Javad-Pour, M. & Ghazi-Hansari, M. (2003a). The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide and prostaglandins. *Neuroscience*, 122, 1073:1080. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.043>
- Sayyah, M., Najafabadi, IT., Beheshti, S. & Majzoob, S. (2003b). Lipopolysaccharide retard development of amygdala kindling but not affect fully-kindled seizures in rats. *Epilepsy Research*, 57, 175:180. <https://doi.org/10.1007/s00221-013-3415-6>

- Scharf, M. T., Greenberg, P., Wong, S., & Mani, R. (2020). Obstructive sleep apnea risk in patients with focal versus generalized epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 111, 107190. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107190>
- Scheraga, R. G., Abraham, S., Niese, K. A., Southern, B. D., Grove, L. M., Hite, R. D., McDonald, C., Hamilton, T. A., & Olman, M. A. (2016). TRPV4 Mechanosensitive Ion Channel Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Phagocytosis. *Journal of immunology*, 196 (1), 428–436. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501688>
- Schmidt-Pogoda, A., Strecker, J. K., Liebmann, M., Massoth, C., Beuker, C., Hansen, U., König, S., Albrecht, S., Bock, S., Breuer, J., Sommer, C., Schwab, N., Wiendl, H., Klotz, L., & Minnerup, J. (2018). Dietary salt promotes ischemic brain injury and is associated with parenchymal migrasome formation. *PloS one*, 13 (12), e0209871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209871>
- Schöbitz, B., de Kloet, E. R., Sutanto, W., & Holsboer, F. (1993). Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *The European journal of neuroscience*, 5 (11), 1426–1435. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00210.x>
- Schöbitz, B., Voorhuis, D. A., & De Kloet, E. R. (1992). Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Neuroscience letters*, 136 (2), 189–192. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90046-a](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90046-a)
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, 182 (3), 311–322. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9)
- Schurr, A., Spears, B., Reid, K. H., West, C. A., Edmonds, H. L., Jr, & Rigor, B. M. (1986). Lidocaine depresses synaptic activity in the rat hippocampal slice. *Anesthesiology*, 64 (4), 501–503. <https://doi.org/10.1097/0000542-198604000-00015>
- Scott, G., Mahmud, M., Owen, D. R., & Johnson, M. R. (2017). Microglial positron emission tomography (PET) imaging in epilepsy: Applications, opportunities and pitfalls. *Seizure*, 44, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.10.023>
- Segal, E., Vendrame, M., Gregas, M., Loddenkemper, T., & Kothare, S. V. (2012). Effect of treatment of obstructive sleep apnea on seizure outcomes in children with epilepsy. *Pediatric neurology*, 46 (6), 359–362. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2012.03.005>
- Sekosan, M., Zakkar, M., Wenig, B. L., Olopade, C. O., & Rubinstein, I. (1996). Inflammation in the uvula mucosa of patients with obstructive sleep apnea. *The Laryngoscope*, 106 (8), 1018–1020. <https://doi.org/10.1097/00005537-199608000-00021>
- Selvaraj, S., Bloomfield, P.S., Cao, B., Varonese, M., Turkheimer, F. & Howes, O.D. (2017). Brain TSPO imaging and gray matter volume in schizophrenia patients and in people at ultra high risk of psychosis: An [11C]PBR28 study. *Schizophrenia Research*, 195, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.08.063>
- Sessolo, M., Marcon, I., Bovetti, S., Losi, G., Cammarota, M., Ratto, G. M., Fellin, T., & Carmignoto, G. (2015). Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons Oppose Propagation But Favor Generation of Focal Epileptiform Activity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 35 (26), 9544–9557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5117-14.2015>
- Sforza, E., & Roche, F. (2016). Chronic intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: an experimental and clinical approach. *Hypoxia*, 4, 99–108. <https://doi.org/10.2147/HP.S103091>
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *The International journal of neuroscience*, 127 (7), 624–633. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>

- Shaheen, H. A., Abd El-Kader, A. A., El Gohary, A. M., El-Fayoumy, N. M., & Afifi, L. M. (2012). Obstructive sleep apnea in epilepsy: a preliminary Egyptian study. *Sleep & breathing*, 16 (3), 765–771. <https://doi.org/10.1007/s11325-011-0573-2>
- Shapiro, L., Wong, J. C., & Escayg, A. (2019). Reduced cannabinoid 2 receptor activity increases susceptibility to induced seizures in mice. *Epilepsia*, 60 (12), 2359–2369. <https://doi.org/10.1111/epi.16388>
- Shapiro, L.A., Wang, L. & Ribak, C.E. (2008). Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia*, 49 (Suppl. 2), 33:41. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01491.x>
- Sharif, O., Bolshakov, V. N., Raines, S., Newham, P., & Perkins, N. D. (2007). Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC immunology*, 8, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-1>
- Sharpe, A. L., Calderon, A. S., Andrade, M. A., Cunningham, J. T., Mifflin, S. W., & Toney, G. M. (2013). Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic control of blood pressure: role of neuronal activity in the hypothalamic paraventricular nucleus. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 305 (12), H1772–H1780. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00592.2013>
- Shemer, A., Grozovski, J., Tay, T. L., Tao, J., Volaski, A., Süß, P., Ardura-Fabregat, A., Gross-Vered, M., Kim, J. S., David, E., Chappell-Maor, L., Thielecke, L., Glass, C. K., Cornils, K., Prinz, M., & Jung, S. (2018). Engrafted parenchymal brain macrophages differ from microglia in transcriptome, chromatin landscape and response to challenge. *Nature communications*, 9 (1), 5206. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07548-5>
- Shen, Y., Qin, H., Chen, J., Mou, L., He, Y., Yan, Y., Zhou, H., Lv, Y., Chen, Z., Wang, J., & Zhou, Y. D. (2016). Postnatal activation of TLR4 in astrocytes promotes excitatory synaptogenesis in hippocampal neurons. *The Journal of cell biology*, 215 (5), 719–734. <https://doi.org/10.1083/jcb.201605046>
- Sheng, J. G., Boop, F. A., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (1994). Increased neuronal beta-amyloid precursor protein expression in human temporal lobe epilepsy: association with interleukin-1 alpha immunoreactivity. *Journal of neurochemistry*, 63 (5), 1872–1879. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63051872.x>
- Shi, Y., Guo, X., Zhang, J., Zhou, H., Sun, B., & Feng, J. (2018). DNA binding protein HMGB1 secreted by activated microglia promotes the apoptosis of hippocampal neurons in diabetes complicated with OSA. *Brain, Behavior, and Immunity*, 73, 482–492. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.06.012>
- Shim, H. G., Jang, S. S., Kim, S. H., Hwang, E. M., Min, J. O., Kim, H. Y., Kim, Y. S., Ryu, C., Chung, G., Kim, Y., Yoon, B. E., & Kim, S. J. (2018). TNF- $\alpha$  increases the intrinsic excitability of cerebellar Purkinje cells through elevating glutamate release in Bergmann Glia. *Scientific reports*, 8 (1), 11589. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29786-9>
- Shinozaki, Y., Nomura, M., Iwatsuki, K., Moriyama, Y., Gachet, C. & Koizumi, S. (2014). Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Scientific Reports*, 10, 1:11. <https://doi.org/10.1038/srep04329>
- Shirani, G., Arshad, M., Mahmoudi, X., & Azarians, S. (2017). Effect of Treatment of Obstructive Sleep Apnea by Uvulopalatoplasty on Seizure Outcomes: A Case Report. *Journal of dentistry*, 14 (6), 361–365.
- Shorvon S. D. (2011). The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*, 52 (6), 1052–1057. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03041.x>
- Shorvon, S. & Trinkka, E. (2018). Regulatory aspects of status epilepticus. *Epilepsia*, 59 (Suppl 2), 128:134. <https://doi.org/10.1111/epi.14547>

- Siegel, G., Albers, R.W., Brady, S. & Price, D. (2005). *Basic neurochemistry*. 7a edición. Estados Unidos: Elsevier Academic Press.
- Sierra, A., de Castro, F., del Río-Hortega, J., Iglesias-Rozas, J.R., Garrosa, M. & Kettenmann, H. (2016). The “big-bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glía*, 64, 1801:1840. <https://doi.org/10.1002/glia.23046>
- Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J.P., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E. & Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 7 (4), 483:495. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014>
- Sierra, A., Paolicelli, R.C. & Kettenmann, H. (2019). Cien años de microglía: Milestones in a century of microglial research. *Trends in Neurosciences*, 42 (11), 778:792. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.09.004>
- Sierra-Torre, V., Plaza-Zabala, A., Bonifazi, P., Abiega, O., Díaz-Aparicio, I., Tegelberg, S., Lehesjoki, A. E., Valero, J., & Sierra, A. (2020). Microglial phagocytosis dysfunction in the dentate gyrus is related to local neuronal activity in a genetic model of epilepsy. *Epilepsia*, 61 (11), 2593–2608. <https://doi.org/10.1111/epi.16692>
- Sigel, E., & Ernst, M. (2018). The Benzodiazepine Binding Sites of GABAA Receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 39 (7), 659–671. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.006>
- Silva, G. D., Del Guerra, F. B., de Oliveira Lelis, M., & Pinto, L. F. (2020). Cannabidiol in the Treatment of Epilepsy: A Focused Review of Evidence and Gaps. *Frontiers in neurology*, 11, 531939. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.531939>
- Simões, A. P., Silva, C. G., Marques, J. M., Pochmann, D., Porciúncula, L. O., Ferreira, S., Oses, J. P., Beleza, R. O., Real, J. I., Köfalvi, A., Bahr, B. A., Lerma, J., Cunha, R. A., & Rodrigues, R. J. (2018). Glutamate-induced and NMDA receptor-mediated neurodegeneration entails P2Y1 receptor activation. *Cell death & disease*, 9 (3), 297. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0351-1>
- Siqués, P., Brito, J., León-Velarde, F., Barrios, L., Cruz, J. J., López, V., & Herruzo, R. (2006). Time course of cardiovascular and hematological responses in rats exposed to chronic intermittent hypobaric hypoxia (4600 m). *High altitude medicine & biology*, 7 (1), 72–80. <https://doi.org/10.1089/ham.2006.7.72>
- Skaper, S. D., Giusti, P., & Facci, L. (2012). Microglia and mast cells: two tracks on the road to neuroinflammation. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26 (8), 3103–3117. <https://doi.org/10.1096/fj.11-197194>
- Sloane, J. A., Batt, C., Ma, Y., Harris, Z. M., Trapp, B., & Vartanian, T. (2010). Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (25), 11555–11560. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006496107>
- Smith, K.S., Bucci, D.J., Luikat, B.W. & Mahler, S.V. (2016). DREADDS: Use and application in behavioral neuroscience. *Behav Neurosci*, 1330 (2), 137:155. <https://doi.org/10.1037/bne0000433>
- Smith, S. M., Friedle, S. A., & Watters, J. J. (2013). Chronic intermittent hypoxia exerts CNS region-specific effects on rat microglial inflammatory and TLR4 gene expression. *PloS one*, 8 (12), e81584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081584>
- Somboon, T., Grigg-Damberger, M. M., & Foldvary-Schaefer, N. (2019). Epilepsy and Sleep-Related Breathing Disturbances. *Chest*, 156(1), 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.01.016>

- Söylemez, E., Öztürk, O., Baslo, S. A., Balçık, Z. E., & Ataklı, D. (2020). Metabolic syndrome and obstructive sleep apnea syndrome among patients with epilepsy on monotherapy. *Epilepsy & Behavior*, 111, 107296. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107296>
- Squires, R.F., Saederup, E., Crcrawley, J.N., Skolnick, P. & Paul, S.M. (1984). Convulsant protencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/Benzodiazepine/Picrotoxin receptor complexes in brain. *Life Sciences*, 35, 1439:1444. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(84\)90159-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(84)90159-0)
- Stemkowski, P. L., Garcia-Caballero, A., Gadotti, V. M., M'Dahoma, S., Chen, L., Souza, I. A., & Zamponi, G. W. (2017). Identification of interleukin-1 beta as a key mediator in the upregulation of Cav3.2-USP5 interactions in the pain pathway. *Molecular pain*, 13, 1744806917724698. <https://doi.org/10.1177/1744806917724698>
- Stokes, J. A., Arbogast, T. E., Moya, E. A., Fu, Z., & Powell, F. L. (2017). Minocycline blocks glial cell activation and ventilatory acclimatization to hypoxia. *Journal of neurophysiology*, 117 (4), 1625–1635. <https://doi.org/10.1152/jn.00525.2016>
- Stowell, R.D., Sipe, G.O., Dawes, R.P., Batchelor, H.N., Lordy, K.A., Whitelaw, B.S., Stoessel, M.B., Bidlack, J.M., Brown, E., Sur, M. & Majewska, A.K. (2019). Noradrenergic signaling in the wakeful state inhibits microglial surveillance and synaptic plasticity in the mouse visual cortex. *Nature Neuroscience*, 22, 1782:1792. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0514-0>
- Stratoulas, V., Venero, J.L., Tremblay, M. & Joseph, B. (2019). Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *The EMBO Journal*, 38 (17), e101997. <https://doi.org/10.15252/embj.2019101997>
- Suárez, L. M., Cid, E., Gal, B., Inostroza, M., Brotons-Mas, J. R., Gómez-Domínguez, D., de la Prida, L. M., & Solís, J. M. (2012). Systemic injection of kainic acid differently affects LTP magnitude depending on its epileptogenic efficiency. *PloS one*, 7 (10), e48128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048128>
- Szabo, M., Dulka, K. & Gulya, K. (2016). Calmodulin inhibition regulates morphological and functional changes related to the actin cytoskeleton in pure microglial cells. *Brain Research Bulletin*, 120, 41:57. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.11.003>
- Ta, T., Dikmen, H.O., Schilling, S., Causse, B., Lewen, A., Hollnagel, J. & Kann, O. (2019). Priming of microglia with IFN-g slows neuronal gamma oscillations in situ. *PNAS*, 116 (10), 4637:4642. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813562116>
- Tabatabai, M., & Booth, A. M. (1990). Effects of lidocaine on the excitability and membrane properties of the nerve cell soma. *Clinical physiology and biochemistry*, 8 (6), 289–296.
- Tanaka, K. F., Matsui, K., Sasaki, T., Sano, H., Sugio, S., Fan, K., Hen, R., Nakai, J., Yanagawa, Y., Hasuwa, H., Okabe, M., Deisseroth, K., Ikenaka, K., & Yamanaka, A. (2012). Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Reports*, 2 (2), 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.06.011>
- Tao, A., Xu, Z., Chen, B., Wang, Y., Wu, X., Zhang, J., Tang, Y., Xu, C., Zhao, H., Hu, W., Shi, L., Zhang, S. & Chen, Z. (2015). The pro-inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  is a key regulatory factor for the postictal suppression in mice. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 21, 642:650. <https://doi.org/10.1111/cns.12416>
- Tarasiuk, A., & Segev, Y. (2018). Abnormal Growth and Feeding Behavior in Upper Airway Obstruction in Rats. *Frontiers in endocrinology*, 9, 298. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00298>
- Tarassishin, L., Suh, H. S., & Lee, S. C. (2014). LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14. *Glia*, 62 (6), 999–1013. <https://doi.org/10.1002/glia.22657>



- Taupin P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain research reviews*, 53 (1), 198–214. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.08.002>
- Taylor, S.E., Morganti-Kossmann, C., Lifshitz, J. & Ziebell, J.M. (2014). Rod microglia: A morphological definition. *PLoS ONE*, 9 (5), e97096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097096>
- Téllez-Zenteno, J.F. & Ladino L.D. (2013). Epilepsia temporal: aspectos clínicos, diagnósticos y de tratamiento. *Revista de Neurología*, 56 (4), 229:242. <https://doi.org/10.33588/rn.5604.2012661>
- Teocchi, M. A., Ferreira, A. É., da Luz de Oliveira, E. P., Tedeschi, H., & D'Souza-Li, L. (2013). Hippocampal gene expression dysregulation of Klotho, nuclear factor kappa B and tumor necrosis factor in temporal lobe epilepsy patients. *Journal of neuroinflammation*, 10, 53. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-53>
- Thangthaeng, N., Poulouse, S.M., Fisher, D.R. & Shukitt-Hale, B. (2018). Walnut extract modulates activation of microglia through alteration in intracellular calcium concentration. *Nutrition Research*, 49, 88:95. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.10.016>
- Thorpy M. J. (2012). Classification of sleep disorders. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 9 (4), 687–701. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0145-6>
- Tikka, T., Fiebich, B.L., Goldsteins, G., Keinänen, R. & Koistinaho, J. (2001). Minocycline, a tetracycline derivate, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *The Journal of Neuroscience*, 21 (8), 2580:2588. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-08-02580.2001>
- Trang, T., Beggs, S., Wan, X. & Salter, M.W. (2009). P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *The Journal of Neuroscience*, 29 (11), 3518:3528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5714-08.2009>
- Tufik, S., Santos-Silva, R., Taddei, J. A., & Bittencourt, L. R. (2010). Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep medicine*, 11 (5), 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2009.10.005>
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Bortolotto, Z.A., Mello, L.M., Schwarz, M. & Turski, L. (1984). Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Research*, 321, 237:253. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90177-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90177-x)
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.L., Kleinrok, Z. & Turski, L. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioral Brain Research*, 9, 315:335. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(83\)90136-5](https://doi.org/10.1016/0166-4328(83)90136-5)
- Urban, D.J. & Roth, B.L. (2014). DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): Chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annual Review of Toxicology and Pharmacology*, 55, 399:417. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124803>
- Utz, S. G., & Greter, M. (2019). Checking macrophages at the border. *Nature neuroscience*, 22 (6), 848–850. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0411-6>
- Valdés-Cruz, A., Villasana-Salazar, B., Williams, B., Martínez-Vargas, D., Magdaleno-Madrigal, V. M., Almazán-Alvarado, S., & Besio, W. G. (2019). Transcranial focal electrical stimulation via concentric ring electrodes in freely moving cats: Antiepileptogenic and postictal effects. *Experimental neurology*, 320, 113012. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113012>

- Valdes-Galvan, R. E., Gonzalez-Calderon, G., & Castro-Martinez, E. (2019). Acute seizure epidemiology in a neurological emergency department. *Epidemiologia del descontrol de la epilepsia en un servicio de urgencias neurologicas. Revista de neurologia*, 68 (8), 321–325. <https://doi.org/10.33588/rn.6808.2018218>
- Van Den Eeckhout, B., Tavernier, J., & Gerlo, S. (2021). Interleukin-1 as Innate Mediator of T Cell Immunity. *Frontiers in immunology*, 11, 621931. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.621931>
- Van Hove, H., Martens, L., Scheyltjens, I., De Vlamincck, K., Pombo Antunes, A. R., De Prijck, S., Vandamme, N., De Schepper, S., Van Isterdael, G., Scott, C. L., Aerts, J., Berx, G., Boeckxstaens, G. E., Vandenbroucke, R. E., Vereecke, L., Moechars, D., Williams, M., Van Ginderachter, J. A., Saeys, Y., & Movahedi, K. (2019). A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nature neuroscience*, 22 (6), 1021–1035. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0393-4>
- van Rooijen, N., & Hendrikx, E. (2010). Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues. *Methods in molecular biology*, 605, 189–203. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2_13)
- Vankriekelsvenne, E., Chrzanowski, U., Manzhula, K., Greiner, T., Wree, A., Hawlitschka, A., Llovera, G., Zhan, J., Joost, S., Schmitz, C., Ponsaerts, P., Amor, S., Nutma, E., Kipp, M., & Kaddatz, H. (2022). Transmembrane protein 119 is neither a specific nor a reliable marker for microglia. *Glia*, 70 (6), 1170–1190. <https://doi.org/10.1002/glia.24164>
- Vaughn, B. V., & D'Cruz, O. F. (2003). Obstructive sleep apnea in epilepsy. *Clinics in Chest Medicine*, 24 (2), 239–248. [https://doi.org/10.1016/s0272-5231\(03\)00023-6](https://doi.org/10.1016/s0272-5231(03)00023-6)
- Vaughn, B. V., D'Cruz, O. F., Beach, R., & Messenheimer, J. A. (1996). Improvement of epileptic seizure control with treatment of obstructive sleep apnoea. *Seizure*, 5 (1), 73–78. [https://doi.org/10.1016/s1059-1311\(96\)80066-5](https://doi.org/10.1016/s1059-1311(96)80066-5)
- Velasco, M., Velasco, F., Velasco, A. L., Boleaga, B., Jimenez, F., Brito, F., & Marquez, I. (2000). Subacute electrical stimulation of the hippocampus blocks intractable temporal lobe seizures and paroxysmal EEG activities. *Epilepsia*, 41 (2), 158–169. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb00135.x>
- Velisek, L. (2006). Models of chemically-induced acute seizures. En Pitkänen, A., Schwartzkroin, P.A. & Moshé, S.L. (Eds.). *Models of Seizures and Epilepsy* (pp. 127–152). Estados Unidos: Elsevier Academic Press.
- Velisek, L., Kubova, H., Pohl, M., Stankova, L., Mares, P., & Schickerova, R. (1992). Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 346 (5), 588–591. <https://doi.org/10.1007/BF00169017>
- Vendrame, M., Auerbach, S., Loddenkemper, T., Kothare, S., & Montouris, G. (2011). Effect of continuous positive airway pressure treatment on seizure control in patients with obstructive sleep apnea and epilepsy. *Epilepsia*, 52 (11), e168–e171. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03214.x>
- Vendrame, M., Jackson, S., Syed, S., Kothare, S. V., & Auerbach, S. H. (2014). Central sleep apnea and complex sleep apnea in patients with epilepsy. *Sleep & Breathing*, 18 (1), 119–124. <https://doi.org/10.1007/s11325-013-0858-8>
- Verhaert, K. & Scott, R.C. (2010). Acute symptomatic epileptic seizures. En Panayiotopoulos C.P. (Ed). *Atlas of epilepsies* (pp. 70-78). Reino Unido: Springer Reference.

- Verhoog QP, Holtman L, Aronica E, van Vliet EA. Astrocytes as Guardians of Neuronal Excitability: Mechanisms Underlying Epileptogenesis. *Front Neurol*, 11:591690. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.591690>.
- Verkhratsky, A. & Butt, A. (2007). *Glial neurobiology. A textbook*. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd.
- Verkhratsky, A. & Noda, M. (2014). *General physiology and pathophysiology of microglia*. En Peterson, P.K. & Toborek, M. *Neuroinflammation and Neurodegeneration*. Estados Unidos: Springer Science.
- Vezzani, A., & Granata, T. (2005). Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*, 46 (11), 1724–1743. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x>
- Vezzani, A., & Viviani, B. (2015). Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology*, 96 (Pt A), 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.027>
- Vezzani, A., Balosso, S. & Ravizza, T. (2008). The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain, Behavior and Immunity*, 22, 797:803. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.03.009>
- Vezzani, A., Balosso, S. & Ravizza, T. (2019). Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 15 (8), 459:472.
- Vezzani, A., Conti, M., De Luigi, A., Ravizza, T., Moneta, D., Marchesi, F., & De Simoni, M. G. (1999). Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19 (12), 5054–5065. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-12-05054.1999>
- Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., & Baram, T. Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nature reviews. Neurology*, 7 (1), 31–40. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.178>
- Vezzani, A., Moneta, D., Conti, M., Richichi, C., Ravizza, T., De Luigi, A., De Simoni, M. G., Sperk, G., Andell-Jonsson, S., Lundkvist, J., Iverfeldt, K., & Bartfai, T. (2000). Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (21), 11534–11539. <https://doi.org/10.1073/pnas.190206797>
- Vezzani, A., Moneta, D., Richichi, C., Aliprandi, M., Burrows, S. J., Ravizza, T., Perego, C., & De Simoni, M. G. (2002). Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*, 43 (Suppl 5), 30–35. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.43.s.5.14.x>
- Villasana-Salazar, B., Hernández-Soto, R., Guerrero-Gómez, M. E., Ordaz, B., Manrique-Maldonado, G., Salgado-Puga, K., & Peña-Ortega, F. (2020). Chronic intermittent hypoxia transiently increases hippocampal network activity in the gamma frequency band and 4-Aminopyridine-induced hyperexcitability in vitro. *Epilepsy Research*, 166, 106375. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2020.106375>
- Vinet, J., Vainchtein, I.D., Spano, C., Giordano, C., Bordini, D., Curia, G., Dominici, M., Boddeke, H., Eggen, B. & Biagini, G. (2016). Microglia are less pro-inflammatory than myeloid infiltrates in the hippocampus of mice exposed to status Epilepticus. *Glia*, 61, 1350:1362. <https://doi.org/10.1002/glia.23008>
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C. L., & Marinovich, M. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society*

- for Neuroscience, 23 (25), 8692–8700. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003>
- Vlasov, K., Van Dort, C. J., & Solt, K. (2018). Optogenetics and Chemogenetics. *Methods in Enzymology*, 603, 181–196. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.01.022>
- Voutsinos-Porche, B., Koning, E., Kaplan, H., Ferrandon, A., Guenounou, M., Nehlig, A. & Motte, J. (2004). Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 17, 385:402. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.07.023>
- Wagman, I. H., De Jong, R. H., & Prince, D. A. (1968). Effects of lidocaine on spontaneous cortical and subcortical electrical activity. Production of seizure discharges. *Archives of neurology*, 18 (3), 277–290. <https://doi.org/10.1001/archneur.1968.00470330067007>
- Wais, M., Wu, C., Zahid, T., Sheppy, E., Gillis, J., Del Campo, M., Wan, Q., & Zhang, L. (2009). Repeated hypoxic episodes induce seizures and alter hippocampal network activities in mice. *Neuroscience*, 161 (2), 599–613. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.036>
- Walt, I., Käufer, C., Bröer, S., Chhatbar, C., Ghita, L., Gerhauser, I., Anjum, M., Kalinke, U. & Löscher. (2017). Macrophage depletion by liposome-encapsulated clodronate suppresses seizures but not hippocampal damage after acute viral encephalitis. *Neurobiology of Disease*, 110, 192:205. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.12.001>
- Walton, N. M., Sutter, B. M., Laywell, E. D., Levkoff, L. H., Kearns, S. M., Marshall, G. P., 2nd, Scheffler, B., & Steindler, D. A. (2006). Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia*, 54 (8), 815–825. <https://doi.org/10.1002/glia.20419>
- Wang, D., Englot, D., Garcia, P., Lawton, M. & Young, W. (2012). Minocycline and tetracycline-class antibiotics are protective against partial seizures in vivo, *Epilepsy & Research*, 24 (3), 314:318. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.03.035>
- Wang, J., Ming, H., Chen, R., Ju, J. M., Peng, W. D., Zhang, G. X., & Liu, C. F. (2015). CIH-induced neurocognitive impairments are associated with hippocampal Ca(2+) overload, apoptosis, and dephosphorylation of ERK1/2 and CREB that are mediated by overactivation of NMDARs. *Brain research*, 1625, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.08.012>
- Wang, S., Cheng, Q., Malik, S. & Yang, J. (2000). Interleukin-1 $\beta$  inhibits  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) receptor current in cultured hippocampal neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292, 497:504.
- Wang, Y. R., Mao, X. F., Wu, H. Y., & Wang, Y. X. (2018). Liposome-encapsulated clodronate specifically depletes spinal microglia and reduces initial neuropathic pain. *Biochemical and biophysical research communications*, 499 (3), 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.177>
- Wang, Y., Meagher, R. B., Ambati, S., Cheng, H., Ma, P., & Phillips, B. G. (2021). Patients with Obstructive Sleep Apnea Have Altered Levels of Four Cytokines Associated with Cardiovascular and Kidney Disease, but Near Normal Levels with Airways Therapy. *Nature and science of sleep*, 13, 457–466. <https://doi.org/10.2147/NSS.S282869>
- Wang, Y., Wei, P., Yan, F., Luo, Y., & Zhao, G. (2022). Animal Models of Epilepsy: A Phenotype-oriented Review. *Aging and disease*, 13(1), 215–231. <https://doi.org/10.14336/AD.2021.0723>
- Weber, A., Wasiliew, P., & Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science signaling*, 3 (105), cm1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3105cm1>
- Webster, K.M., Sun, M., Crack, P., O'Brien, T.J., Shultz, S.R., & Semple, B.D. (2017). Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 14 (10), 101:17. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0786-1>

- Wei, H., Chadman, K. K., McCloskey, D. P., Sheikh, A. M., Malik, M., Brown, W. T., & Li, X. (2012). Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors. *Biochimica et biophysica acta*, 1822 (6), 831–842. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.01.011>
- Wei, Y., Chen, T., Bosco, D. B., Xie, M., Zheng, J., Dheer, A., Ying, Y., Wu, Q., Lennon, V. A., & Wu, L. J. (2021). The complement C3-C3aR pathway mediates microglia-astrocyte interaction following status epilepticus. *Glia*, 69 (5), 1155–1169. <https://doi.org/10.1002/glia.23955>
- Weinberg, M.S., Blake, B.L. & McCown, T.J. (2013). Opposing actions of hippocampus TN $\alpha$  receptors on limbic seizure susceptibility. *Experimental Neurology*, 247, 429:437. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.011>
- Whalley, B. J., Lin, H., Bell, L., Hill, T., Patel, A., Gray, R. A., Elizabeth Roberts, C., Devinsky, O., Bazelat, M., Williams, C. M., & Stephens, G. J. (2019). Species-specific susceptibility to cannabis-induced convulsions. *British journal of pharmacology*, 176 (10), 1506–1523. <https://doi.org/10.1111/bph.14165>
- Wieghofer, P., & Prinz, M. (2016). Genetic manipulation of microglia during brain development and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1862 (3), 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.09.019>
- Wolansky, T., Clement, E.A., Peters, S.R., Palczak, M.A. & Dickson, C.T. (2006). Hippocampal slow oscillations: A novel EEG state and its coordination with ongoing neocortical activity. *The Journal of Neuroscience*, 26 (23), 6213:6229. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5594-05.200>
- Wong, M., Wozniak, D.F. & Yamada, K.A. (2003). An animal model of generalized nonconvulsive status epilepticus: immediate characteristics and long-term effects. *Experimental Neurology*, 183, 87:99. [https://doi.org/10.1016/s0014-4886\(03\)00099-2](https://doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00099-2)
- Wu, Q., & Wang, H. (2018). The spatiotemporal expression changes of CB2R in the hippocampus of rats following pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsy research*, 148, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.10.002>
- Wu, X., Gong, L., Xie, L., Gu, W., Wang, X., Liu, Z., & Li, S. (2021). NLRP3 Deficiency Protects Against Intermittent Hypoxia-Induced Neuroinflammation and Mitochondrial ROS by Promoting the PINK1-Parkin Pathway of Mitophagy in a Murine Model of Sleep Apnea. *Frontiers in Immunology*, 12, 628168. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.628168>
- Wyatt-Johnson, S.K., Herr, S.A., & Brewster, A.L. (2017). Status epilepticus triggers time-dependent alterations in microglia abundance and morphological phenotypes in the hippocampus. *Frontiers in Neurology*, 8, 700. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00700>
- Xie, H., & Yung, W. H. (2012). Chronic intermittent hypoxia-induced deficits in synaptic plasticity and neurocognitive functions: a role for brain-derived neurotrophic factor. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33 (1), 5–10. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.184>
- Xu, H., Wang, Z., Li, J., Wu, H., Peng, Y., Fan, L., Chen, J., Gu, C., Yan, F., Wang, L. & Chen, G. (2017). The polarization states of microglia in TBI: A new paradigm for pharmacological intervention. *Neural Plasticity*, 5405104, 1:11. <https://doi.org/10.1155/2017/5405104>
- Yang, J., Zhao, Y. & Shao, F. (2015). Non-canonical activation of inflammatory caspases by cytosolic LPS in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 32, 78:83. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.01.007>
- Yang, X., Wei, X., Mu, Y., Li, Q., & Liu, J. (2020). A review of the mechanism of the central analgesic effect of lidocaine. *Medicine*, 99 (17), e19898. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000019898>

- Ye, Z. C., & Sontheimer, H. (1996). Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. *Neuroreport*, 7 (13), 2181–2185. <https://doi.org/10.1097/00001756-199609020-00025>
- Yeh, N. C., Tien, K. J., Yang, C. M., Wang, J. J., & Weng, S. F. (2016). Increased Risk of Parkinson's Disease in Patients With Obstructive Sleep Apnea: A Population-Based, Propensity Score-Matched, Longitudinal Follow-Up Study. *Medicine*, 95 (2), e2293. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002293>
- Yi, M. H., Liu, Y. U., Liu, K., Chen, T., Bosco, D. B., Zheng, J., Xie, M., Zhou, L., Qu, W., & Wu, L. J. (2021a). Chemogenetic manipulation of microglia inhibits neuroinflammation and neuropathic pain in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 92, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.030>
- Yi, M. H., Liu, Y. U., Umpierre, A. D., Chen, T., Ying, Y., Zheng, J., Dheer, A., Bosco, D. B., Dong, H., & Wu, L. J. (2021b). Optogenetic activation of spinal microglia triggers chronic pain in mice. *PLoS Biology*, 19 (3), e3001154. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001154>
- Youn, Y., Sung, I. K., & Lee, I. G. (2013). The role of cytokines in seizures: interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-8, and IL-10. *Korean journal of pediatrics*, 56 (7), 271–274. <https://doi.org/10.3345/kjp.2013.56.7.271>
- Young, K., & Morrison, H. (2018). Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (136), 57648. <https://doi.org/10.3791/57648>
- Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., & Badr, S. (1993). The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *The New England journal of medicine*, 328 (17), 1230–1235. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304293281704>
- Young, T., Peppard, P. E., & Gottlieb, D. J. (2002). Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165 (9), 1217–1239. <https://doi.org/10.1164/rccm.2109080>
- Yuan, X., Guo, X., Deng, Y., Zhu, D., Shang, J., & Liu, H. (2015). Chronic intermittent hypoxia-induced neuronal apoptosis in the hippocampus is attenuated by telmisartan through suppression of iNOS/NO and inhibition of lipid peroxidation and inflammatory responses. *Brain Research*, 1596, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.035>
- Yuhas, Y., Weizman, A., Dinari, G. & Ashkenazi, S. (1995). An animal model for the study of neurotoxicity of bacterial products and application of the model to demonstrate that shiga toxin and lipopolysaccharide cooperate in inducing neurologic disorders. *The journal of infectious diseases*, 171 (5), 1244-1249. <https://doi.org/10.1093/infdis/171.5.1244>
- Zavala-Tecuapetla, C., & López-Meraz, M. L. (2011). Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo. *eNeurobiología*, 2 (4), 1-16.
- Zelová, H., & Hošek, J. (2013). TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society*, 62 (7), 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>
- Zeng, M. L., Cheng, J. J., Kong, S., Yang, X. L., Jia, X. L., Cheng, X. L., Chen, L., He, F. G., Liu, Y. M., Fan, Y. T., Gongga, L., Chen, T. X., Liu, W. H., He, X. H., & Peng, B. W. (2022). Inhibition of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Mitigates Seizures. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 10.1007/s13311-022-01198-8. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01198-8>
- Zhang, Q., Yuan, L., Zhang, Q., Gao, Y., Liu, G., Xiu, M., Wei, X., Wang, Z., & Liu, D. (2015). Resveratrol attenuates hypoxia-induced neurotoxicity through inhibiting microglial

- activation. *International Immunopharmacology*, 28 (1), 578–587.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.07.027>
- Zhang, Y., Cao, H., Qiu, X., Xu, D., Chen, Y., Barnes, G. N., Tu, Y., Gyabaah, A. T., Gharbal, A., Peng, C., Cai, J., & Cai, X. (2020). Neuroprotective Effects of Adenosine A1 Receptor Signaling on Cognitive Impairment Induced by Chronic Intermittent Hypoxia in Mice. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 202.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00202>
- Zhao, H., Zhu, C. & Huang, D. (2018). Microglial activation: an important process in the onset of epilepsy. *American Journal of Translational Research*, 10 (9), 2877:2889.
- Zhao, X., Wang, H., Sun, G., Zhang, J., Edwards, N. J., & Aronowski, J. (2015). Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 35 (32), 11281–11291. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1685-15.2015>
- Zheng, H., Zhu, W., Zhao, H., Wang, X., Wang, W., & Li, Z. (2010). Kainic acid-activated microglia mediate increased excitability of rat hippocampal neurons in vitro and in vivo: crucial role of interleukin-1beta. *Neuroimmunomodulation*, 17 (1), 31–38.  
<https://doi.org/10.1159/000243083>
- Zhuang, F., Zhou, X., Li, H., Yang, X., Dong, Z., Zhou, W., & Chen, J. (2016). Hydrogen sulfide promotes learning and memory and suppresses proinflammatory cytokines in repetitive febrile seizures. *Neuroimmunomodulation*, 23 (5-6), 271:277. <https://doi.org/10.1159/000449504>
- Ziebell, J.M., Adelson, P.D. & Lifshitz, J. (2015). Microglia: Dismantling and rebuilding circuits after acute neurological injury. *Metabolic Brain Disease*, 30 (2), 393:400.  
<https://doi.org/10.1007/s11011-014-9539-y>
- Zurolo, E., Iyer, A., Maroso, M., Carbonell, C., Anink, J. J., Ravizza, T., Fluiter, K., Splet, W. G., van Rijen, P. C., Vezzani, A., & Aronica, E. (2011). Activation of Toll-like receptor, RAGE and HMGB1 signalling in malformations of cortical development. *Brain: a journal of neurology*, 134 (Pt 4), 1015–1032. <https://doi.org/10.1093/brain/awr032>

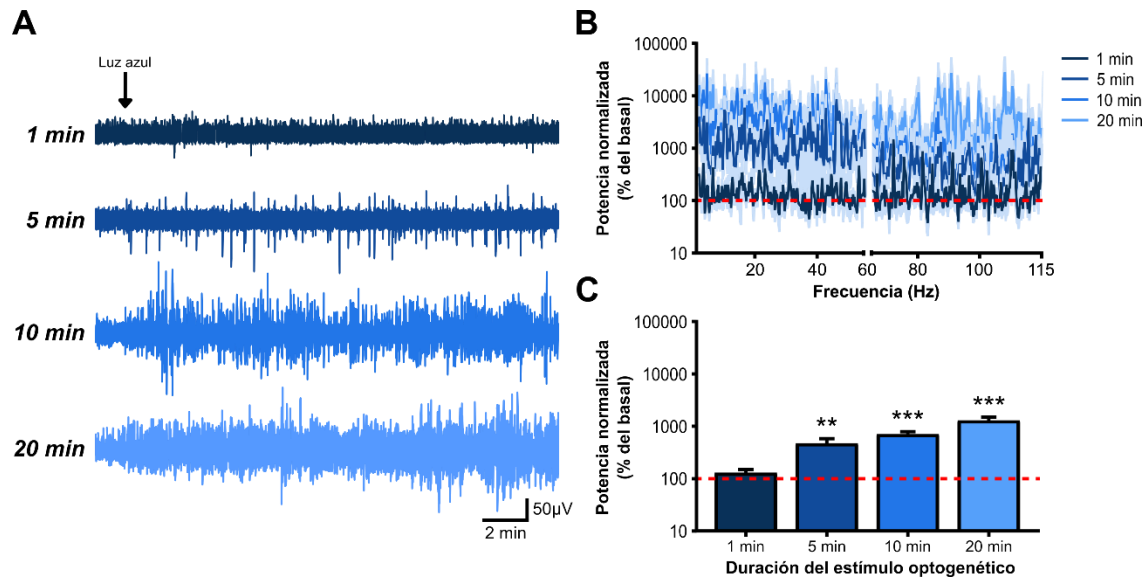
## ANEXOS

### **Anexo 1 – Caracterización del efecto de la estimulación optogenética sobre la excitabilidad hipocampal en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2.**

Con la finalidad de caracterizar la influencia de la estimulación optogenética con luz azul sobre la excitabilidad hipocampal en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 y, de esta forma, establecer la estimulación optogenética requerida para provocar cambios en la actividad electrofisiológica del hipocampo, se realizó una curva de estimulación en donde, en los mismos animales, se aplicaron pulsos de luz azul continua con diferentes duraciones (1 min, 5 min, 10 min y 20 min;  $\sim 0.03$  mW/mm<sup>2</sup> de intensidad; n = 6) y se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal por 20 minutos (Anexo 1A). Tras 1 minuto de estimulación optogenética no se observaron cambios sustanciales en la excitabilidad hipocampal (Anexo 1A), así como en la potencia de dicha actividad en la banda ancha de 1-115 Hz ( $131.7 \pm 19.9$  % del basal; n = 6;  $p > 0.1$ ; prueba de Friedman; Anexo 1B y 1C), con respecto a la actividad electrofisiológica previa al estímulo optogenético. Sin embargo, 5 minutos de estimulación optogenética indujo la aparición de espigas epileptiformes e incrementó la actividad electrofisiológica de fondo (Anexo 1A), reflejándose en un aumento estadísticamente significativo de la potencia en la banda ancha de 1-115 Hz ( $477.6 \pm 110.4$  % del basal; n = 6;  $p < 0.01$ ; prueba de Friedman; Anexo 1B y 1C), con respecto a la actividad electrofisiológica previa a la estimulación optogenética. La estimulación optogenética con duración de 10 minutos indujo un aumento sustancial de la actividad electrográfica de fondo acompañado de espigas epileptiformes (Anexo 1A), cuya potencia en la banda ancha de 1-115 Hz fue estadísticamente mayor a la actividad electrofisiológica previa a la estimulación optogenética y a las estimulaciones de 1 y 5 minutos ( $713.3 \pm 89.2$  % del basal; n = 6;  $p < 0.001$ ; prueba de Friedman; Anexo 1B y 1C). Asimismo, con la estimulación optogenética con duración de 20 minutos se observaron los mismos efectos que con la estimulación de 10 minutos, pero exacerbados (Anexo 1A), mostrando un incremento significativo de la potencia en la banda ancha de 1-115 Hz ( $1307.2 \pm 196.5$  % del basal; n = 6;  $p < 0.001$ ; prueba de Friedman; Anexo



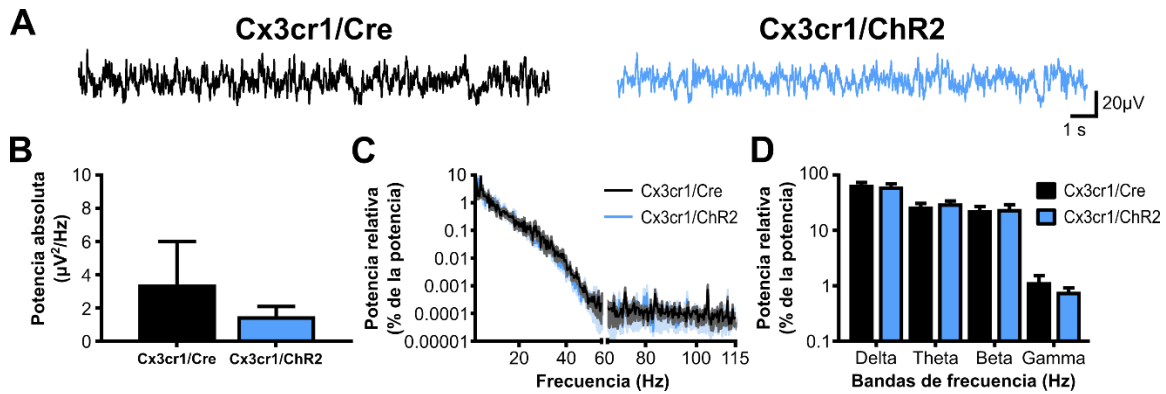
1B y 1C), comparada con la actividad previa a la estimulación optogenética y a las estimulaciones de 1, 5 y 10 minutos. En conjunto, estos resultados indican que la estimulación optogenética en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 incrementa la excitabilidad hipocampal en una forma dependiente de la duración del estímulo optogenético.



Anexo 1. Efecto de la modulación optogenética sobre la actividad electrofisiológica del hipocampo de animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica hipocampal antes y después de la estimulación optogenética con diferentes duraciones (1 min, 5 min, 10 min y 20 min) en animales de la cepa Cx3cr1/ChR2. Nótese que la actividad electrofisiológica hipocampal incrementa su amplitud conforme aumenta la duración del estímulo optogenético. B. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal), en la banda ancha de 1-115 Hz, de la actividad electrofisiológica del hipocampo después de la estimulación optogenética con diferentes duraciones en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2 (n = 6). C. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica hipocampal, en la banda ancha de 1-115 Hz, después la estimulación optogenética con diferentes duraciones. Nótese que la estimulación optogenética incrementa la potencia de la actividad electrofisiológica hipocampal en una forma dependiente de la duración del estímulo optogenético. \*\* y \*\*\*, denotan una diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente, comparado con la actividad electrofisiológica previa a la estimulación optogenética. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Friedman. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

## **Anexo 2 – Caracterización de la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2.**

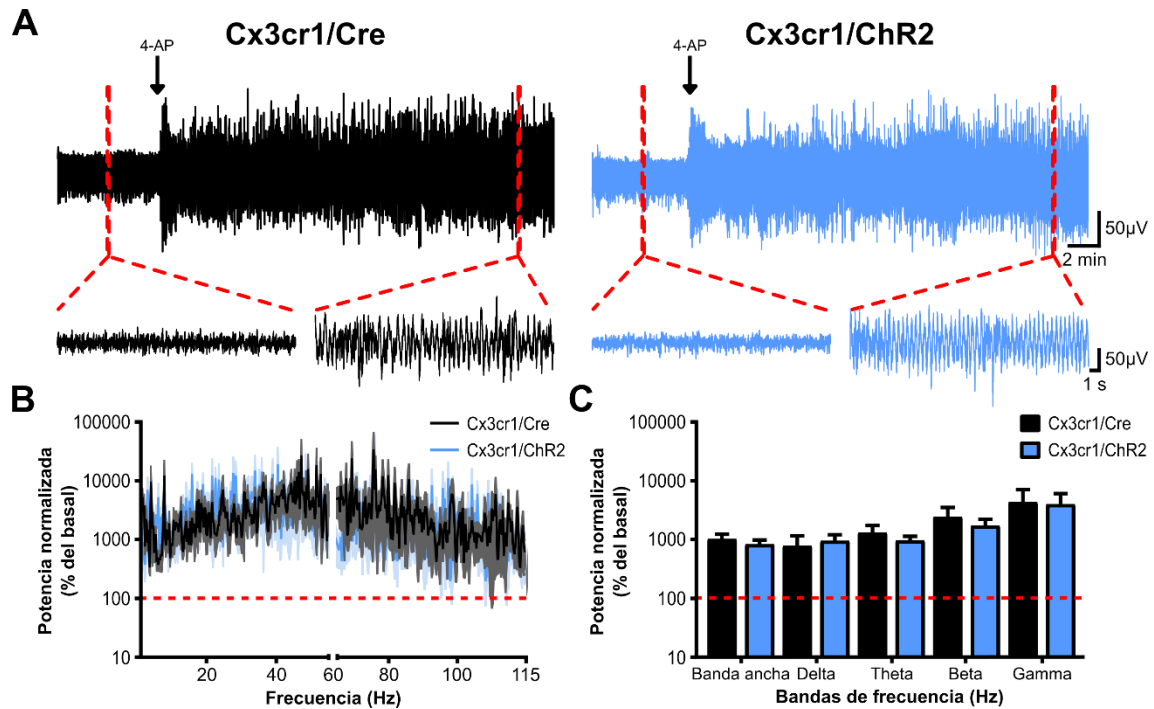
Con el objetivo de caracterizar la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2, se analizó la actividad electrofisiológica basal y se comparó con la de los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre. La actividad electrofisiológica basal del hipocampo de los animales de ambas cepas se caracterizó por la presencia de actividad rítmica lenta (Anexo 2A), típica de la anestesia inducida con uretano (Krami et al., 1975; Wolansky et al., 2006). El análisis de la potencia absoluta en la banda ancha de 1-115 Hz no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $3.2 \pm 2.5 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ;  $n = 7$ ; Anexo 2B) y Cx3cr1/ChR2 ( $1.4 \pm 0.6 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ;  $n = 7$ ;  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis; Anexo 2B). De la misma forma, el análisis de la potencia relativa de la actividad basal del hipocampo no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas entre los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2 (Delta =  $52.0 \pm 7.3 \%$  de la potencia,  $p > 0.1$ ; Theta =  $26.2 \pm 3.4 \%$  de la potencia,  $p > 0.1$ ; Beta =  $20.9 \pm 4.6 \%$  de la potencia,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $0.7 \pm 0.1 \%$  de la potencia,  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $n = 7$ ; anexo 2C y 2D) y los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre (Delta =  $55.9 \pm 7.0 \%$  de la potencia; Theta =  $23.2 \pm 3.5 \%$  de la potencia; Beta =  $19.7 \pm 3.9 \%$  de la potencia; Gamma =  $1.0 \pm 0.1 \%$  de la potencia;  $n = 7$ , anexo 2C y 2C). Juntos, estos resultados indican que la capacidad para generar actividad oscilatoria rítmica, característica del circuito hipocampal (Kramis et al., 1975; Buzsáki et al., 2003), no se ve alterada con la expresión constitutiva de la proteína ChR2 en los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2.



Anexo 2. Caracterización de la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2. A. Trazos representativos de la actividad electrofisiológica hipocampal basal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2. B. Cuantificación de la potencia absoluta ( $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ), en la banda ancha de 1-115 Hz, de la actividad electrofisiológica del hipocampo de animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $n = 7$ ) y Cx3cr1/ChR2 ( $n = 7$ ). C. Espectrogramas de la potencia relativa (% de la potencia) de la actividad electrofisiológica hipocampal basal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2. D. Cuantificación de la potencia relativa (% de la potencia) de la actividad electrofisiológica basal del hipocampo de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2 en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). Nótese que la expresión constitutiva de la proteína ChR2 no afecta la actividad electrofisiológica basal del hipocampo en los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

### **Anexo 3 – Caracterización de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2.**

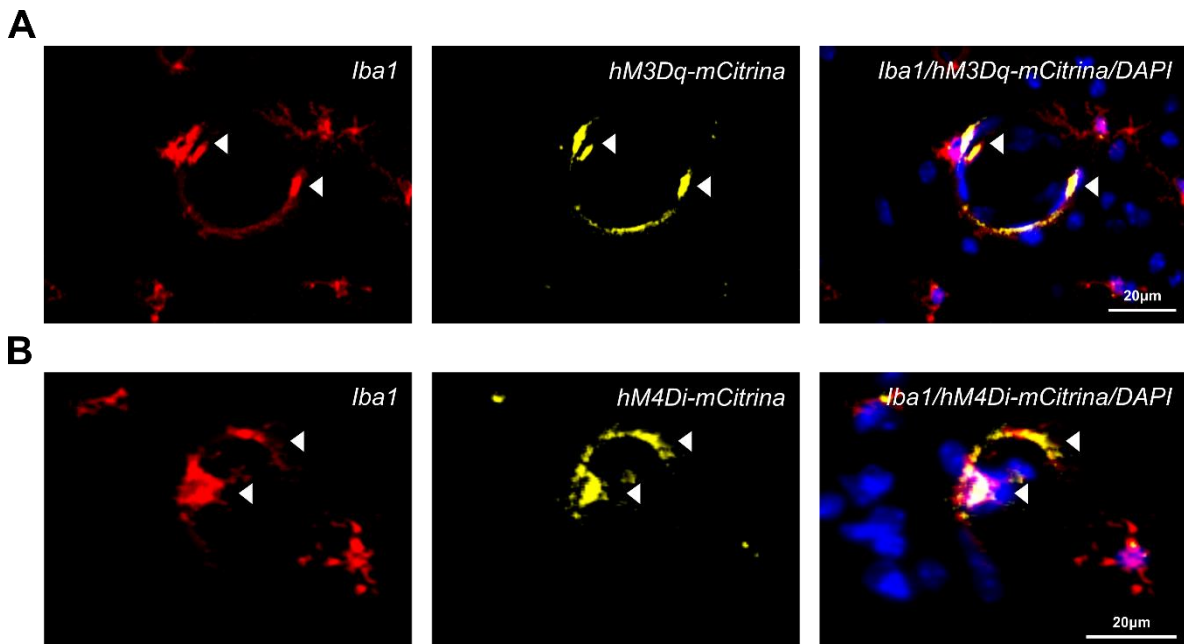
Con el objetivo de caracterizar la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2, se administró 4-AP (20 mg/kg, i.p.) de forma sistémica en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2 y posteriormente se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal durante 20-30 minutos. La administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) indujo hiperexcitabilidad en ambas cepas de animales, caracterizada por el aumento de la actividad electrofisiológica de fondo y la presencia de espigas epileptiformes (Anexo 3A). El análisis de la potencia de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas entre los animales de las cepas Cx3cr1/Cre (Banda ancha =  $988.2 \pm 209.5$  % del basal; Delta =  $923.1 \pm 249.0$  % del basal; Theta =  $936.9 \pm 163.5$  % del basal; Beta =  $1662.0 \pm 488.6$  % del basal; Gamma =  $3816.6 \pm 1987.3$  % del basal; n = 6; Anexo 3B y 3C) y Cx3cr1/ChR2 (Banda ancha =  $804.3 \pm 150.7$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $755.6 \pm 364.6$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta =  $1271.3 \pm 409.9$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $2345.4 \pm 1030.9$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $4153.7 \pm 2627.7$  % del basal,  $p > 0.1$ ; n = 6; prueba de Kruskal-Wallis; Anexo 3B y 3C). Estos resultados indican que la expresión constitutiva de la proteína ChR2 no afecta la inducción de hiperexcitabilidad con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2.



Anexo 3. Caracterización de la inducción de hiperexcitabilidad hipocámpal con 4-AP en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/ChR2. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica basal y de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2. Las flechas indican el inicio de administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 15-20 minutos después de la administración de 4-AP (40 mg/kg, i.p.; trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la hiperexcitabilidad hipocámpal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre (n = 6) y Cx3cr1/ChR2 (n = 6). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la hiperexcitabilidad hipocámpal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/ChR2 en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). Nótese que la expresión constitutiva de la proteína ChR2 no afecta la inducción de hiperexcitabilidad hipocámpal con 4-AP en los animales de la cepa Cx3cr1/ChR2. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

#### Anexo 4 – Caracterización de la expresión de las proteínas de fusión hM3Dq-mCitrina y hM4Di-mCitrina en macrófagos no parenquimales de los espacios perivasculares del hipocampo de animales de las cepas Cx3cr1/hM3Dq y Cx3cr1/hM4Di.

Con la finalidad de caracterizar la expresión de las proteínas de fusión hM3Dq-mCitrina y hM4Di-mCitrina en los macrófagos no parenquimales de los espacios perivasculares de los animales de las cepas Cx3cr1/hM3Dq y Cx3cr1/hM4Di, respectivamente, mediante inmunofluorescencia, se observó la expresión de la proteína fluorescente mCitrina, expresada de forma constitutiva en las células que expresan a los DREADDs hM3Dq y hM4Di, y se colocalizó con la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1 en células perivasculares del hipocampo de animales de las cepas Cx3cr1/hM3Dq (Anexo 4A) y Cx3cr1/hM4Di (Anexo 4B). En las muestras histológicas del *stratum lacunosum-moleculare* del área CA1 del hipocampo de los animales de las cepas Cx3cr1/hM3Dq y Cx3cr1/hM3Dq, la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1 evidenció la presencia de macrófagos asociados a los espacios perivasculares (Anexo 4A y 4B). La marca fluorescente de las proteínas de fusión hM3Dq-mCitrina y hM4Di-mCitrina se observó como *puncta* de fluorescencia y colocalizó con las células positivas a Iba1 de los espacios perivasculares en ambas cepas de animales (Anexo 4A y 4B).



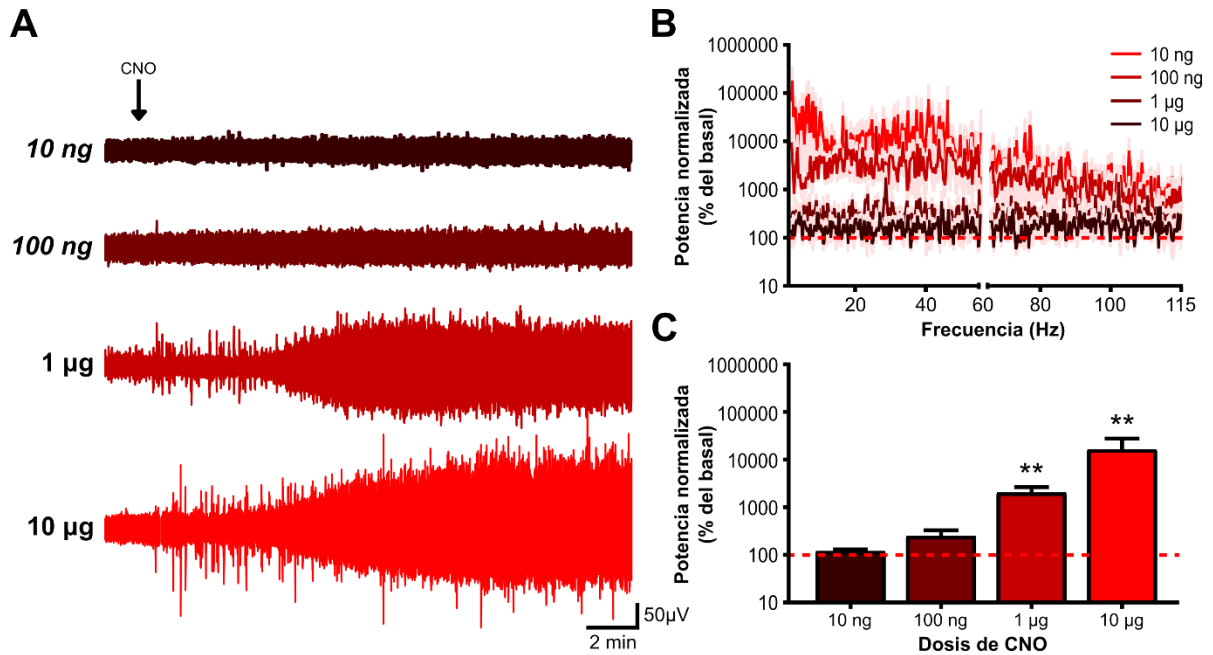
Anexo 4. Caracterización de la expresión de las proteínas de fusión hM3Dq-mCitrina y hM4Di-mCitrina en macrófagos no parenquimales de los espacios perivasculares del hipocampo de animales de las cepas Cx3cr1/hM3Dq y

Cx3cr1/hM4Di, respectivamente. A. Micrografías de la inmunofluorescencia del anticuerpo Iba1 (izquierda, rojo), de la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina (centro, amarillo) y de su combinación con DAPI (derecha, azul), en el *stratum lacunosum-moleculare* del área CA1 del hipocampo de un animal de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. Las flechas blancas indican células perivasculares positivas a Iba1 y a la proteína de fusión hM3Dq-mCitrina. B. Lo mismo que en A, pero para animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di. Nótese que las proteínas de fusión hM3Dq-mCitrina y hM4Di-mCitrina colocalizan con la marca fluorescente del anticuerpo anti-Iba1 en células perivasculares del hipocampo de animales Cx3cr1/hM3Dq y Cx3cr1/hM4Di, respectivamente.

## **Anexo 5– Caracterización del efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la actividad electrofisiológica hipocampal en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.**

Con el objetivo de caracterizar la influencia de la activación selectiva de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la excitabilidad hipocampal, en grupos independientes de animales, se administró CNO de forma intracerebroventricular a diferentes dosis (10 ng, 100 ng, 1  $\mu$ g y 10  $\mu$ g) en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq y posteriormente se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal durante 20 minutos (Anexo 5A). La administración intracerebroventricular de 10 ng y de 100 ng de CNO no produjo efectos significativos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal (Anexo 4A), así como tampoco cambios en la potencia de la actividad electrofisiológica en la banda ancha de 1-115 Hz (10 ng:  $120.9 \pm 11.9$  % del basal,  $p > 0.1$ ,  $n = 6$ ; 100 ng:  $252.3 \pm 81.6$  % del basal,  $p > 0.1$ ,  $n = 6$ ; prueba de Friedman; Anexo 5B y 5C), con respecto a la actividad basal previa a la administración de CNO. Sin embargo, la administración de 1  $\mu$ g de CNO aumentó la amplitud de la actividad electrográfica hipocampal (Anexo 4A), así como la potencia de dicha actividad en la banda ancha de 1-115 Hz ( $2062.5 \pm 626.4$  % del basal,  $p < 0.001$ ,  $n = 6$ ; prueba de Friedman; Anexo 5B y 5C), con respecto a la actividad basal previa a la administración de CNO. Asimismo, la aplicación de 10  $\mu$ g de CNO aumentó sustancialmente la amplitud de la actividad electrofisiológica hipocampal e indujo espigas epileptiformes (Anexo 5A). Dichos efectos se reflejaron en un aumento significativo de la potencia de la actividad electrográfica en la banda ancha de 1-115 Hz ( $16602.2 \pm 11499.8$  % del basal,  $p < 0.001$ ,  $n = 6$ ; prueba de Friedman; Anexo 5B y 5C). Juntos, estos resultados muestran que la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales, a través de la activación de los DREADDs excitatorios hM3Dq expresados en estas células, resultan en un aumento sustancial de la actividad electrofisiológica hipocampal, que es dependiente de la dosis de CNO administrada. Por otro lado, muestran que la administración intracerebroventricular de 10  $\mu$ g de CNO ejerce los efectos más gruesos sobre la excitabilidad hipocampal.

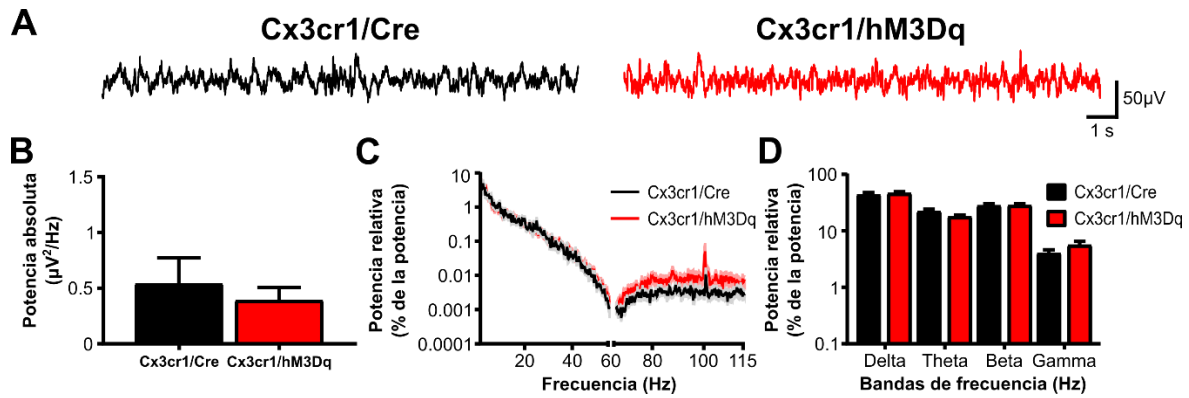




Anexo 5. Caracterización del efecto de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales sobre la actividad electrofisiológica hipocampal en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica antes y después de la administración intracerebroventricular de CNO a diferentes dosis (10 ng, 100 ng, 1 µg y 10 µg) en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. Las flechas indican el inicio de la administración de CNO. B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica hipocampal después de la administración de CNO a diferentes dosis en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq (n = 6). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad electrofisiológica hipocampal después de la administración de CNO a diferentes dosis en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). Nótese que la administración de CNO produce un incremento de la actividad electrofisiológica hipocampal que es dependiente de la dosis de CNO administrada. \*\* denota una diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.01$ , comparado contra la actividad electrofisiológica basal previa a la administración intracerebroventricular de CNO. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Friedman. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

## **Anexo 6 – Caracterización de la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.**

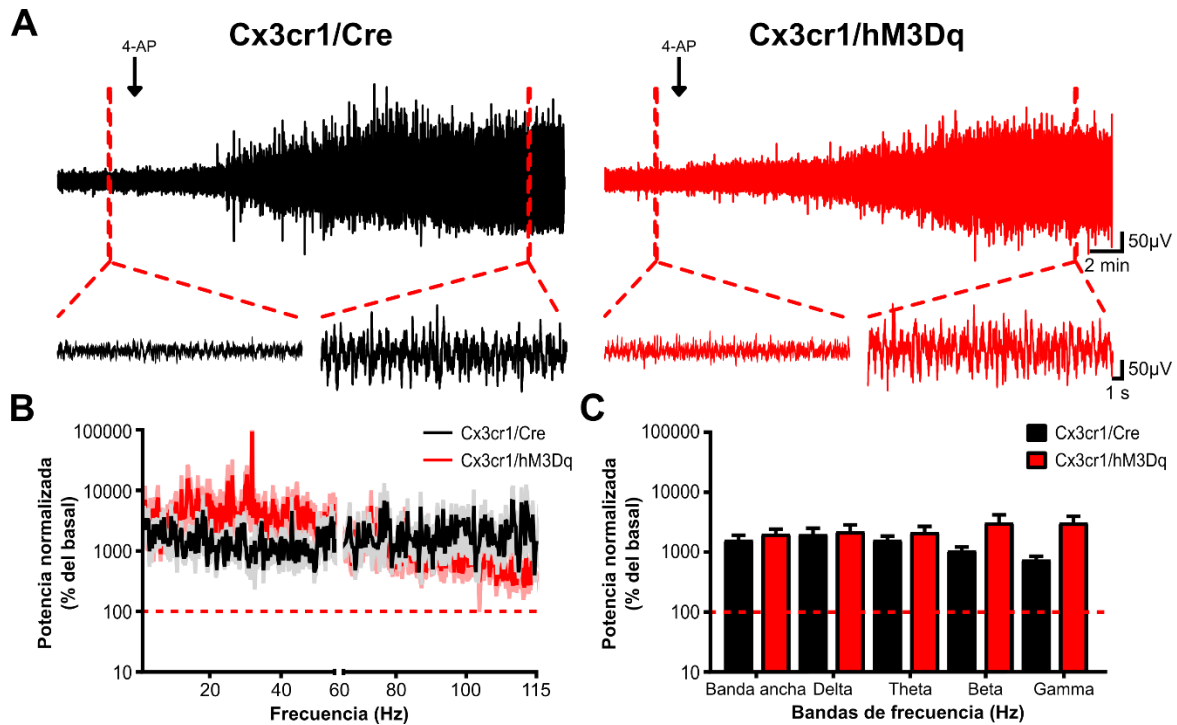
Con la finalidad de caracterizar la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, se analizó la actividad electrofisiológica basal y se comparó con la de los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre. La actividad electrofisiológica basal del hipocampo de los animales de ambas cepas se caracterizó por la presencia de actividad rítmica lenta (anexo 6), típica de la anestesia inducida con uretano (Krami et al., 1975; Wolansky et al., 2006). El análisis de la potencia absoluta en la banda ancha de 1-115 Hz no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $0.5 \pm 0.2 \mu V^2/Hz$ ;  $n = 6$ ; Anexo 6B) y Cx3cr1/hM3Dq ( $0.3 \pm 0.1 \mu V^2/Hz$ ;  $n = 6$ ;  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis; Anexo 6B). De la misma forma, el análisis de la potencia relativa de la actividad electrofisiológica basal del hipocampo no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas entre los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre (Delta =  $44.4 \pm 3.7$  % de la potencia; Theta =  $22.8 \pm 1.7$  % de la potencia; Beta =  $28.5 \pm 2.4$  % de la potencia; Gamma =  $4.1 \pm 0.6$  % de la potencia;  $n = 6$ ; Anexo 6C y 6D) y los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq (Delta =  $47.2 \pm 2.8$  % de la potencia,  $p > 0.1$ ; Theta =  $18.2 \pm 1.1$  % de la potencia,  $p > 0.1$ ; Beta =  $28.8 \pm 1.7$  % de la potencia,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $5.7 \pm 0.9$  % de la potencia;  $n = 6$ ;  $p > 0.1$ ; prueba de Kruskal-Wallis; Anexo 6C y 6D). Juntos, estos resultados indican que la capacidad para generar actividad oscilatoria rítmica, característica del circuito hipocampal (Kramis et al., 1975; Buzsáki et al., 2003), no se ve alterada con la expresión constitutiva de los DREADDs excitatorios hM3Dq en los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.



Anexo 6. Caracterización de la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. A. Trazos representativos de la actividad electrofisiológica hipocampal basal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. B. Cuantificación de la potencia absoluta ( $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ), en la banda ancha de 1-115 Hz, de la actividad electrofisiológica del hipocampo de animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $n = 6$ ) y Cx3cr1/hM3Dq ( $n = 6$ ). C. Espectrogramas de la potencia relativa (% de la potencia) de la actividad electrofisiológica hipocampal basal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. D. Cuantificación de la potencia relativa (% de la potencia) de la actividad electrofisiológica basal del hipocampo de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). Nótese que la expresión constitutiva de la proteína hM3Dq no afecta la actividad electrofisiológica basal del hipocampo en los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

## **Anexo 7 – Caracterización de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.**

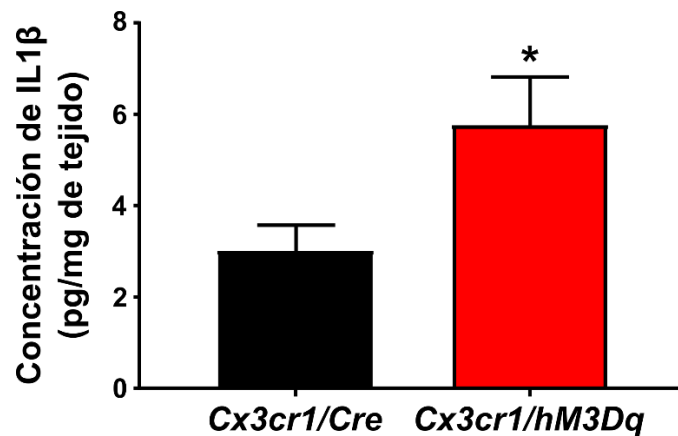
Con el objetivo de caracterizar la actividad epileptiforme inducida con 4-AP en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, se administró 4-AP (20 mg/kg, i.p.) de forma sistémica y posteriormente se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica hipocampal durante 30 minutos (Anexo 7A). La administración sistémica de 4AP (20 mg/kg, i.p.) en animales anestesiados de la cepa control Cx3cr1/Cre produjo la aparición de hiperexcitabilidad hipocampal, caracterizada por un aumento sustancial de la amplitud de la actividad electrográfica y por la presencia de espigas epileptiformes (Anexo 7A), reflejándose en un aumento de la potencia de la actividad electrofisiológica en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $1607.5 \pm 322.4$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Delta =  $1997.1 \pm 529.9$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Theta =  $1606.4 \pm 157.1$  % del basal,  $p < 0.001$ ; Beta =  $1068.35 \pm 157.1$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Gamma =  $752.1 \pm 108.4$  % del basal,  $p < 0.05$ ;  $n = 6$ ; prueba de Friedman; Anexo 7B y 7C), comparado con la actividad electrofisiológica basal previa a la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Asimismo, la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq resultó en un patrón electrográfico de hiperexcitabilidad hipocampal similar al mostrado por los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre (Anexo 7A). El análisis de la potencia de la hiperexcitabilidad hipocampal de los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $2025.7 \pm 411.1$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $2219.0 \pm 661.3$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta =  $2156.0 \pm 552.7$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $3117.4 \pm 1099.1$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $3102.1 \pm 893.3$  % del basal,  $p > 0.1$ ;  $n = 6$ ; prueba de Kruskal-Wallis; Anexo 7B y 7C), con respecto a la actividad epileptiforme de los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre. Estos resultados indican que la expresión de los DREADDs excitatorios hM3Dq en la microglía y en los macrófagos no parenquimales no altera la capacidad del circuito hipocampal para producir hiperexcitabilidad.



Anexo 7. Caracterización de la inducción de hiperexcitabilidad hipocámpal con 4-AP de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica basal y de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. Las flechas indican el inicio de administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 15-20 minutos después de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.; trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la hiperexcitabilidad hipocámpal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre (n = 6) y Cx3cr1/hM3Dq (n = 6). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la actividad epileptiforme hipocámpal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). Nótese que la expresión constitutiva de la proteína hM3Dq no afecta la inducción de hiperexcitabilidad hipocámpal con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba de Kruskal-Wallis y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

## Anexo 8 – Caracterización de la expresión proteica de IL1 $\beta$ hipocampal después de la administración intracerebroventricular de CNO en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM3Dq.

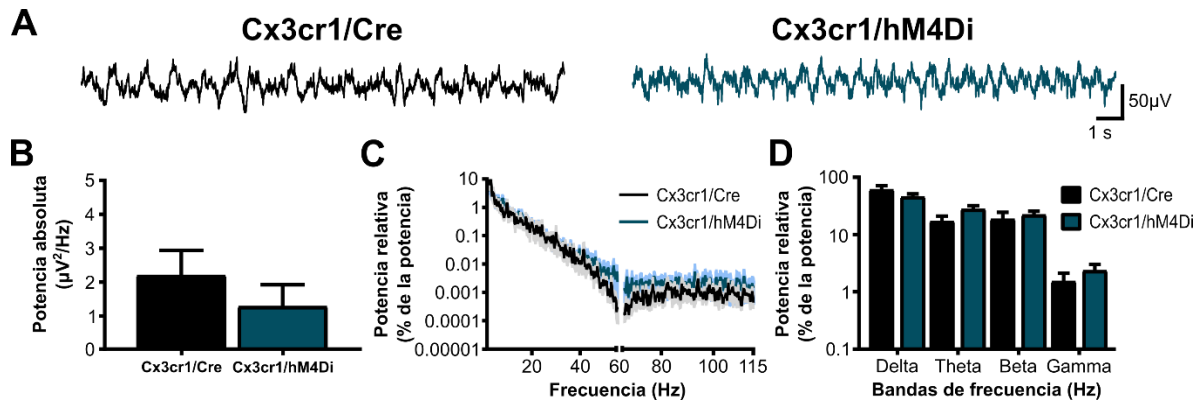
Con el fin de caracterizar los niveles de la citocina proinflamatoria IL1 $\beta$  en el hipocampo después de la activación quimiogénica de la microglía y de los macrófagos no parenquimales en animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq, se realizó la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM3Dq. Aproximadamente 60 min después de la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g), se extrajo el hipocampo de los animales y posteriormente se cuantificó la concentración de IL1 $\beta$  de cada muestra mediante ELISA (anexo 8). El análisis de los niveles de IL1 $\beta$  hipocampal mostró que la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) aumentó ligeramente la concentración de IL1 $\beta$  hipocampal en los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq ( $5.7 \pm 1.0$  pg/mg de tejido;  $p < 0.05$ ;  $n = 6$  animales), en comparación con animales la cepa control Cx3cr1/Cre ( $3.0 \pm 0.5$  pg/mg de tejido;  $n = 6$  animales).



Anexo 8. Caracterización de la expresión proteica de IL1 $\beta$  hipocampal después de la administración intracerebroventricular de CNO (10  $\mu$ g) en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre ( $n = 6$  animales) y Cx3cr1/hM4Di ( $n = 6$  animales). Nótese que la administración de CNO (10  $\mu$ g) incrementó ligeramente los niveles de IL1 $\beta$  hipocampal en los animales de la cepa Cx3cr1/hM3Dq. \* denota una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con  $p < 0.05$ . La comparación estadística se llevó a cabo con la prueba t de Student. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

## **Anexo 9 – Caracterización de la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di.**

Con el objetivo de caracterizar la actividad electrofisiológica hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di, la actividad electrofisiológica basal fue analizada y comparada con la de los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre. La actividad electrofisiológica basal del hipocampo de los animales de ambas cepas se caracterizó por la presencia de actividad rítmica lenta (anexo 9A), típica de la anestesia inducida con uretano (Krami et al., 1975; Wolansky et al., 2006). El análisis de la potencia absoluta en la banda ancha de 1-115 Hz no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $2.1 \pm 0.7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ;  $n = 6$ ; Anexo 7B) y Cx3cr1/hM4Di ( $1.2 \pm 0.6 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ,  $p > 0.1$ ;  $n = 6$ ; prueba ANOVA de una vía; Anexo 9B). De la misma forma, el análisis de la potencia relativa de la actividad electrofisiológica basal del hipocampo no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas entre los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre (Delta =  $62.1 \pm 10.5$  % de la potencia; Theta =  $17.3 \pm 4.1$  % de la potencia; Beta =  $18.9 \pm 6.0$  % de la potencia; Gamma =  $1.5 \pm 0.5$  % de la potencia;  $n = 6$ ; Anexo 9C y 9D) y los animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di (Delta =  $46.5 \pm 5.6$  % de la potencia,  $p > 0.1$ ; Theta =  $28.3 \pm 4.2$  % de la potencia,  $p > 0.1$ ; Beta =  $22.6 \pm 3.4$  % de la potencia,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $2.4 \pm 0.6$  % de la potencia,  $p > 0.1$ ;  $n = 6$ ; prueba ANOVA de una vía; Anexo 9C y 9D). Juntos, estos resultados indican que la capacidad para generar actividad oscilatoria rítmica, característica del circuito hipocampal (Kramis et al., 1975; Buzsáki et al., 2003), no se encuentra alterada con la expresión constitutiva de los DREADDs inhibitorios hM4Di en los animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di.

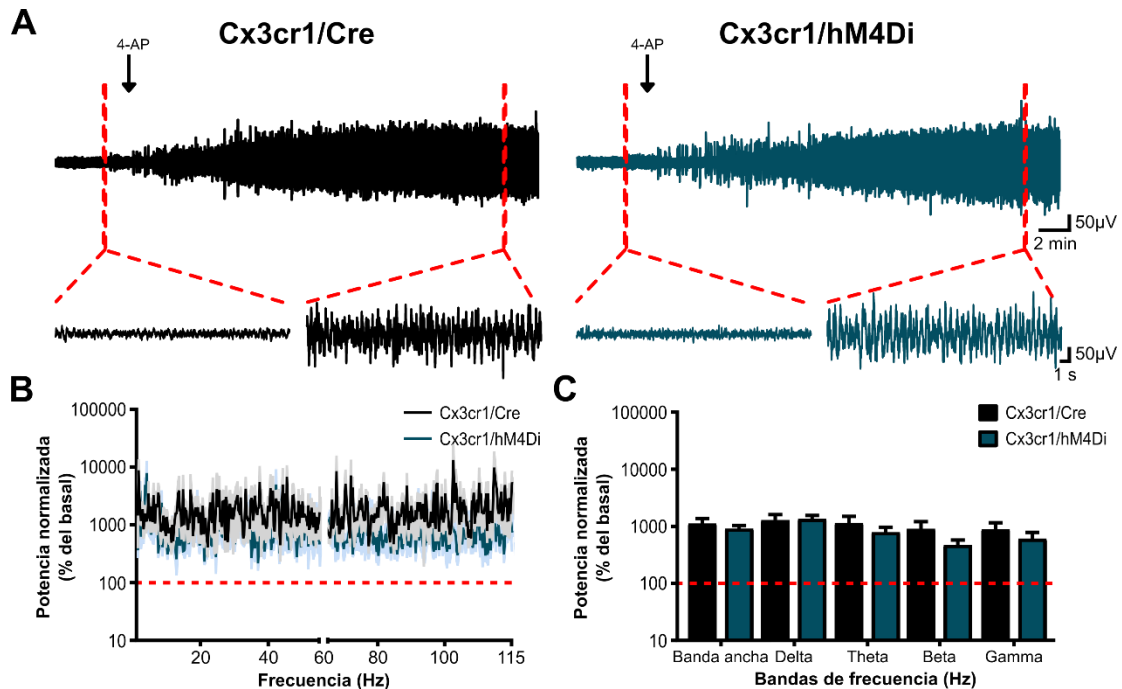


Anexo 9. Caracterización de la actividad electrofisiológica hipocámpal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di. A. Trazos representativos de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di. B. Cuantificación de la potencia absoluta ( $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ), en la banda ancha de 1-115 Hz, de la actividad electrofisiológica del hipocampo de animales de las cepas Cx3cr1/Cre ( $n = 6$ ) y Cx3cr1/hM4Di ( $n = 6$ ). C. Espectrogramas de la potencia relativa (% de la potencia) de la actividad electrofisiológica hipocámpal basal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di. D. Cuantificación de la potencia relativa (% de la potencia) de la actividad electrofisiológica basal del hipocampo de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). Nótese que la expresión constitutiva de la proteína hM4Di no afecta la actividad electrofisiológica basal del hipocampo en los animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba ANOVA de una vía y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.



## **Anexo 10 – Caracterización de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP en los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di.**

Con la finalidad de caracterizar la actividad epileptiforme inducida con 4-AP de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di, se administró 4-AP sistémicamente y se observaron sus efectos sobre la actividad electrofisiológica de los animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di. La administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en animales anestesiados de la cepa control Cx3cr1/Cre indujo la aparición de hiperexcitabilidad en el hipocampo, caracterizada por un aumento sustancial de la amplitud de la actividad electrográfica y por la presencia de espigas epileptiformes (Anexo 10A), reflejándose en un aumento significativo de la potencia de la actividad electrofisiológica en todas las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $1129.6 \pm 264.4$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Delta =  $1295.8 \pm 324.9$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Theta =  $1154.4 \pm 353.8$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Beta =  $915.2 \pm 305.7$  % del basal,  $p < 0.01$ ; Gamma =  $899.3 \pm 273.5$  % del basal,  $p < 0.01$ ;  $n = 6$ ; prueba de Friedman; Anexo 10B y 10C), en comparación con la actividad electrofisiológica basal previa a la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Por otro lado, la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di mostró un patrón de hiperexcitabilidad hipocampal similar al que mostraron los animales de la cepa control Cx3cr1/Cre (Anexo 10A). Asimismo, el análisis de la potencia de la hiperexcitabilidad hipocampal de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di no mostró diferencias significativas en ninguna de las bandas de frecuencia analizadas (Banda ancha =  $919.2 \pm 1573.3131.9$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Delta =  $1372.4 \pm 197.6$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Theta =  $797.9 \pm 179.0$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Beta =  $479.7 \pm 106.3$  % del basal,  $p > 0.1$ ; Gamma =  $617.6 \pm 177.3$  % del basal,  $p > 0.1$ ;  $n = 6$ ; prueba ANOVA de una vía; Anexo 10B y 10C), con respecto a la cepa control Cx3cr1/Cre. Estos resultados indican que la expresión de los DREADDs inhibitorios hM4Di en la microglía y en los macrófagos no parenquimales no altera la capacidad del circuito hipocampal para producir actividad epileptiforme.



Anexo 10. Caracterización de la hiperexcitabilidad hipocampal inducida con 4-AP de los animales anestesiados de la cepa Cx3cr1/hM4Di. A. Trazos representativos de larga duración de la actividad electrofisiológica basal y de la hiperexcitabilidad inducida con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en animales anestesiados de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di. Las flechas indican el inicio de administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.). Debajo, se observan trazos expandidos de la actividad electrofisiológica del hipocampo delimitada por la línea roja punteada, en condiciones basales (trazo de la izquierda) y 15-20 minutos después de la administración de 4-AP (20 mg/kg, i.p.; trazo de la derecha). B. Espectrogramas de la potencia normalizada (% del basal) de la hiperexcitabilidad hipocampal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre (n = 6) y Cx3cr1/hM4Di (n = 6). C. Cuantificación de la potencia normalizada (% del basal) de la hiperexcitabilidad hipocampal de animales de las cepas Cx3cr1/Cre y Cx3cr1/hM4Di en la banda ancha (1-115 Hz) y en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-115 Hz). Nótese que la expresión constitutiva de la proteína hM4Di no afecta la inducción de hiperexcitabilidad hipocampal con 4-AP (20 mg/kg, i.p.) en los animales de la cepa Cx3cr1/hM4Di. La potencia en las distintas bandas de frecuencia fue comparada con la prueba ANOVA de una vía y una corrección por comparaciones múltiples, a través de las bandas de frecuencia, con la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Los datos fueron graficados como la media  $\pm$  EEM.

## Anexo 11 – Publicaciones generadas durante mis estudios de doctorado.

- **Villasana-Salazar, B.**, Hernández-Soto, R., Guerrero-Gómez, M. E., Ordaz, B., Manrique-Maldonado, G., Salgado-Puga, K., & Peña-Ortega, F. (2020). Chronic intermittent hypoxia transiently increases hippocampal network activity in the gamma frequency band and 4-Aminopyridine-induced hyperexcitability in vitro. *Epilepsy Research*, 166, 106375. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2020.106375>
- Hernández-Soto, R., **Villasana-Salazar, B.**, Pinedo-Vargas, L., & Peña-Ortega, F. (2021). Chronic intermittent hypoxia alters main olfactory bulb activity and olfaction. *Experimental Neurology*, 340, 113653. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113653>
- Martínez-García, I., Hernández-Soto, R., **Villasana-Salazar, B.**, Ordaz, B., & Peña-Ortega, F. (2021). Alterations in piriform and bulbar activity/excitability/coupling upon amyloid- $\beta$  administration in vivo related to Olfactory dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease*, 82(s1), S19–S35. <https://doi.org/10.3233/JAD-201392>



# Chronic intermittent hypoxia transiently increases hippocampal network activity in the gamma frequency band and 4-Aminopyridine-induced hyperexcitability *in vitro*

Benjamín Villasana-Salazar, Rebeca Hernández-Soto, María Estefanía Guerrero-Gómez, Benito Ordaz, Guadalupe Manrique-Maldonado<sup>1</sup>, Karla Salgado-Puga<sup>2</sup>, Fernando Peña-Ortega\*

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, QRO 76230, México

## ARTICLE INFO

### Keywords:

4-Aminopyridine  
Chronic intermittent hypoxia  
Hippocampal network activity  
Epileptiform activity  
Reoxygenation

## ABSTRACT

Chronic intermittent hypoxia (CIH) is the most distinct feature of obstructive sleep apnea (OSA), a common breathing and sleep disorder that leads to several neuropathological consequences, including alterations in the hippocampal network and in seizure susceptibility. However, it is currently unknown whether these alterations are permanent or remit upon normal oxygenation. Here, we investigated the effects of CIH on hippocampal spontaneous network activity and hyperexcitability *in vitro* and explored whether these alterations endure or fade after normal oxygenation. Results showed that applying CIH for 21 days to adult rats increases gamma-band hippocampal network activity and aggravates 4-Aminopyridine-induced epileptiform activity *in vitro*. Interestingly, these CIH-induced alterations remit after 30 days of normal oxygenation. Our findings indicate that hippocampal network alterations and increased seizure susceptibility induced by CIH are not permanent and can be spontaneously reverted, suggesting that therapeutic interventions against OSA in patients with epilepsy, such as surgery or continuous positive airway pressure (CPAP), could be favorable for seizure control.

## 1. Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) is a chronic multifactorial disorder characterized by recurrent brief episodes of complete or partial collapse of the upper airway during sleep (Xie & Yung, 2012; Sforza & Roche, 2016). Chronic intermittent hypoxia (CIH), the principal consequence of OSA (Chiang, 2006; Xie & Yung, 2012; Rosenzweig et al., 2014; Sforza & Roche, 2016), leads to several neuropathological consequences, including cognitive impairment and structural and functional hippocampal network alterations (Chiang, 2006; Manni & Terzaghi, 2010; Xie & Yung, 2012; Rosenzweig et al., 2014; Cha et al., 2017; Peña-Ortega, 2016). OSA is commonly present in patients with drug-resistant epilepsy and aggravates the clinical course of this disorder, resulting in poor seizure control and a high risk of sudden unexpected death in epilepsy (Malow et al., 2000; Chihorek et al., 2007; Manni & Terzaghi, 2010; Nobili et al., 2011; Andersen et al., 2012; Segal et al., 2012).

CIH can be experimentally induced by exposing animals to recurrent brief episodes of moderate hypoxia (3–8% inspired O<sub>2</sub>), alternating with brief episodes of normoxia several hours a day for several days (Veasey et al., 2004; Del Rio et al., 2014; Navarrete-Opazo & Mitchell, 2014; Moraes & Machado, 2015; Sforza & Roche, 2016; Morgan et al., 2016). Experimentally induced CIH leads to diverse neuropathological features resembling OSA (Del Rio et al., 2014; Moraes & Machado, 2015; Sforza & Roche, 2016; Morgan et al., 2016), including cognitive impairment and hippocampal network activity alterations (Gozal et al., 2001; Wais et al., 2009; Cha et al., 2017; Khuu et al., 2019). In addition, it has been shown that hypoxia results in long-lasting neuropathological effects in neonatal animals (Mikati et al., 2005; Kanaan et al., 2005; Dylag et al., 2017), including augmented seizure susceptibility and epileptogenesis (Jensen et al., 1991, 1992; Björkman et al., 2010; Xie et al., 2010; Rakhade et al., 2011, 2012; Rodriguez-Alvarez et al., 2015). Moreover, Wais et al. (2009) showed that brief hypoxic episodes in adult rats induce seizures and augment hippocampal epileptiform activity *in vitro*.

**Abbreviations:** 4AP, 4-Aminopyridine; CIH, Chronic intermittent hypoxia; LFP, Local field potential; OSA, Obstructive sleep apnea; CPAP, continuous positive airway pressure; ReOx, Reoxygenation

\* Corresponding author.

E-mail address: [jfpena@unam.mx](mailto:jfpena@unam.mx) (F. Peña-Ortega).

<sup>1</sup> Present address: Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, United States.

<sup>2</sup> Present address: Department of Psychology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, United States.

<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2020.106375>

Received 2 December 2019; Received in revised form 21 April 2020; Accepted 28 May 2020

Available online 31 May 2020

0920-1211/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

However, the persistency, or reversibility, of the hippocampal network activity alterations and the increased seizure susceptibility induced by CIH remain unknown (Xie & Yung, 2012). Here, we investigated the effects of CIH on hippocampal spontaneous network activity and 4-Aminopyridine (4AP)-induced hyperexcitability *in vitro* and explored whether these alterations are permanent or remit after normal oxygenation. Results showed that experimentally induced CIH for 21 days alters hippocampal network activity in the gamma band and aggravates 4AP-induced epileptiform activity in adult rat hippocampal slices. In addition, our results demonstrate that CIH-induced hippocampal network alterations and pro-epileptiform effects are spontaneously reverted after normal oxygenation (reoxygenation, ReOx).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Twenty-two male Wistar rats (6-8 weeks old, 150-200 g) were obtained from the animal facility at the Institute of Neurobiology, Universidad Nacional Autónoma de México (INB-UNAM) and housed in collective cages (4 animals/cage) at the Behavioral Analysis Unit (BAU; INB-UNAM) under standard *vivarium* conditions (22-23 °C, 12-h light/dark cycle), with food and water *ad libitum*. All the experiments were conducted in accordance with the Official Mexican Standard published by México's Ministry of Agriculture (SAGARPA NOM-062-ZOO-1999) and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). In addition, all experiments were approved by the Bioethics Committee of the INB-UNAM. Only the minimal and necessary number of animals were used in this study.

### 2.2. Chronic intermittent hypoxia

CIH was induced as previously reported (Moraes & Machado, 2015), but with slight modifications (Fig. 1). Animals in collective cages (4 animals/cage) were introduced daily into Plexiglas chambers (76 cm x 51 cm x 51 cm) equipped with gas injectors and O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, humidity and temperature sensors (BioSpherix, NY, USA) (Fig. 1A). There, animals were subjected to intermittent 5-min of N<sub>2</sub> injection to induce hypoxic episodes of 40-50 seconds (5-7% inspired O<sub>2</sub>) (Fig. 1B). After each hypoxia episode, O<sub>2</sub> was injected for 5-min to return to normoxia (21-22% inspired O<sub>2</sub>) (Moraes & Machado, 2015) (Fig. 1B). Gas injectors were controlled with an OxyCycler system (A420C, BioSpherix). This CIH protocol was conducted daily for 8 hours (from 10:00 h to 18:00 h) during the light phase of the cycle and lasted 21 days. This CIH period induces major pathological changes at different levels and locations (Del Rio et al., 2014; Morgan et al., 2016), which cannot be achieved by shorter CIH periods (Del Rio et al., 2014; Morgan et al., 2016), and which include changes in neuronal excitability and responsiveness to

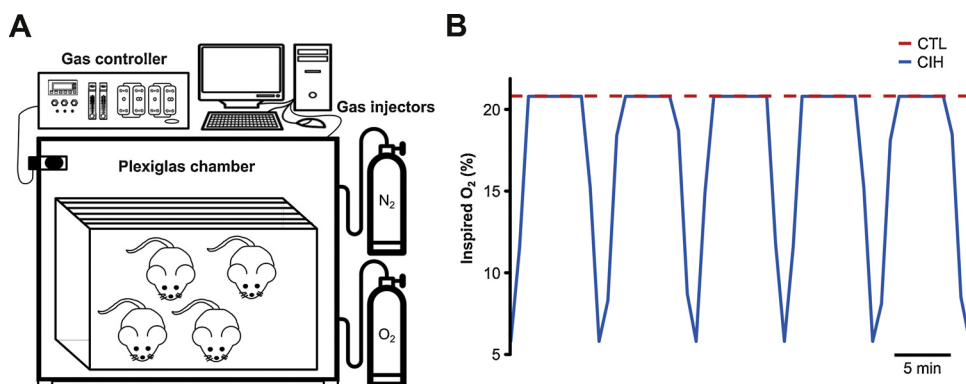
challenging conditions (Veasey et al., 2004; Del Rio et al., 2014; Morgan et al., 2016). To investigate the reversibility of the CIH effects, independent groups of animals were subjected to CIH for 21 days (Fig. 1), followed by normoxia for 30 days (ReOx), while animals breathed room air (21-22% inspired O<sub>2</sub>) at the BAU-INB-UNAM. Each CIH animal group was matched with a littermate independent control group (CTL). CTL animals in collective cages (4 animals/cage) were simultaneously introduced into the same Plexiglas chambers but breathed normoxic air (21-22% O<sub>2</sub>). The animals' weight and survival were constantly monitored during the CIH protocol.

### 2.3. Preparation of hippocampal slices

Hippocampal slices were obtained as previously described (Peña & Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019). Briefly, animals were euthanized with an injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg, ip; PiSa, México) and perfused transcardially with a cold protective sucrose solution (composition (in mM): 238 sucrose, 3 KCl, 2.5 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, and 30 D-glucose, pH 7.4), bubbled with carbogen (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>). The brain was subsequently removed and dissected in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF; composition (in mM): 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, and 30 D-glucose, pH 7.4) and bubbled with carbogen. Both hemispheres were glued and mounted onto an agar block with a 30° angle inclination. Sagittal slices (400 μm thick) containing the ventral hippocampus and the entorhinal cortex were obtained using a vibratome (Microm HM 650 V, Thermo Scientific, IL, USA). These slices preserve all the connections of the trisynaptic pathway and thus the output from hippocampus to the entorhinal cortex; allowing sustained reverberatory epileptiform activity to be efficiently induced and recorded (Perreault & Avoli, 1991; Barbarosie & Avoli, 1997; Panuccio et al. 2010). Slices were left to recover at room temperature for at least 60 min before any further experimental manipulation.

### 2.4. Electrophysiological recordings and 4AP-induced epileptiform activity

Slices were transferred to a submerged recording chamber that was continuously perfused at 15-17 ml/min with aCSF bubbled with carbogen and maintained at 30-32 °C. Local field potential (LFP) recordings were obtained using borosilicate electrodes (< 1MΩ) filled with aCSF and positioned on the pyramidal layer of the hippocampal CA1 region (Peña & Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019), which render LFPs in the order of μV (Peña & Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019), in contrast to the LFPs recorded in the order of mV with electrodes with resistance higher than 2MΩ (Perreault & Avoli, 1991; Barbarosie & Avoli, 1997; Panuccio et al., 2010). Basal hippocampal LFP was recorded for 30 min before 4AP (100 μM) was added to the bath (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and its effects were continuously recorded for 1 h. 4AP is a K<sup>+</sup> channel blocker that



**Fig. 1.** Chronic intermittent hypoxia (CIH) protocol. A. Scheme of the set up required to apply CIH into a Plexiglas chamber. The chamber for normoxic conditions was not included. The animals were introduced to one of those chambers, where either intermittent hypoxia or normoxia was present for 8 hrs/day for 21 days. B. Representative traces of inspired O<sub>2</sub> levels during a typical application of the chronic intermittent hypoxia (CIH, blue trace) or normoxia (CTL, red-dotted trace) protocols. Note that intermittent hypoxia consisted of intermittent 5-min of N<sub>2</sub> injection to induce hypoxic episodes of 40-50 seconds (5-7% inspired O<sub>2</sub>). After each hypoxic episode, O<sub>2</sub> was injected for 5-min to return to normoxia (21-22% inspired O<sub>2</sub>).

produces persistent epileptiform activity in hippocampal slices (Perreault & Avoli, 1991; Barbarosie & Avoli, 1997; Jensen et al., 1998; Avoli et al., 2002; Peña & Alavez-Pérez, 2006; Panuccio et al., 2010; Alcantara-Gonzalez et al., 2019). Finally, lidocaine (1 mM) was added to the bath to test the slice's viability and the neuronal nature of the recorded LFP (Peña & Alavez-Pérez, 2006, Alcantara-Gonzalez et al., 2019). Electrophysiological recordings were amplified, filtered (including a notch filter around 60 Hz; Grass Instruments Co., MA, USA) and digitized at 2 kHz through a TL-2 interface (Axon Instruments Inc., CA, USA).

### 2.5. Data analysis and statistics

Recordings were analyzed using Clampfit (v.10.7, Molecular Devices, CA, USA). The individual responsible for this analysis was blinded to the experimental group to which each and all of the recordings belonged to. A power spectrum analysis was performed on three randomly selected periods (20 s each) by means of the fast Fourier transform (FFT) algorithm (4096 frequency points and 0.224 Hz spectral resolution, Hamming window with 50% overlap). Relative power values from basal hippocampal LFP were calculated for each frequency as the percent of their own power from the total power in the 1-115 Hz broadband and were expressed as % of power (Magdaleno-Madrigal et al., 2019; Alcantara-Gonzalez et al., 2019). Then, the relative power spectrum was segmented in the following frequency bands: delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) and gamma (30-115 Hz). To evaluate the change in power during 4AP-induced epileptiform activity, the absolute power values were averaged for the 1-115 Hz frequency band before (defined as "basal" -pre 4AP-) and after 4AP administration, for each experiment. Analyses excluded the alternating current-related noise frequency band (55-65 Hz), due to the use of a notch filter. The mean power of each basal recording was set as 100%, and the activity in the presence of 4AP was calculated as % of basal for each experiment. Representative time-frequency spectrograms were obtained with a customized routine in MATLAB (R2015a, Mathworks, MA, USA) based on the *spectrogram.m* function (Pardo-Peña et al., 2018; Magdaleno-Madrigal et al., 2019). In the graphic representations, a hiatus around 60 Hz both in the spectrograms and the power spectra was included due to the use of a 60 Hz notch filter.

The collected data exhibited a non-normal distribution, which was evaluated with the Kolmogorov-Smirnov normality test. Thus, non-parametric statistical comparisons were carried out with the Kruskal-Wallis test followed by the two-stage step-up method of Benjamini, Krieger and Yekutieli test, to correct for multiple comparisons. Fisher's exact test and Mann-Whitney test were used to compare proportion data and body weight changes, respectively. Spearman's correlation was used to correlate relative power in the gamma band of the basal hippocampal network activity and the 4AP-induced epileptiform activity normalized power. A non-linear log-log fitting function was used for pairwise graphic correlations. Prism software (v.8.0.2, GraphPad, CA, USA) was used for statistical analysis. Significance threshold was set at  $p < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## 3. Results

### 3.1. Weight loss and mortality during the chronic intermittent hypoxia protocol

Despite starting at the same body weight (CTL =  $155.6 \pm 3.7$  g, CIH =  $154.2 \pm 5.2$  g, MW = 204.5, df = 20,  $p > 0.1$ ), animals that underwent the 21 days CIH protocol gained slightly less body weight (CIH =  $258.0 \pm 3.0$  g; 167.3% of day one) than CTL animals ( $273.9 \pm 4.1$  g; 176.0 % of day one, MW = 96, df = 20,  $p < 0.01$ , Table 1). CIH-induced weight loss has also been observed in adult mice exposed to CIH (Siqués et al., 2006; Jun et al., 2010) and neonatal mice exposed to

**Table 1**

Effects of chronic intermittent hypoxia (CIH) on body weight and mortality rate.

	CTL	CIH	Statistics
Initial body weight	$155.6 \pm 1.7$ g	$154.2 \pm 5.2$ g	$p = 0.24$ (MW = 204.5, df = 20)
Final body weight	$273.9 \pm 4.1$ g	$258 \pm 3.0$ g	$p < 0.001$ (MW = 96, df = 20)
Mortality rate	0 % (0/8 animals)	16 % (2/14 animals)	$p < 0.001$

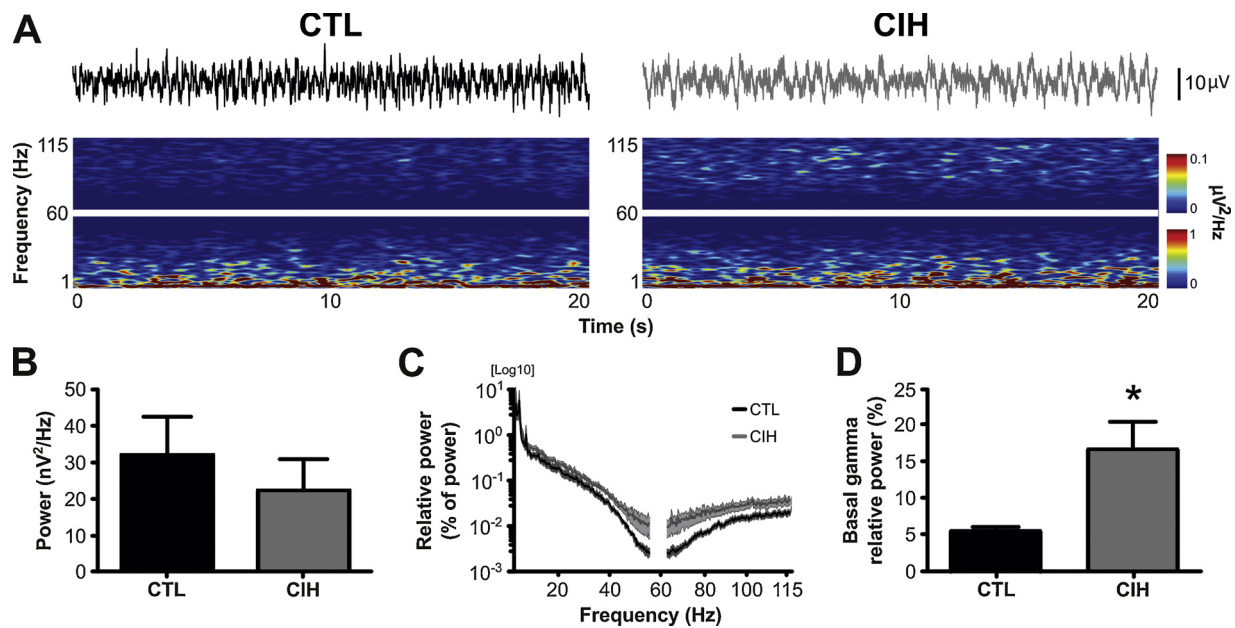
brief hypoxia (Rodríguez-Alvarez et al., 2015), which has been associated with a decreased food intake (Siqués et al., 2006; Jun et al., 2010). In addition, 16% of animals that underwent the CIH protocol died of unknown causes during the intermittent hypoxia periods (2/14 animals), whereas none of the CTL animals died (0/8 animals,  $p < 0.001$ , Table 1). This mortality rate is similar to the one reported by other groups in immature and juvenile rats exposed to brief hypoxia (Moshé & Albala, 1985; Jensen et al., 1992; Owens et al., 1997; Rodríguez-Alvarez et al., 2015; Morand et al., 2018), or adult rats exposed to chronic intermittent hypobaric hypoxia (Siqués et al., 2006). Despite that developmental differences in sensitivity to hypoxia may influence the phenomenon, this mortality may be related to the induction of seizures (Wais et al., 2009; Rodríguez-Alvarez et al., 2015), weight loss or increase in the hematocrit (Siqués et al., 2006) and/or ventricular arrhythmias and sudden cardiac death (Morand et al., 2018). However, we did not specifically look or measured these types of changes.

### 3.2. Chronic intermittent hypoxia alters hippocampal network activity in the gamma frequency band and aggravates 4AP-induced epileptiform activity

After 21 days of CIH or normoxic protocols, animals were euthanized, and their hippocampal network activity was recorded *in vitro* (Fig. 2A). Power spectrum analysis of basal hippocampal network activity showed no difference in the mean absolute power, in the 1-115 Hz frequency broadband, between groups (CTL =  $32.2 \pm 10.0$  nV<sup>2</sup>/Hz, n = 14 slices from 5 animals; CIH =  $22.6 \pm 8.0$  nV<sup>2</sup>/Hz, n = 18 slices from 8 animals, KW = 123.4, df = 9,  $p > 0.1$ , Fig. 2B), demonstrating that CIH seems not to produce a generalized change in hippocampal network activity. However, basal relative power spectra exhibit a significant increase at the gamma frequency band (30-115 Hz) in CIH-treated animals ( $16.8 \pm 3.6$  % of power) compared to the CTL group ( $5.7 \pm 0.4$  % of power, KW = 60.5, df = 7,  $p < 0.05$ , Fig. 2C and D). There were no statistical differences in delta (1-4 Hz;  $p > 0.1$ ), theta (4-10 Hz;  $p > 0.1$ ) and beta (10-30 Hz;  $p > 0.1$ ) frequency bands relative power between groups (Fig. 2C).

Application of 4AP to the perfusion bath induces sustained epileptiform activity *in vitro* (Perreault & Avoli, 1991; Peña & Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019), which is characterized, in our experimental conditions, by interictal-like activity during the first hour (Peña & Alavez-Pérez, 2006). In our experimental conditions, longer 4AP presence is required to induce ictal-like activity in control slices (Peña & Alavez-Pérez, 2006). In slices recorded in an interface chamber this latency for 4AP-induced ictal-like activity is shorter (Perreault & Avoli, 1991; Barbarosie & Avoli, 1997; Panuccio et al., 2010). Thus, in hippocampal slices obtained from the CTL group, recorded in a submerged chamber, the 4AP-induced epileptiform activity was characterized, during the evaluated first hour, by recurrent high-amplitude paroxysmal spikes (Fig. 3A), also called interictal-like activity (Perreault & Avoli, 1991; Peña & Alavez-Pérez, 2006; Alcantara-Gonzalez et al., 2019). In contrast, 4AP-induced epileptiform activity, in a third of the hippocampal slices (6/18 slices), obtained from 63% of CIH animals (5/8 animals), showed an exacerbated epileptiform activity pattern defined in the literature as ictal-like activity (Barbarosie &





**Fig. 2.** Chronic intermittent hypoxia (CIH) alters basal hippocampal network activity in the gamma frequency band. A. Representative traces (top) and spectrograms (bottom) of basal hippocampal network activity in slices obtained from animals subjected to normoxic room air conditions (CTL) or CIH for 21 days. B. Quantification of the mean absolute power (1-115 Hz) of the basal hippocampal network activity of CTL and CIH groups. C. Mean relative power spectra (as % of power) of CTL and CIH groups. The thicker and darker line represents the mean, while the clearer shadow, flanked by thinner lines, represents the SEM. Note that the relative gamma is higher in the CIH group. D. Quantification of basal gamma relative power (30-115 Hz) of CTL and CIH groups. Note that CIH increases the relative power at the gamma frequency band. Data are presented as mean ± SEM. Spectrograms and power spectra show a hiatus around 60 Hz due to the notch filter used during recordings. \* denotes a significant difference against CTL,  $p < 0.05$ .

Avoli, 1997; Jensen et al., 1998; Avoli et al., 2002; Peña & Alavez-Pérez, 2006; Panuccio et al., 2010), which is characterized by recurrent bursts of high-frequency and high-amplitude paroxysmal spikes followed by a postictal depression (Fig. 3A). Thus, 33.3 % of the slices obtained from CIH animals presented ictal-like activity, whereas none of the slices obtained from CTL animals exhibited this epileptiform pattern (0/14 slices from 5 animals,  $p < 0.05$ , Fig. 3B). Analysis of the power spectrum during 4AP-induced epileptiform activity (normalized to basal activity; in each experiment; i.e. pre 4AP application; set as 100%), in the 1-115 Hz frequency broadband, showed that the increase in power during epileptiform activity is dramatically higher in slices obtained from CIH animals (to  $99.4 \pm 64.5 \times 10^3$  % of basal;  $n = 18$ ) compared to slices obtained from the CTL group (to  $2.2 \pm 0.6 \times 10^3$  % of basal;  $n = 14$ , KW = 58.7, df = 9,  $p < 0.05$ , Fig. 3C), when the CIH group included all the tested slices, mixing the slices that generated interictal-like activity with those that generated ictal-like activity in the presence of 4AP ( $n = 18$  slices, Fig. 3C). The statistical difference between groups remained significant when compared the normalized power of the CTL slices with the normalized power only of the slices obtained from CIH animals that exhibited either interictal-like activity ( $138.8 \pm 89.9 \times 10^3$  % of basal,  $n = 12$  slices, KW = 54.3, df = 9,  $p < 0.01$ ) or ictal-like activity ( $34.3 \pm 29.4 \times 10^3$  % of basal,  $n = 6$  slices, KW = 33, df = 9,  $p < 0.05$ ). Finally, we found no difference in the normalized power of the slices obtained from CIH animals that exhibited either interictal-like activity ( $138.8 \pm 89.9 \times 10^3$  % of basal,  $n = 12$  slices) or ictal-like activity ( $34.3 \pm 29.4 \times 10^3$  % of basal,  $n = 6$  slices, KW = 34.5, df = 9,  $p > 0.1$ ).

In order to evaluate a possible relation between the gamma band relative power during basal hippocampal network activity and the 4AP-induced epileptiform activity power (normalized to basal activity -pre 4AP), in the 1-115 Hz frequency band, a correlation analysis was performed. Gamma band relative power during basal hippocampal network activity slightly correlated with the 4AP-induced epileptiform activity power change in slices obtained from the CTL and CIH groups ( $r = 0.42$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 3D).

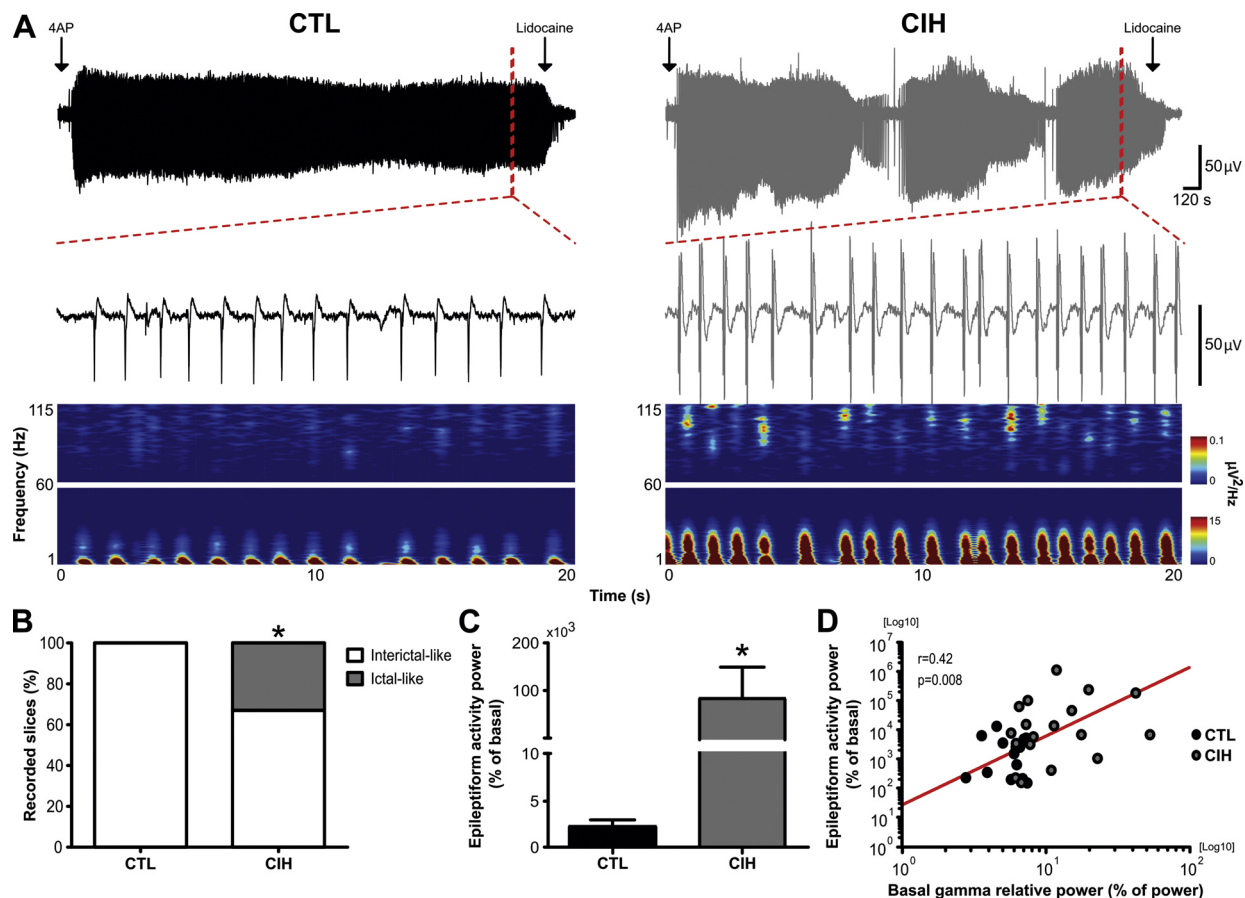
### 3.3. Reoxygenation reverses the changes in hippocampal network activity induced by chronic intermittent hypoxia

To investigate the preservation of the CIH-induced alterations in hippocampal network activity, independent groups of animals were exposed to the same CIH or normoxic protocols but followed by 30 days of ReOx (breathing room air). Then, hippocampal network activity was recorded in slices obtained from CTL + ReOx and CIH + ReOx animals (Fig. 4A). Basal hippocampal network activity showed no difference in the mean absolute power between groups (CTL + ReOx =  $41.9 \pm 19.4$  nV<sup>2</sup>/Hz,  $n = 11$  slices from 3 animals; CIH + ReOx =  $31.2 \pm 7.7$  nV<sup>2</sup>/Hz,  $n = 13$  slices from 4 animals, KW = 92.96, df = 9,  $p > 0.1$ , Fig. 4B). Also, relative power spectrum of their basal hippocampal network activity showed no differences between groups in any of the analyzed frequency bands ( $p > 0.1$ , Fig. 3C), including the gamma band (CTL + ReOx =  $5.9 \pm 1.4$  % of power, CIH + ReOx =  $5.7 \pm 1.0$  % of power, KW = 63.8, df = 7,  $p > 0.1$ , Fig. 4D).

Bath application of 4AP induced interictal-like epileptiform activity in all the slices obtained from CTL + ReOx and CIH + ReOx animals (CTL + ReOx = 11/11 slices, CIH + ReOx = 13/13 slices,  $p > 0.1$ , Fig. 5A and B). No ictal-like activity was observed in any of these slices. Power spectrum analysis during 4AP-induced epileptiform activity showed no difference between groups in the 1-115 Hz frequency broadband (CTL + ReOx =  $15.0 \pm 7.6 \times 10^3$  % of basal, CIH + ReOx =  $23.1 \pm 10.5 \times 10^3$  % of basal, KW = 14.3, df = 9,  $p > 0.1$ , Fig. 5C). Finally, correlation analysis showed no significant association between gamma band relative power during basal hippocampal network activity and the 4AP-induced epileptiform activity normalized power (% of basal activity; -pre 4AP-), while including CTL + ReOx and CIH + ReOx groups ( $r = -0.02$ ,  $p > 0.1$ , Fig. 5D).

## 4. Discussion

OSA is commonly present in patients with drug-resistant epilepsy (Höllinger et al., 2006; Li et al., 2012), suggesting that long-term



**Fig. 3.** 4-Aminopyridine (4AP)-induced hippocampal epileptiform activity is exacerbated by chronic intermittent hypoxia (CIH). **A.** Long-lasting representative traces (top) of the epileptiform activity induced by 4AP in hippocampal slices obtained from animals subjected to normoxic room air conditions (CTL) or CIH for 21 days. The arrows indicate the beginning of bath application of 4AP and lidocaine. Shorter samples of epileptiform activity (middle), delimited by the red dotted lines, and their spectrograms (bottom) are also shown. Note that slices obtained from CIH-treated animals exhibit ictal-like epileptiform activity, in contrast to slices obtained from CTL animals that only exhibit interictal-like epileptiform activity. **B.** Quantification of the proportion of recorded slices exhibiting either interictal-like or ictal-like epileptiform activity induced by 4AP in CTL and CIH groups. Note that only slices obtained from CIH animals show ictal-like epileptiform activity pattern. **C.** Quantification of the 4AP-induced epileptiform activity mean power (as % of basal) in the 1-115 Hz frequency band in CTL and CIH groups, including both interictal-like and ictal-like epileptiform activity. **D.** Correlation of basal gamma relative power (as % of power) and 4AP-induced epileptiform activity power (as % of basal) from CTL (black circles) and CIH (gray circles) groups. A non-linear log-log function was fitted to the data (red line). Note that basal hippocampal gamma activity shows a slight positive correlation with the magnitude of the epileptiform activity. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Spectrograms show a hiatus around 60 Hz due to the notch filter used during recordings. \*denotes a significant difference against CTL,  $p < 0.05$ .

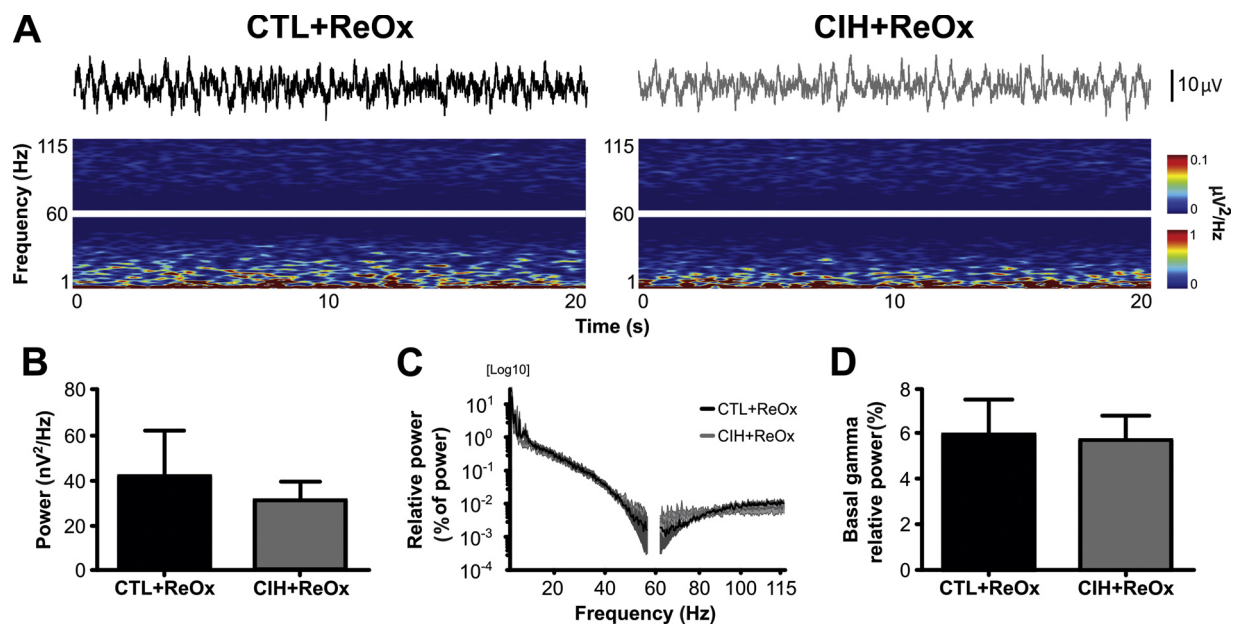
intermittent hypoxic episodes could be involved in epileptogenesis (Chihorek et al., 2007). Moreover, acute and repeated episodes of moderate hypoxia induce a long-term enhancement of brain excitability and increase seizure susceptibility (Wais et al., 2009; Björkman et al., 2010; Xie et al., 2010; Rakhade et al., 2011, 2012; Rodríguez-Alvarez et al., 2015). Here, we show that CIH, the most distinct feature of OSA (Chiang, 2006; Xie & Yung, 2012; Rosenzweig et al., 2014; Sforza & Roche, 2016), increases hippocampal network activity, specifically in the gamma frequency band, while enhancing epileptiform activity in adult rat hippocampal slices. Hippocampal gamma oscillations (30-120 Hz) have been involved in the coupling between distant and neighboring brain regions (Montgomery and Buzsáki, 2007; Buzsáki & Schomburg, 2015) and seem to rely on local inhibitory interneuron interactions (Hughes, 2008; Merchant et al., 2012; Keeley et al., 2017). Interestingly, hippocampal inhibitory neural networks seem to be altered after repeated hypoxic episodes in adult mice (Wais et al., 2009). In contrast, brief neonatal hypoxia exposure does not produce any long-term alteration in parvalbumin-positive (PV<sup>+</sup>) hippocampal inhibitory interneurons (Rodríguez-Alvarez et al., 2015; Fernando & Mody, 2015), which is the interneuron subpopulation mostly involved in the generation of gamma oscillations (Merchant et al., 2012). Our results suggest that hippocampal inhibitory network activity could be altered

as a consequence of CIH, which correlated with an increased susceptibility to epileptiform activity.

Enhanced gamma band activity has been observed in epileptic patients and epilepsy animal models in seizure-associated brain areas, mainly during pre-ictal periods (Hughes, 2008; de Curtis and Gnatkovsky, 2009). Interestingly, the increased gamma activity is related to the drug responsiveness in animal models of epilepsy (Maheshwari et al., 2016). Increased high-frequency hippocampal activity may reflect an ongoing epileptogenic process in animals subjected to CIH, similar to what has been observed in experimentally induced epilepsy (Jones et al., 2015).

The ictal-like epileptiform pattern observed here in hippocampal slices obtained from CIH-treated animals has also been observed in hippocampal slices obtained from adult animals previously exposed to brief hypoxia at P10 (Jensen et al., 1998) and may indicate an augmented excitability state of the hippocampal network during the epileptiform process. The ictal-like epileptiform pattern is very uncommon in hippocampal slices from healthy subjects (Jensen et al., 1998; Reyes-García et al., 2018), however, it is commonly observed in human hippocampal tissue resected from patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy (Reyes-García et al., 2018). Moreover, the ictal-like epileptiform activity pattern has been associated with aberrant activity of





**Fig. 4.** Alterations of basal hippocampal network activity in the gamma frequency band induced by chronic intermittent hypoxia (CIH) are reverted after reoxygenation (ReOx). **A.** Representative traces (top) and spectrograms (bottom) of basal hippocampal activity in slices obtained from animals subjected to normoxic room air conditions (CTL) or CIH for 21 days. In both cases, the treatments were followed by 30 days of reoxygenation (+ReOx). **B.** Quantification of the mean absolute power (1–115 Hz) of the basal hippocampal network activity of CTL + ReOx and CIH + ReOx groups. **C.** Mean relative power spectra (as % of power) of CTL + ReOx and CIH + ReOx groups. The thicker and darker line represents the mean, while the clearer shadow, flanked by thinner lines, represents the SEM. **D.** Quantification of basal gamma relative power (30–115 Hz) of CTL + ReOx and CIH + ReOx groups. Note that ReOx reverted the change in gamma activity induced by CIH. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Spectrograms and power spectra show a hiatus around 60 Hz due to the notch filter used during recordings.

hippocampal inhibitory interneurons (Fujiwara-Tsukamoto et al., 2004; Sessolo et al., 2015). Further studies will address whether CIH alters hippocampal inhibitory networks and its impact on epileptogenesis.

Brief perinatal hypoxia has been a reliable epilepsy model characterized by spontaneous electrographic and behavioral seizures and decreased seizure threshold throughout adulthood (Jensen et al., 1991, 1992; 1998; Sanchez et al., 2001; Björkman et al., 2010; Rakhade et al., 2011, 2012; Rodriguez-Alvarez et al., 2015), which resembles several aspects of seizure susceptibility and long-term consequences observed in pediatric patients with epilepsy (Murray et al., 2005; Kurinczuk et al., 2010). In addition, the presence of signs of hypoxic stress and of the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  in animals exposed to pilocarpine-induced *status epilepticus* indicates that seizures promote hypoxic conditions, which could aggravate the course of the hyperexcitability (Gualtieri et al., 2013). Similar to our findings, Wais and colleagues (2009) reported that repeated brief hypoxic episodes in adult mice induce epileptiform activity and hippocampal network alterations.

Here we show that CIH induces hippocampal network alterations in the gamma frequency band and pro-epileptiform effects that can be reverted upon ReOx, which coincides with the observation that many of the CIH-induced neuropathological effects are also transient (Harik et al., 1996; Kanaan et al., 2005), including hypoxia-induced hypervascularity and polycythemia. However, this contrasts with other hypoxia-induced pathological changes, including decreased myelination and increased expression of brain capillary glucose transporter, which seem to be permanent (Harik et al., 1996; Kanaan et al., 2005). Future experiments will address the cellular and molecular mechanisms underlying the effects of CIH and ReOx on hippocampal excitability.

The finding of the reversibility of CIH-induced alterations in hippocampal excitability coincides with studies in epilepsy patients presenting OSA, which show that therapeutic interventions against OSA, such as surgery or CPAP, reduce electrographic epileptiform activity and seizures (Vaughn et al., 1996; Chihorek et al., 2007; Manni & Terzaghi, 2010; Vendrame et al., 2011; Segal et al., 2012). Thus, our

results support the notion that therapeutic interventions against OSA in epilepsy patients could improve seizure control.

## 5. Conclusions

CIH-induced hippocampal network alterations in the gamma frequency band and increased seizure susceptibility are transient and can be reverted after ReOx. These findings suggest that therapeutic interventions against OSA in epilepsy patients, such as surgery or CPAP, could largely contribute to seizure control.

## Funding

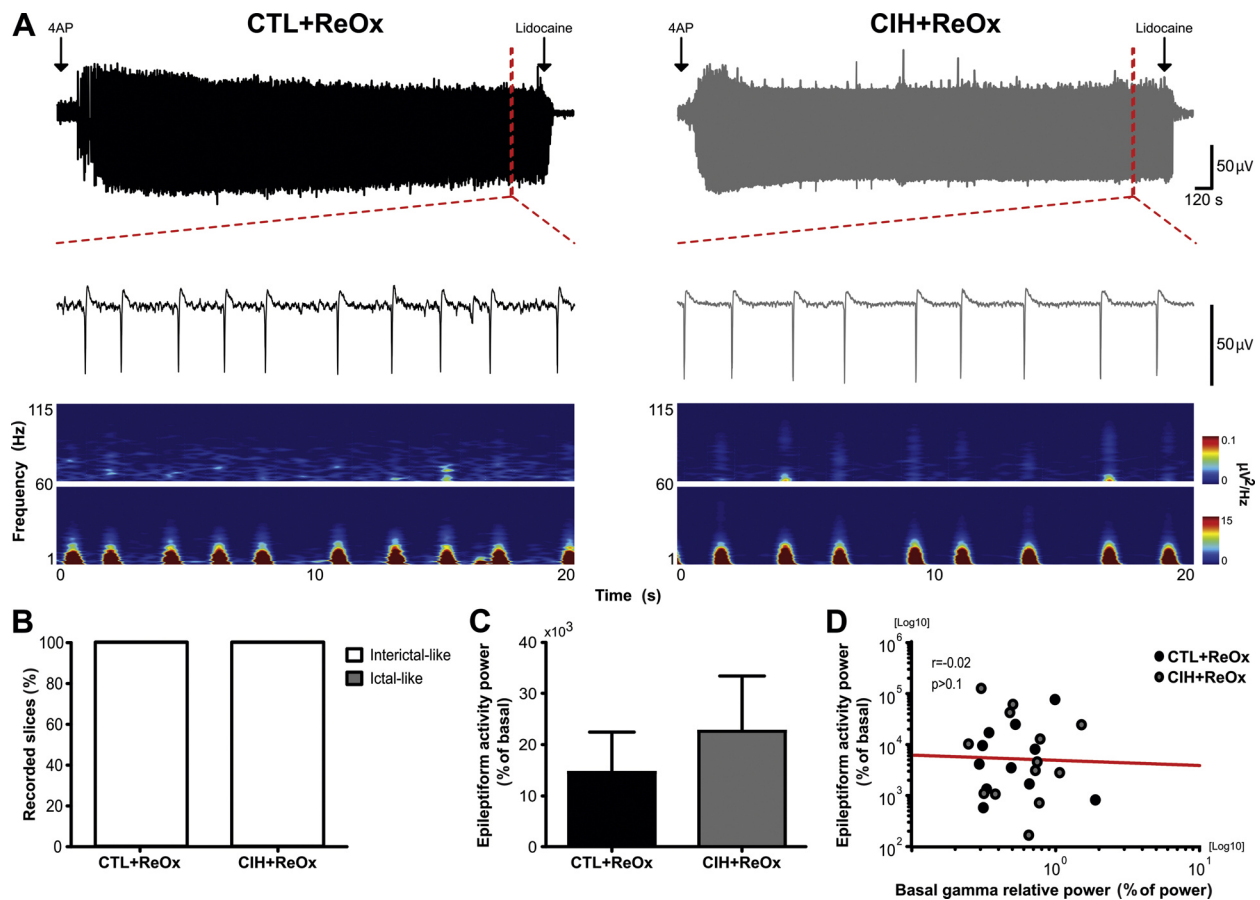
This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, México (grant number IN202018) and by CONACyT (grant number A1-S-7540), México.

## Declaration of Competing Interest

The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

## Acknowledgements

Benjamín Villasana-Salazar and Rebeca Hernández-Soto are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowships (No. 587113 and 664903, respectively) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México. María Estefanía Guerrero-Gómez received a Research Assistant fellowship (No. 15650) from Sistema Nacional de Investigadores, CONACyT, México. Authors thank Jessica González Norris and Anaid Antaramian for editorial comments. Dedicated to the health professionals fighting the COVID-19 pandemic.



**Fig. 5.** Reoxygenation (ReOx) reverts the 4-Aminopyridine (4AP)-induced hippocampal epileptiform exacerbation induced by chronic intermittent hypoxia (CIH). A. Long-lasting representative traces (top) of the epileptiform activity induced by 4AP in hippocampal slices obtained from animals subjected to normoxic room air conditions (CTL) or CIH for 21 days. In both cases, the treatments were followed by 30 days of reoxygenation (+ ReOx). The arrows indicate the beginning of both application of 4AP and lidocaine. Shorter samples of epileptiform activity (middle), delimited by the red dotted lines, and their spectrograms (bottom) are also shown. B. Quantification of the proportion of recorded slices exhibiting either interictal-like or ictal-like epileptiform activity induced by 4AP in CTL + ReOx and CIH + ReOx groups. Note that the totality of slices obtained from CIH + ReOx animals exhibit interictal-like but none ictal-like epileptiform activity. C. 4AP-induced epileptiform activity mean power (as % of basal) in the 1-115 Hz frequency band in CTL + ReOx and CIH + ReOx groups. D. Correlation of basal gamma relative power (as % of power) and 4AP-induced epileptiform activity power (as % of basal) from CTL + ReOx (black circles) and CIH + ReOx (gray circles) groups. A non-linear log-log function was fitted to the data (red line). Note the absence of a correlation between basal hippocampal gamma activity and the magnitude of the epileptiform activity. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Spectrograms show a hiatus around 60 Hz due to the notch filter used during recordings.

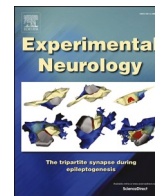
## References

- Alcantara-Gonzalez, D., Villasana-Salazar, B., Peña-Ortega, F., 2019. Single amyloid-beta injection exacerbates 4-aminopyridine induced seizures and changes synaptic coupling in the hippocampus. *Hippocampus* 1–15. <https://doi.org/10.1002/hipo.23129>.
- Andersen, M.L., Tufik, S., Cavalheiro, E.A., Arida, R.M., de Albuquerque, M., Matos, G., Scorza, F.A., 2012. Lights out! It is time for bed. Warning: Obstructive sleep apnea increases risk of sudden death in people with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 23, 510–511. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.01.026>.
- Avoli, M., D'Antuono, M., Louvel, J., Köhling, R., Biagini, G., Pumain, R., D'Arcangelo, G., Tancredi, V., 2002. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog. Neurobiol.* 68 (3), 167–207. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00077-1](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00077-1).
- Barbarosie, M., Avoli, M., 1997. CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains *in vitro* limbic seizures. *J. Neurosci.* 17 (23), 9308–9314. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-23-09308.1997>.
- Björkman, S.T., Miller, S.M., Rose, S.E., Burke, C., Colditz, P.B., 2010. Seizures are associated with brain injury severity in a neonatal model of hypoxia-ischemia. *Neurosci.* 166 (1), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.067>.
- Buzsáki, G., Schomburg, E.W., 2015. What does gamma coherence tell us about inter-regional neural communication? *Nat. Neurosci.* 18 (4), 484–489. <https://doi.org/10.1038/nn.3952>.
- Cha, J., Zea-Hernandez, J.A., Sin, S., Graw-Panzer, K., Shifteh, K., Isasi, C.R., Wagshul, M.E., Mora, E.E., Posner, J., Zimmerman, M.E., Arens, R., 2017. The effects of obstructive sleep apnea syndrome on the dentate gyrus and learning and memory in children. *J. Neurosci.* 37 (16), 4280–4288. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3583-16.2017>.
- Chiang, A.A., 2006. Obstructive sleep apnea and chronic intermittent hypoxia: a Review. *Chin. J. Physiol.* 49 (5), 234–243.

- Chihorek, A.M., Abou-Khalil, B., Malow, B.A., 2007. Obstructive sleep apnea is associated with seizure occurrence in older adults with epilepsy. *Neurol.* 69 (9), 1823–1827. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000279334.78298.d5>.
- de Curtis, M., Gnatkovsky, V., 2009. Reevaluating the mechanisms of focal ictogenesis: The role of low-voltage fast activity. *Epilepsia* 50 (12), 2514–2525. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02249.x>.
- Del Rio, R., Moya, E.A., Iturriaga, R., 2014. Carotid body potentiation during chronic intermittent hypoxia: implication for hypertension. *Front Physiol.* 5, 434. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00434>.
- Dylag, A.M., Mayer, C.A., Raffay, T.M., Martin, R.J., Jafri, A., MacFarlane, P.M., 2017. Long-term effects of recurrent intermittent hypoxia and hyperoxia on respiratory system mechanics in neonatal mice. *Pediatr. Res.* 84 (1), 565–571. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.240>.
- Fernando, I., Mody, I., 2015. In vitro gamma oscillations following partial and complete ablation of  $\delta$  subunit-containing GABAA receptors from parvalbumin interneurons. *Neuropharmacology* 88, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.09.010>.
- Fujiwara-Tsukamoto, Y., Isomura, Y., Kaneda, K., Takada, M., 2004. Synaptic interactions between pyramidal cells and interneurons subtypes during seizure-like activity in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 557 (3), 961–979. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.059915>.
- Gozal, D., Daniel, J.M., Dohanich, G.P., 2001. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J. Neurosci.* 21 (7), 2442–2450. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-07-02442.2001>.
- Gualtieri, F., Marinelli, C., Longo, D., Pugnaghi, M., Nichelli, P.F., Meletti, S., Biagini, G., 2013. Hypoxia markers are expressed in interneurons exposed to recurrent seizures. *Neuromol. Med.* 15, 133–146. <https://doi.org/10.1007/s12017-012-8203-0>.
- Harik, N., Harik, S.I., Kuo, N., Sakai, K., Przybylski, R.J., LaManna, J.C., 1996. Time-course and reversibility of the hypoxia-induced alterations in cerebral vascularity and cerebral capillary glucose transporter density. *Brain Res.* 737, 335–338. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00068-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00068-8).

- org/10.1016/0006-8993(96)00965-1.
- Höllinger, P., Khatami, R., Guggen, M., Hess, C.W., Bassetti, C., 2006. Epilepsy and obstructive sleep apnea. *Eur. Neurol.* 55 (2), 74–79. <https://doi.org/10.1159/000092306>.
- Hughes, J.R., 2008. Gamma, fast, and ultrafast waves of the brain: Their relationship with epilepsy and behavior. *Epilepsy Behav.* 13 (1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2008.01.011>.
- Jensen, F.E., Applegate, C.D., Holtzman, D., Belin, T.R., Burchfiel, J.L., 1991. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Ann. Neurol.* 29 (6), 629–937. <https://doi.org/10.1002/ana.410290610>.
- Jensen, F.E., Holmes, G.L., Lombroso, C.T., Blume, H.K., Firkusny, I.R., 1992. Age-dependent changes in long-term seizure susceptibility and behavior after hypoxia in rats. *Epilepsia* 33 (6), 917–980. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1992.tb01746.x>.
- Jensen, F.E., Wang, C., Stafstrom, C.E., Liu, Z., Geary, C., Stevens, M.C., 1998. Acute and chronic increases in excitability in rat hippocampal slices after perinatal hypoxia in vivo. *J. Neurophysiol.* 79 (1), 73–81. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.1.73>.
- Jones, R.T., Barth, A.M., Ormiston, L.D., Mody, I., 2015. Evolution of temporal and spectral dynamics of pathologic high-frequency oscillations (pHFOs) during epileptogenesis. *Epilepsia* 56 (12), 1879–1889. <https://doi.org/10.1111/epi.13218>.
- Jun, J., Reinke, C., Bedja, D., Berkowitz, D., Bevans-Fonti, S., Li, K., Barouch, A.A., Gabrielson, K., Polotsky, V.Y., 2010. Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 209 (2), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.017>.
- Kanaan, A., Farahani, R., Douglas, R.M., LaManna, J.C., Haddad, G.G., 2005. Effect of chronic continuous or intermittent hypoxia and reoxygenation on cerebral capillary density and myelination. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290 (4), 1105–1114. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00535.2005>.
- Keeley, S., Fenton, A.A., Rinzel, J., 2017. Modeling fast and slow gamma oscillations with interneurons of different subtype. *J. Neurophysiol.* 117 (3), 950–965. <https://doi.org/10.1152/jn.00490.2016>.
- Khuu, M., Pagan, C.M., Nallamothu, T., Hevner, R.F., Hodge, R.D., Ramirez, J.M., Garcia, A.J., 2019. Intermittent hypoxia disrupts adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 39 (7), 1320–1331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1359-18.2018>.
- Kurinczuk, J.J., White-Jonung, M., Badawi, N., 2010. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum. Dev.* 86 (6), 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010>.
- Li, P., Ghadersohi, S., Jafari, B., Teter, B., Sazgar, M., 2012. Characteristics of refractory vs. medically controlled epilepsy patients with obstructive sleep apnea and their response to CPAP treatment. *Seizure* 21 (9), 717–721. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2012.07.016>.
- Magdaleno-Madriral, V.M., Contreras-Murillo, G., Valdés-Cruz, A., Martínez-Vargas, D., Martínez, A., Villasana-Salazar, B., Almazán-Alvarado, S., 2019. Effects of high- and low-frequency stimulation of the thalamic reticular nucleus on pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Neuromodulation* 22 (4), 425–434. <https://doi.org/10.1111/ner.12926>.
- Maheshwari, A., Marks, R.L., Yu, K.M., Noebels, J.L., 2016. Shift in interictal relative gamma power as a novel biomarker for drug response in two mouse models of absence epilepsy. *Epilepsia* 57 (1), 79–88. <https://doi.org/10.1111/epi.13265>.
- Malow, B.A., Levy, K., Maturen, K., Bowers, R., 2000. Obstructive sleep apnea is common in medically refractory epilepsy patients. *Neurol.* 55 (7), 1002–1007. <https://doi.org/10.1212/WNL.55.7.1002>.
- Manni, R., Terzaghi, M., 2010. Comorbidity between epilepsy and sleep disorders. *Epilepsy Res.* 90 (3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.05.006>.
- Merchant, H., de LaFuente, V., Peña-Ortega, F., Larriva-Sahd, J., 2012. Functional impact of interneuronal inhibition in the cerebral cortex of behaving animals. *Prog. Neurobiol.* 99 (2), 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.08.005>.
- Mikati, M.A., Zeinieh, M.P., Kurdi, R.M., Harb, S.A., El Hokayem, J.A., Daderian, R.H., Shamseddine, A., Obeid, M., Bitar, F.F., El Sabban, M., 2005. Long-term effects of acute and of chronic hypoxia on behavior and on hippocampal histology in the developing brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 157 (1), 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.03.007>.
- Montgomery, S.M., Buzsáki, G., 2007. Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (36), 14495–14500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701826104>.
- Moraes, D.J., Machado, B.H., 2015. Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *J. Physiol.* 593 (3), 619–634. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283085>.
- Morand, J., Arnaud, C., Pepin, J.L., Godin-Ribuot, D., 2018. Chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Sci. Rep.* 8 (1), 2997. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21064-y>.
- Morgan, B.J., Bates, M.L., Rio, R.D., Wang, Z., Dopp, J.M., 2016. Oxidative estromerflex sensitivity in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 234, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.09.001>.
- Moshé, S.L., Albala, B.J., 1985. Perinatal hypoxia and subsequent development of seizures. *Physiol. Behav.* 35 (5), 819–823. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(85\)90418-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(85)90418-4).
- Murray, D.M., Ryan, C.A., Boylan, G.B., Fitzgerald, A.P., Connolly, S., 2005. Prediction of seizures in asphyxiated neonates: correlation with continuous video-electroencephalographic monitoring. *Pediatrics* 118 (1), 41–46. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1524>.
- Navarrete-Opazo, A., Mitchell, G.S., 2014. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307 (10), 1181–1197. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00208.2014>.
- Nobili, L., Prosperpio, P., Rubboli, G., Montano, N., Didato, G., Tassinari, C.A., 2011. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) and sleep. *Sleep Med. Rev.* 15 (4), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2010.07.006>.
- Owens, J.R., Robbins, C.A., Wenzel, H.J., Schwartzkroin, P.A., 1997. Acute and chronic effects of hypoxia on the developing hippocampus. *Ann. Neurol.* 41 (2), 187–199. <https://doi.org/10.1002/ana.410410210>.
- Panuccio, G., D'Antuono, M., de Guzman, P., De Lannoy, L., Biagini, G., Avoli, M., 2010. In vitro icogenes and parahippocampal networks in a rodent model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 39 (3), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.003>.
- Pardo-Peña, K., Lorea-Hernández, J.J., Camacho-Hernández, N.P., Ordaz, B., Villasana-Salazar, B., Morales-Villagrán, A., Peña-Ortega, F., 2018. Hydrogen peroxide extracellular concentration in the ventrolateral medulla and its increase in response to hypoxia in vitro: Possible role of microglia. *Brain Res.* 1692, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.032>.
- Peña, F., Alavez-Pérez, N., 2006. Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus in vitro. *Epilepsia* 47 (1), 47–54. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00369.x>.
- Peña-Ortega, F., 2016. Neural Network Reconfigurations: Changes of the Respiratory Network by Hypoxia as an Example. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1015, 217–237. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_12).
- Perreault, P., Avoli, M., 1991. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 65 (4), 771–785. <https://doi.org/10.1152/jn.1991.65.4.771>.
- Rakhade, S.N., Fitzgerald, E.F., Klein, P.M., Zhou, C., Sun, H., Hagan, R.L., Jensen, F.E., 2012. Glutamate receptor 1 phosphorylation at serine 831 and 845 modulates seizure susceptibility and hippocampal hyperexcitability after early life seizures. *J. Neurosci.* 32 (49), 17800–17812. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6121-11.2012>.
- Rakhade, S.N., Klein, P.M., Huynh, T., Hilario-Gomez, C., Kosaras, B., Rotenberg, A., Jensen, F.E., 2011. Development of later life spontaneous seizures in a rodent model of hypoxia-induced neonatal seizures. *Epilepsia* 52 (4), 753–765. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.02992.x>.
- Reyes-García, S.Z., Scorza, C.A., Araújo, N.S., Ortiz-Villatoro, N.N., Jardim, A.P., Centeno, R., Yacubian, E.M.T., Faber, J., Cavalheiro, E.A., 2018. Different patterns of epileptiform-like activity are generated in the sclerotic hippocampus from patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy. *Sci. Rep.* 8 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25378-9>.
- Rodríguez-Alvarez, N., Jimenez-Mateos, E.M., Dunleavy, M., Waddington, J.L., Boylan, G.B., Henshall, D.C., 2015. Effects of hypoxia-induced neonatal seizures on acute hippocampal injury and later-life seizure susceptibility and anxiety-related behavior in mice. *Neurobiol. Dis.* 83, 100–114. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.023>.
- Rosenzweig, I., Williams, S.C., Morrell, M.J., 2014. The impact of sleep and hypoxia on the brain: potential mechanisms for the effects of obstructive sleep apnea. *Current opinion in pulmonary medicine* 20 (6), 565–571. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000099>.
- Sanchez, R.M., Koh, S., Wang, C., Lamperti, E.D., Sharma, D., Corfas, G., Jensen, F.E., 2001. Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. *J. Neurosci.* 21 (20), 8154–8163. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-08154.2001>.
- Segal, E., Vendreame, M., Gregas, M., Lodenkemper, T., Kothare, S.V., 2012. Effect of treatment of obstructive sleep apnea on seizure outcomes in children with epilepsy. *Pediatr. Neurol.* 46 (6), 359–362. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2012.03.005>.
- Sessolo, M., Marcon, I., Bovetti, S., Losi, G., Cammarota, M., Ratto, G.M., Fellin, T., Carmignoto, G., 2015. Parvalbumin-positive inhibitory interneurons oppose propagation but favor generation of focal epileptiform activity. *J. Neurosci.* 35 (26), 9544–9557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5117-14.2015>.
- Sforza, E., Roche, F., 2016. Chronic intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: an experimental and clinical approach. *Hypoxia* 4, 99–108. <https://doi.org/10.2147/HP.S103091>.
- Siqués, P., Brito, J., León-Velarde, F., Barrios, L., Cruz, J.J., López, V., Herruzo, R., 2006. Time course of cardiovascular and hematological responses in rats exposed to chronic intermittent hypobaric hypoxia (4600 m). *High Alt. Med. Biol.* 7 (1), 72–80. <https://doi.org/10.1089/ham.2006.7.72>.
- Vaughn, B.V., D'Cruz, O.F., Beach, R., Messenheimer, J.A., 1996. Improvement of epileptic seizure control with treatment of obstructive sleep apnoea. *Seizure* 5 (1), 73–78. [https://doi.org/10.1016/S1059-1311\(96\)80066-5](https://doi.org/10.1016/S1059-1311(96)80066-5).
- Veasey, S.C., Zhan, G., Fenik, P., Pratico, D., 2004. Long-term intermittent hypoxia: reduced excitatory hypoglossal nerve output. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170 (6), 665–672. <https://doi.org/10.1164/rccm.200403-261OC>.
- Vendrame, M., Auerbach, S., Lodenkemper, T., Kothare, S., Montouris, G., 2011. Effect of continuous positive airway pressure treatment on seizure control in patients with obstructive sleep apnea and epilepsy. *Epilepsia* 52 (11), 168–171. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03214.x>.
- Wais, M., Wu, C., Zahid, T., Sheppy, E., Gillis, J., Del Campo, M., Wan, Q., Zhang, L., 2009. Repeated hypoxic episodes induce seizures and alter hippocampal network activities in mice. *Neurosci.* 161 (2), 599–613. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.036>.
- Xie, H., Leung, K.L., Chen, L., Chan, Y.S., Ng, P.C., Fok, T.F., Wing, Y.K., Ke, Y., Li, A.M., Yung, W.H., 2010. Brain-derived neurotrophic factor rescues and prevents chronic intermittent hypoxia-induced impairment of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Neurobiol. Dis.* 40 (1), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.020>.
- Xie, H., Yung, W.H., 2012. Chronic intermittent hypoxia-induced deficits in synaptic plasticity and neurocognitive functions: a role for brain-derived neurotrophic factor. *Acta Pharmacol. Sin.* 33 (1), 5–10. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.184>.





## Research Paper

# Chronic intermittent hypoxia alters main olfactory bulb activity and olfaction

Rebeca Hernández-Soto<sup>1</sup>, Benjamín Villasana-Salazar<sup>1</sup>, Laura Pinedo-Vargas, Fernando Peña-Ortega\*

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Querétaro, Mexico



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Chronic intermittent hypoxia  
Obstructive sleep apnea  
Main olfactory bulb  
Habituation/dishabituation test  
Buried food test  
Olfactory dysfunction  
Network activity

## ABSTRACT

Olfactory dysfunction is commonly observed in patients with obstructive sleep apnea (OSA), which is related to chronic intermittent hypoxia (CIH). OSA patients exhibit alterations in discrimination, identification and odor detection threshold. These olfactory functions strongly rely on neuronal processing within the main olfactory bulb (MOB). However, a direct evaluation of the effects of controlled CIH on olfaction and MOB network activity has not been performed. Here, we used electrophysiological field recordings *in vivo* to evaluate the effects of 21-day-long CIH on MOB network activity and its response to odors. In addition, we assessed animals' olfaction with the buried food and habituation/dishabituation tests. We found that mice exposed to CIH show alterations in MOB spontaneous activity *in vivo*, consisting of a reduction in beta and gamma frequency bands power along with an increase in the theta band power. Likewise, the MOB was less responsive to odor stimulation, since the proportional increase of the power of its population activity in response to four different odorants was smaller than the one observed in control animals. These CIH-induced MOB functional alterations correlate with a reduction in the ability to detect, habituate and discriminate olfactory stimuli. Our findings indicate that CIH generates alterations in the MOB neural network, which could be involved in the olfactory deterioration in patients with OSA.

## 1. Introduction

The olfactory system is needed for survival and well-being (Kay, 2015), allowing the detection and discrimination of immeasurable odor signals (Malnic et al., 1999; Buck, 2004; Bushdid et al., 2014; Saraiva et al., 2016). Olfaction regulates food consumption (Rolls, 2005), social behavior (Kiyokawa et al., 2009; Sanchez-Andrade and Kendrick, 2009) and danger assessment (Takahashi et al., 2005; Saraiva et al., 2016), among other survival functions. Unfortunately, olfaction is a sensory function highly sensitive to pathological conditions (Masurkar and Devanand, 2014; Roberts et al., 2016; Li et al., 2019), and altered even before the presence of their most typical neurological symptoms (Masurkar and Devanand, 2014; Roberts et al., 2016; Li et al., 2019).

Obstructive sleep apnea (OSA) consists of repetitive airway occlusions that lead to chronic intermittent hypoxia (CIH) and sleep fragmentation (Ramirez et al., 2013; Salihoğlu et al., 2014). OSA is

associated with olfactory dysfunction (Banabilh et al., 2010; Salihoğlu et al., 2014; Fu et al., 2015; Magliulo et al., 2018), and patients exhibit difficulties to detect and discriminate between odors and, in some cases, show higher olfactory detection thresholds (Miyamoto et al., 2009; Salihoğlu et al., 2014; Fu et al., 2015; Günbey et al., 2015). This dysfunction also includes the trigeminal chemosensory system (Heiser et al., 2013). Although the alterations in the olfactory functions correlate with the severity of OSA (Miyamoto et al., 2009; Salihoğlu et al., 2014; Fu et al., 2015; Günbey et al., 2015), the causal relationship between CIH and olfactory dysfunction has not been directly established.

Prolonged exposure to hypoxia can induce apoptosis in olfactory neurons (Zhao et al., 2007), which could be related to the reduction in olfactory bulb volume in OSA patients as a consequence of CIH (Salihoğlu et al., 2014; Doğan et al., 2019). Despite the evidence of anatomical alterations in the olfactory system induced by CIH, and of functional changes induced by CIH in other neural circuits (i.e. the

*Abbreviations:* OSA, Obstructive sleep apnea; CIH, Chronic intermittent hypoxia; MOB, Main Olfactory bulb; LFP, Local field potential.

\* Corresponding author at: Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, Querétaro 76230, Mexico.

*E-mail address:* [jfpena@unam.mx](mailto:jfpena@unam.mx) (F. Peña-Ortega).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113653>

Received 21 September 2020; Received in revised form 2 February 2021; Accepted 14 February 2021

Available online 17 February 2021

0014-4886/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

hippocampus; Payne et al., 2004; Villasana-Salazar et al., 2020; Arias-Cavieres et al., 2020), the specific effects of CIH on olfactory function have not been directly assessed. Here, we tested whether CIH alters main olfactory bulb (MOB) function and found that CIH modifies MOB local field potential activity in vivo, increasing slow theta activity while reducing faster beta gamma activities. Moreover, CIH halts the MOB population response to odors and alters olfactory function.

## 2. Materials and methods

All the experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology at UNAM and conducted in accordance with the guidelines of the Official Mexican Standard for the Use and Care of Laboratory Animals (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) and the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook (NIH publication 80–23, Bethesda, MD, USA, 1996). Only a minimal and necessary number of animals were used in this study.

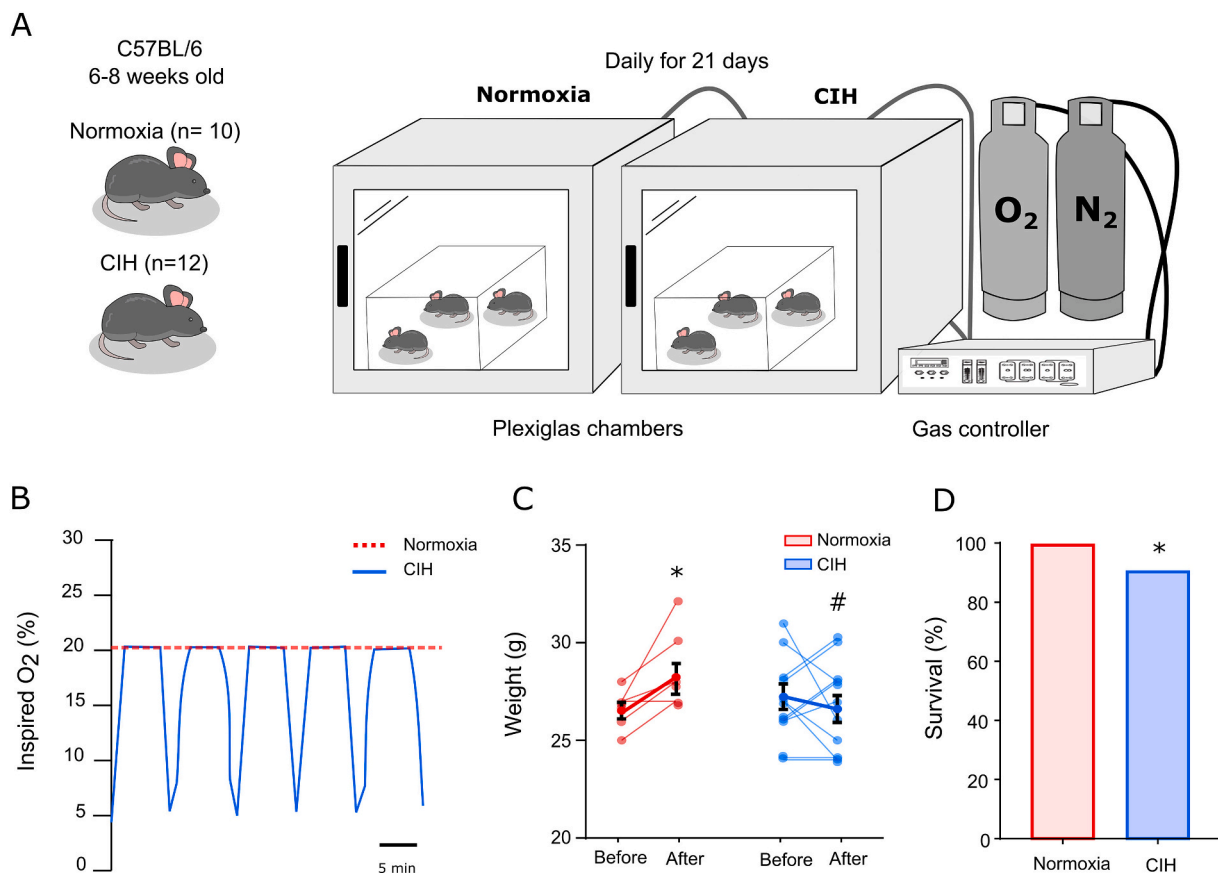
### 2.1. Animals

Adult male C57BL/6 mice ( $n = 22$ ; 6–8 weeks old) were obtained from the Institute of Neurobiology-UNAM animal facility, and housed in collective cages (4–6 animals / cage) in a temperature-controlled vivarium ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). All animals were kept under a normal 12h light-12h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with standard diet (LabDiet 5001, composition 13.4% calories fat, 57.9% calories carbohydrate, and 28.7% calories protein) and water ad libitum. Since the CIH protocol

produces a slight mortality (Villasana-Salazar et al., 2020), we included a higher number of animals in the CIH group ( $n = 12$ ) than in the control group ( $n = 10$ ).

### 2.2. Chronic intermittent hypoxia protocol

CIH was induced as previously reported (Villasana-Salazar et al., 2020). Briefly, every day, mice were placed in collective cages (4–5 animals / cage) within Plexiglas chambers (76 cm  $\times$  51 cm  $\times$  51 cm) equipped with gas injectors and with O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, humidity and temperature sensors (BioSpherix, NY, USA; Fig. 1A). There, CIH animals were submitted to intermittent 5 min of N<sub>2</sub> injection, controlled with an OxyCycler system (A420C, BioSpherix; Fig. 1A), to induce hypoxic episodes (5–7% inspired O<sub>2</sub>) followed by O<sub>2</sub> injection, for 5 min, during normoxic episodes (21–22% inspired O<sub>2</sub>; Fig. 1A–B) (Moraes and Machado, 2015; Villasana-Salazar et al., 2020); which were cyclically alternated (Fig. 1A–B) daily for 8 h (from 10:00 h to 18:00 h), during the light phase of the cycle, for 21 days. We chose this period based on the observation that it is required to induce major pathological changes (Nanduri et al., 2017; Khuu et al., 2019), which cannot be achieved by shorter CIH periods (Nanduri et al., 2017; Khuu et al., 2019). Control animals were placed in a normoxic chamber (21–22% inspired O<sub>2</sub>) for 21 days (Moraes and Machado, 2015; Villasana-Salazar et al., 2020). The animals' weight and survival were constantly monitored during this protocol.



**Fig. 1.** Chronic intermittent hypoxia (CIH) and normoxia treatments and their impact on weight and survival. A) CIH and normoxic groups (left) were placed in independent chambers every day for 21 days; the chambers contained controlled gas concentrations. B) Representative traces of O<sub>2</sub> levels into the chambers during CIH (blue line) or normoxic (red dotted line) conditions. C) Quantification of body weight before and after the 21-day treatments. While normoxic animals gained weight, CIH animals exhibited significant weight loss. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. D) Proportion of animal survival after treatments. Note a slight reduction in survival after CIH. # denotes a significant difference vs normoxic group ( $p < 0.05$ ). \* denotes a significant difference vs initial weight and a significant difference vs normoxia group in survival rate ( $p < 0.05$ ).

### 2.3. Buried food test

At the end of the CIH protocol, animals were tested for olfactory detection with the buried food test (Alvarado-Martínez et al., 2013; Hernández-Soto et al., 2019). To do so, animals were habituated for 30 min to a cage (24 × 20 × 45 cm) with clean sawdust covering the floor. Then, a highly odorous food piece (50 mg of cookie; TRIKI TRAKES®) was hidden ~1 cm beneath the cage bedding, in a random corner. Later, the latency for animals to locate and extract the hidden food was quantified (Alvarado-Martínez et al., 2013; Hernández-Soto et al., 2019). We considered that the animals successfully found the cookie when they held it with both forepaws. A limit for this test was set at 600 s. To evaluate animals' motility and motivation, we repeated the same test but with the cookie in plain sight (Alvarado-Martínez et al., 2013; Hernández-Soto et al., 2019).

### 2.4. Olfactory habituation-dishabituation test

Olfactory discrimination and odor familiarization were evaluated with the habituation/dishabituation test, as previously described (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018). Briefly, all animals were acclimated to the testing cage for 30 min before olfactory stimuli were presented. The stimuli consisted of 10 µl of distilled water or one of two odorants deposited on filter paper (2 × 2 cm) located in a metal container above the lid of the testing box. Two initial presentations of distilled water (3 min each, 1 min inter-presentation interval), included for animal familiarization with the procedure (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018), were followed by three sequential odor stimuli (3 min long with a 1 min inter-stimulus interval) of one of the following odors: vinegar or vanilla, both at 10% v/v, diluted in mineral oil. The fourth odor stimulus consisted of the presentation of the other odor, which was repeated two more times in an identical fashion as the first one (3 min long with a 1 min inter-stimulus interval). The animals were videotaped for offline analysis. The exploration time was evaluated and normalized to the first trial (set as 100%). We assumed that the stimulus was explored if the animal sniffed it within a 1 cm distance to the filter paper. A significant decrease in the investigation time during the repetitive presentation of the same odor is an indication of odor recognition and habituation, while an increase in exploration of the new odorant indicates a discrimination between odors or dishabituation (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018). A "cross-habituation index" (Wesson et al., 2010) was calculated by subtracting the last exploration time of any given odor (3rd exposure) to the normalized exploration of the subsequent novel odor trial (first exposure). We chose these odorants because the response to both vinegar (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018) and vanilla extract (Mosienko et al., 2017) exhibit the habituation and dishabituation phenomena. Moreover, despite that vanillin (the main odorant in vanilla extracts) has been considered an olfactory-nerve specific stimulant (Doty et al., 1978), vanilla (as vinegar) can also induce trigeminal responses (Doty et al., 1978). Thus, this odor combination allowed us to test the function of both the olfactory and the trigeminal systems.

### 2.5. Olfactory bulb network activity recording

Within a week after the CIH protocol, animals were shallowly anesthetized with urethane (2 g/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and fixed to a stereotaxic frame (Stoelting Co., Wood Dale, IL). Animals were wrapped with a cotton surgical drape, which allow us to restrict any change in body temperature to <1 °C for 1.5 h. A stainless-steel bipolar electrode was implanted into the MOB granular cell layer at the following coordinates (relative to Bregma): AP: +4.7 mm; ML: ±0.6 mm; DV: -1.6 mm (Franklin and Paxinos, 2007). An epidural stainless-steel screw was implanted above the cerebellum to ground the signal (AP: -6.0 mm, ML: ±1.0 mm) (Franklin and Paxinos, 2007). The MOB local field potential (LFP) was recorded for 30 min in the absence of odors (baseline). Then, odor stimulations were delivered using a

computer-controlled flow-dilution olfactometer (Slotnick and Restrepo, 2005), provided with a vacuum line to remove odors after their application (Knosys, Inc. Tampa, FL, USA). Odorants (10% v/v diluted in mineral oil; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), were individually applied directly to the nostrils for 10 s through an odor-sampling tube, and immediately removed with the vacuum (Slotnick and Restrepo, 2005). Each odorant was delivered 3 times in the following sequence: amyl-acetate, ethyl-butyrate, limonene (+) and limonene (-). To avoid any interference between applications, the interstimulus interval was set at 300 s (Wilson, 1998; Neville and Haberly, 2003; Le Pichon et al., 2009; Lepousez and Lledo, 2013; Fukunaga et al., 2014; Wu et al., 2020). Simultaneously, the respiratory rhythm was monitored to verify the shallow anesthesia with a piezoelectric sensor attached to the thorax. At the end of the experiments, animals were euthanized with a sodium pentobarbital overdose (50 mg/kg, i.p.; PiSA Agropecuaria, México). LFPs and breathing signals were filtered (0.3 Hz - 0.3 kHz), amplified (7P511L, Grass Instruments Co., Quincy, MA) and digitized at 1 kHz using a MiniDigi 1A (Molecular Devices, San Jose, CA) and Axoscope (v.10.6, Molecular Devices).

### 2.6. Data analysis

Recordings were analyzed as previously described (Alvarado-Martínez et al., 2013; Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018; Hernández-Soto et al., 2019; Villasana-Salazar et al., 2020), with a blind approach (e.g. the analyzer ignored the treatment condition; Villasana-Salazar et al., 2020). The respiratory rate was calculated in three 5 s windows during baseline conditions (Lorea-Hernández et al., 2016). A power spectrum analysis was performed on three randomly selected segments (5 s long) for each experimental condition (baseline and odor-evoked activity) using the fast Fourier transform algorithm with Clampfit software (v.10.7, Molecular Devices). The relative power spectra were calculated in the 1–115 Hz band and expressed as % of power (Peña-Ortega and Bernal-Pedraza, 2012; Alcántara-González et al., 2019; Villasana-Salazar et al., 2020). The relative power spectra were segmented into the following frequency bands: theta (1–15 Hz), beta (15–30 Hz) and gamma (30–115 Hz) (Villasana-Salazar et al., 2020). All analyses excluded the alternate current-induced noise (55–65 Hz). To evaluate the change in MOB activity during the odor-evoked activity, power during baseline conditions was normalized (set as 100%) for each frequency band and power during odor-evoked activity was calculated as % of basal (Hernández-Soto et al., 2019). Representative time-frequency spectrograms were obtained with NeuroExplorer (v.5.129, Nex Technologies).

### 2.7. Statistics

Prism software (v.5, GraphPad, CA, USA) was used for statistical analysis. Differences between groups or conditions were considered significant at  $p < 0.05$ . The normality of data distribution was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. When the assumptions for parametric testing were negative, non-parametric tests were used. Changes in body weight between Normoxia and CIH groups were compared using a one-way repeated measures ANOVA. Animal survival was compared with the Fisher exact test. The effect of CIH on spontaneous activity was assessed with a one-way repeated measures ANOVA with a correction for multiple comparisons (Benjamini, Krieger and Yekutieli False Discovery Rate). The effect of CIH latencies to uncover pellets in the buried food test was assessed with a Mann-Whitney  $U$  test. To evaluate the differences between exploration times during the habituation/dishabituation, we used a two-way ANOVA. Finally, differences in the cross-habituation index were evaluated with a Mann-Whitney  $U$  test. Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). A Pearson's correlation was performed between respiratory rate and relative theta power. In addition, a cross-correlation between breathing and MOB activity was performed. Similarly, Spearman's correlations

were performed to find relationships between olfactory performance and amyl acetate-induced changes in MOB activity in all frequency bands. In these correlation plots, points were grouped with a Ward hierarchical clustering analysis through a customized algorithm in MATLAB using the linkage.m function for a variable amount of groups (v. 2020a, The MathWorks, MA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Chronic intermittent hypoxia reduces weight gain and survival

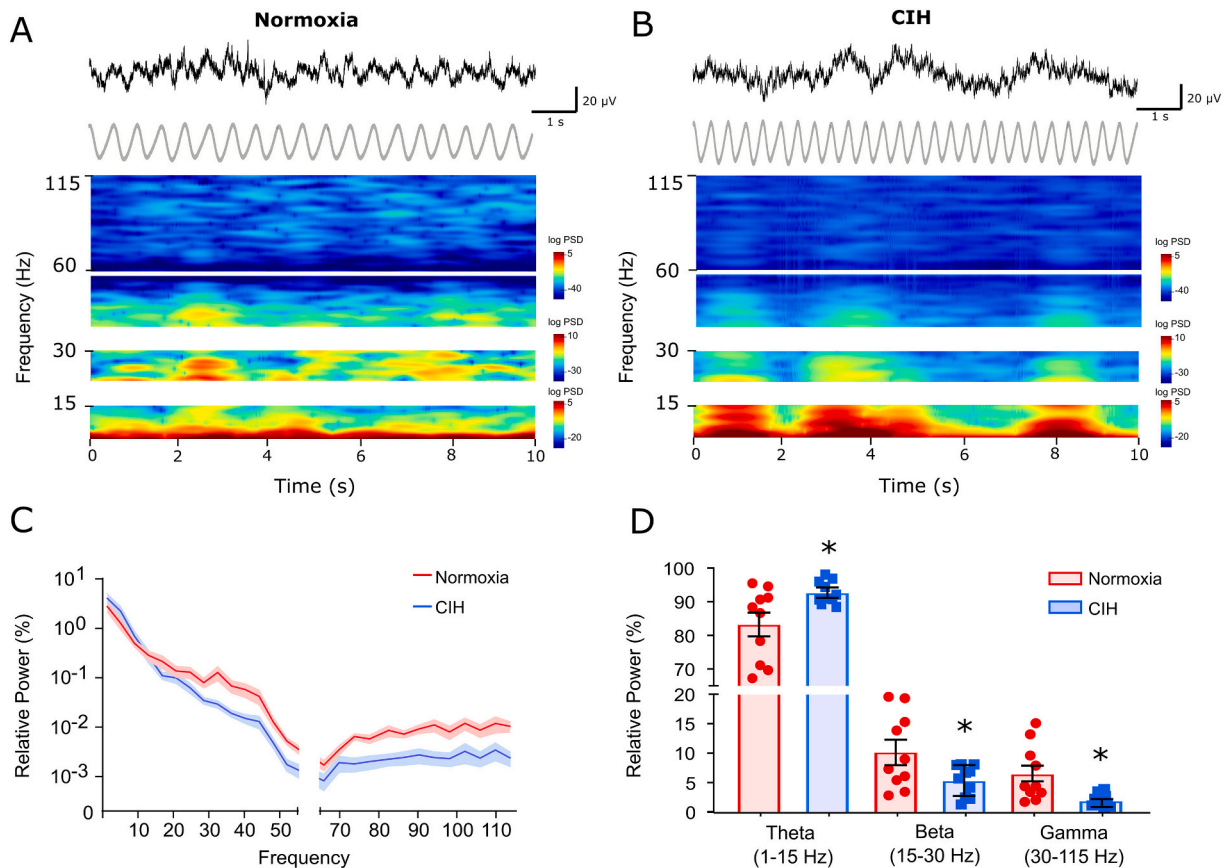
As expected, the animals belonging to both experimental groups had identical weights at the beginning of the protocol (Normoxia:  $26.67 \pm 0.42$  g;  $n = 6$ ; CIH:  $27.42 \pm 0.73$  g;  $n = 11$ ;  $p > 0.05$ ; Fig. 1C). After 21 days of normoxia, control mice significantly increased their body weight (to  $28.30 \pm 0.55$  g;  $n = 6$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 1C). However, mice exposed to CIH for the same period showed a slight but significant reduction in body weight (to  $26.73 \pm 0.68$  g;  $n = 11$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 1C). We also observed a significant increase in mortality after exposure to CIH (1/12 mice, 8.33%;  $p < 0.05$ ; Fig. 1D).

#### 3.2. Chronic intermittent hypoxia alters spontaneous bulbar activity and its response to odors

To evaluate the effects of CIH on MOB spontaneous network activity, we recorded its LFP in shallowly anesthetized animals (Fig. 2A–B). As

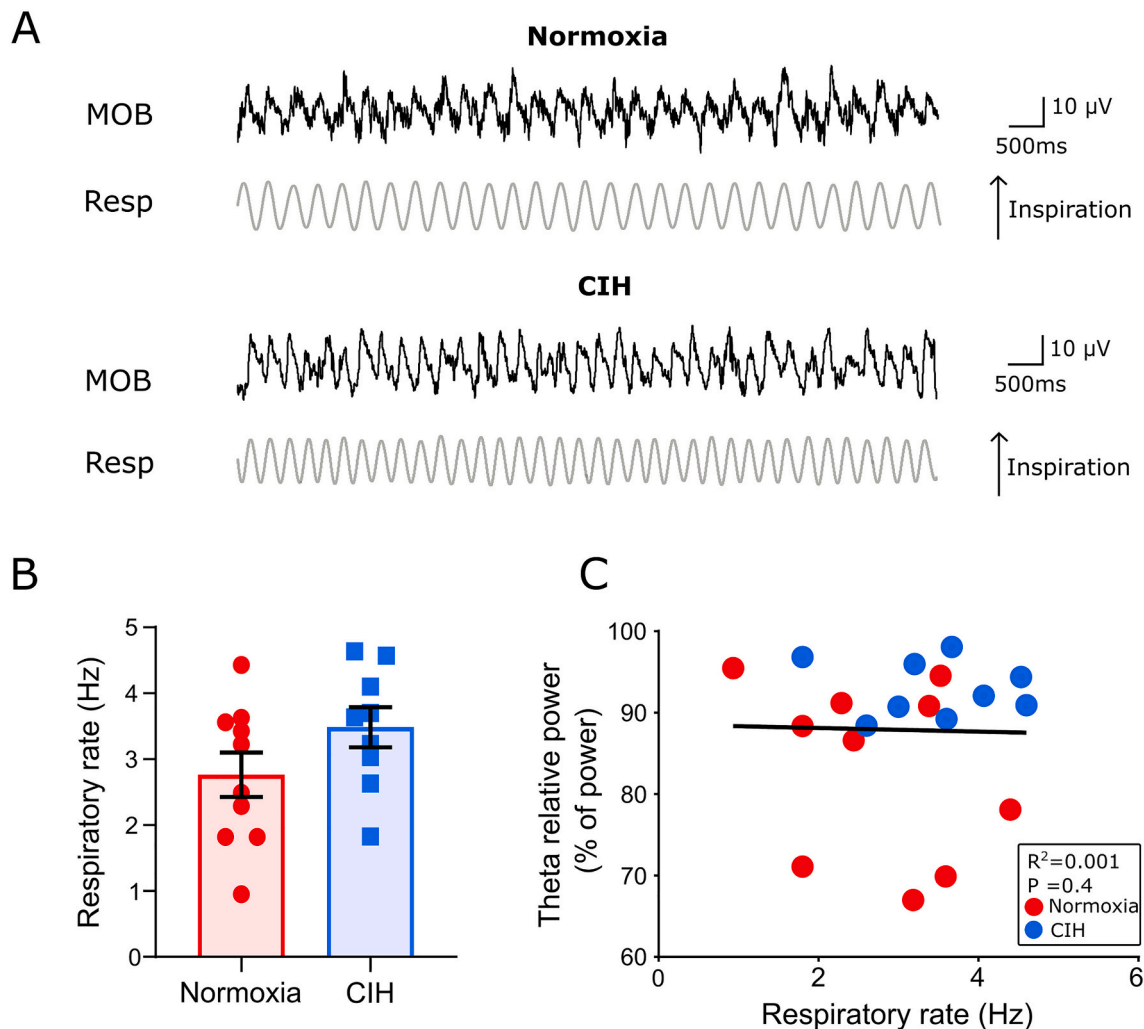
previously described (Hernández-Soto et al., 2019), MOB spontaneous network activity in urethane shallowly anesthetized mice exhibited a mixture of oscillatory patterns dominated by a slow rhythm (theta; 1–15 Hz), synchronized with breathing, in both experimental groups (CIH and Normoxia; Figs. 2–3). This slow rhythm coexisted with faster beta (15–35 Hz) and gamma (35–115 Hz) oscillations in both groups (Figs. 2–3). This activity pattern is identical to the one previously described (i.e. Macrides et al., 1982; Le Pichon et al., 2009; Lepousez and Lledo, 2013; Rojas-Líbano et al., 2014; Fukunaga et al., 2014; Lockmann et al., 2018; Fourcaud-Trocmé et al., 2019). Comparison of relative power between groups shows that CIH animals exhibited a higher proportion of theta frequency band power ( $92.72 \pm 1.06\%$ ;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2B–D) than normoxic animals ( $83.31 \pm 3.40\%$ ;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2A–D). In contrast, CIH animals exhibited a decreased proportion of both beta and gamma frequency bands power ( $5.34 \pm 0.82\%$  and  $1.93 \pm 0.35\%$ , respectively;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2B–D) compared to normoxic animals ( $10.20 \pm 2.00\%$  and  $6.48 \pm 1.49\%$ , respectively;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2A–D).

Considering that respiratory activity can be modulated by intermittent hypoxia (Peña-Ortega, 2017; Camacho-Hernández et al., 2019) and that this activity strongly modulates MOB theta rhythm (Rojas-Líbano et al., 2014), we evaluated whether the change in MOB theta activity is related to a correspondent change in respiratory activity and found that the respiratory rate is not altered in animals treated with CIH ( $3.45 \pm 0.30$  Hz,  $n = 9$ ) compared to normoxic animals ( $2.74 \pm 0.33$  Hz,  $n = 10$ ;  $p > 0.05$ ; Fig. 3A–B). The cross-correlation between MOB activity and



**Fig. 2.** CIH alters MOB spontaneous activity. A) Representative recordings (top), rhythmic thoracic movements (middle) and spectrograms (bottom) of MOB spontaneous network activity from animals maintained under room air conditions (Normoxia group). B) The same as in (A), but for animals exposed to CIH. The spectrograms were segmented in theta (1–15 Hz), beta (15–30 Hz) and gamma (30–115 Hz) frequency ranges and independently scaled. C) Mean relative power spectra (as % of power) of both groups. The thick, dark line represents the mean, while the clear shadow represents the SEM. Relative power in theta was higher and beta/gamma was lower in the CIH group than in the normoxic group. Note a hiatus around 60 Hz in both the spectrograms and the power spectra due to the presence of a notch filter in this frequency band in our recording conditions. D) Quantification of the relative power during spontaneous activity in theta, beta and gamma frequency bands in both groups ( $n = 10$  each one). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* denotes a significant difference vs normoxia ( $p < 0.05$ ).





**Fig. 3.** Breathing frequency is not changed after CIH and is not related to the increase in MOB theta activity. A) Representative traces of simultaneous recordings of the main olfactory bulb (MOB) local field potential (top) and rhythmic thoracic movements (resp; bottom) in animals exposed to normoxia (upper traces) and CIH (lower traces). B) Quantification of the respiratory rate during baseline conditions. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. ( $p > 0.05$ ). C) Lack of correlation between respiratory rate and theta relative power during MOB spontaneous activity ( $p > 0.05$ ).

breathing is not altered in animals treated with CIH ( $0.46 \pm 0.08$  Hz,  $n = 9$ ) compared to normoxic animals ( $0.41 \pm 0.06$  Hz,  $n = 10$ ;  $p > 0.05$ ). Furthermore, we found that the respiratory rate is not correlated with the theta relative power in any of the experimental groups ( $r^2 = 0.001$ ;  $p > 0.05$ ; Fig. 3C). Finally, we did not find evident clustering of the points corresponding to the different experimental groups in the correlation plot (Fig. 3C).

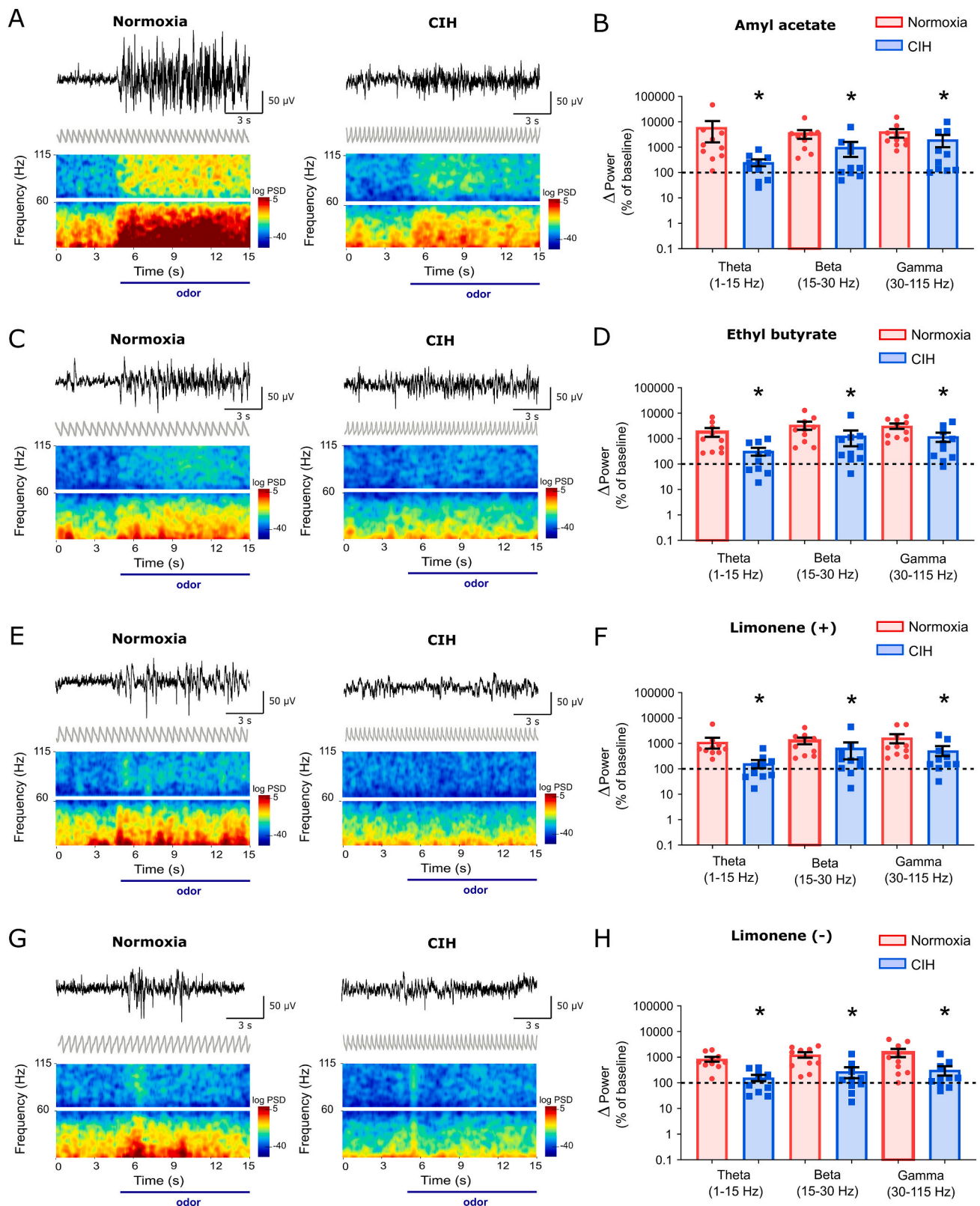
### 3.3. Chronic intermittent hypoxia decreases the bulbar population response to odors

To study the response of MOB activity to odor presentation (amyl acetate, ethyl butyrate, + and - limonene), we calculated the change in LFP power for all described frequency bands as a proportion of “baseline” (set as 100%). As previously described, odor stimulation in anesthetized mice induces an increase in power (Neville and Haberly, 2003; Martin and Ravel, 2014), which includes all frequency bands in the normoxic group but is reduced in CIH animals (Fig. 4). During olfactory stimulation with amyl acetate (Fig. 4A–B), MOB activity increased in normoxic animals in all frequency bands power (theta: to  $6102.91 \pm 4548.54\%$  of baseline, beta:  $3416.74 \pm 1282.01\%$  of baseline and gamma:  $3755.18 \pm 1391.23\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4A–B). In contrast, the change was significantly smaller in the theta (to  $253.29$

$\pm 76.03\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4A–B), beta (to  $1011.22 \pm 597.96\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4A–B) and gamma (to  $2009.56 \pm 1013.75\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4A–B) frequency bands power in CIH animals (Fig. 4A–B). During olfactory stimulation with ethyl butyrate, MOB activity increased in normoxic animals in all frequency band power (theta: to  $1878.53 \pm 707.18\%$  of baseline, beta: to  $3414.12 \pm 1200.27\%$  of baseline and gamma: to  $3149.81 \pm 748.64\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4C–D). In contrast, the change was significantly smaller in the theta (to  $322.88 \pm 109.65\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4C–D), beta (to  $1286.66 \pm 788.84\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4C–D) and gamma (to  $1219.66 \pm 484.61\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4C–D) frequency bands power in CIH animals (Fig. 4C–D).

To further assess the effects of CIH on the response of the MOB to odors, and perhaps changes in its specificity, we tested the effects of CIH on the response to aromatic enantiomers. Thus, we recorded MOB activity during stimulation with + and - limonene in animals exposed to CIH and normoxic controls (Fig. 4E–H). We found that during olfactory stimulation with + limonene, MOB activity increased in normoxic animals in all frequency band power (theta:  $1147.35 \pm 519.08\%$  of baseline, beta:  $1312.34 \pm 384.36\%$  of baseline and gamma:  $1664.45 \pm 653.92\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4E–F). In contrast, the change was significantly smaller in the theta (to  $163.22 \pm 58.74\%$  of





**Fig. 4.** CIH reduces odor-evoked MOB activity. Representative recordings (top), rhythmic thoracic movements (middle) and spectrograms (bottom) of MOB activity before and during odor presentation (blue line; 10 s) in animals treated with normoxia (left) and CIH (right) when the stimulus was amyl acetate (A), ethyl butyrate (C), + limonene (E) and - limonene (G). Note a hiatus at around 60 Hz in the spectrograms due to the presence of a notch filter in this frequency band in our recording conditions. Quantification of the change in power ( $\Delta$  power; as % of baseline, represented as a dotted line) of MOB activity in the response to odors is shown for the stimulation with amyl acetate (B), ethyl butyrate (D), + limonene (F) and - limonene (H), in the following frequency bands: theta (1–15 Hz), beta (15–30 Hz) and gamma (30–115 Hz) for both groups ( $n = 10$ , each). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* denotes a significant difference vs normoxia ( $p < 0.05$ ).

baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4E–F), beta (to  $664.99 \pm 429.54\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4E–F) and gamma (to  $522.16 \pm 222.07\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4E–F) frequency bands power in CIH animals. Finally, we found that during olfactory stimulation with -limonene, MOB activity increased in normoxic animals in all frequency bands (theta:  $848.68 \pm 181.41\%$  of baseline, beta:  $1255.82 \pm 303.98\%$  of baseline and gamma:  $1557.73 \pm 552.75\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4G–H). In contrast, the change was significantly smaller in theta (to  $159.06 \pm 43.14\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4G–H), beta (to  $277.44 \pm 125.30\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 3G–H) and gamma (to  $318.27 \pm 127.20\%$  of baseline;  $n = 10$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 4G–H) frequency bands power in CIH animals. Altogether, these data indicate that CIH exposure impairs MOB neuronal activity and its response to odors, with no specificity to a particular type of odor. All these alterations would be reflected in olfactory impairment. Thus, next we tested the effects of CIH on odor detection and discrimination.

### 3.4. Chronic intermittent hypoxia disrupts olfaction

To evaluate the effects of CIH on olfactory detection, we used the buried food test (Alvarado-Martínez et al., 2013; Hernández-Soto et al., 2019) and found that the average latency to uncover the buried pellet was significantly longer in CIH animals ( $78.27 \pm 26.96$  s;  $n = 6$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 5) than in normoxic mice ( $24.32 \pm 5.72$  s;  $n = 6$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 5). Furthermore, there were no differences among groups in the time to reach a visible pellet (CIH group:  $11.77 \pm 1.36$  s; Normoxic group:  $9.47 \pm 2.12$  s;  $n = 6$  to both groups;  $p > 0.05$ , Fig. 5).

To further elucidate the effects of CIH on olfaction, we evaluated the short-term adaptation and the discrimination aspects of this function through the habituation/dishabituation test (Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018). Normoxic mice profusely explored odors and exhibited the odor habituation and dishabituation phenomena, which were not observed in the CIH group (Fig. 6). When the odorants were applied for the first time, the animals exposed to CIH scarcely explored them (vinegar 1st:  $4.87 \pm 1.62$  s and vanilla 1st:  $1.97 \pm 0.44$  s;  $n = 11$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 6A) compared to control normoxic animals (vinegar 1st:  $14.73 \pm 3.90$  s and vanilla 1st:  $7.82 \pm 1.86$  s;  $n = 10$ ; Fig. 5A). Aside from these

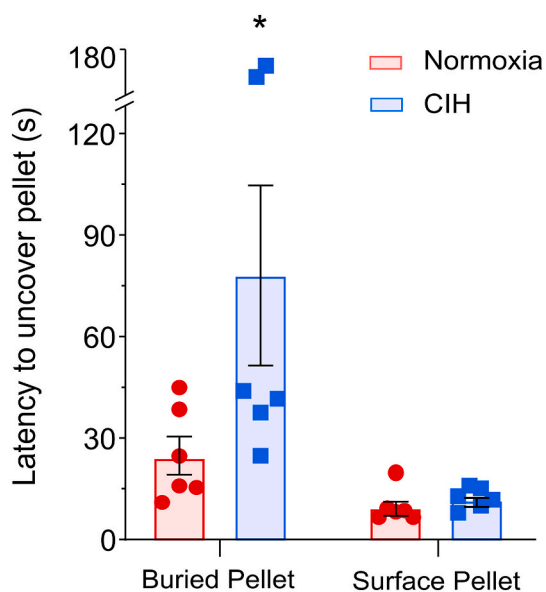


Fig. 5. CIH impairs odor identification. Quantification of the latency to reach an odorous pellet by normoxic and CIH animals ( $n = 6$ , each) while the pellet was hidden underneath the sawdust (left bars) or at plain sight (right bars). The maximal time allowed for the test was 600 s. Mice exposed to CIH take longer to uncover a hidden odor source. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* denotes a significant difference vs normoxia group ( $p < 0.05$ ).

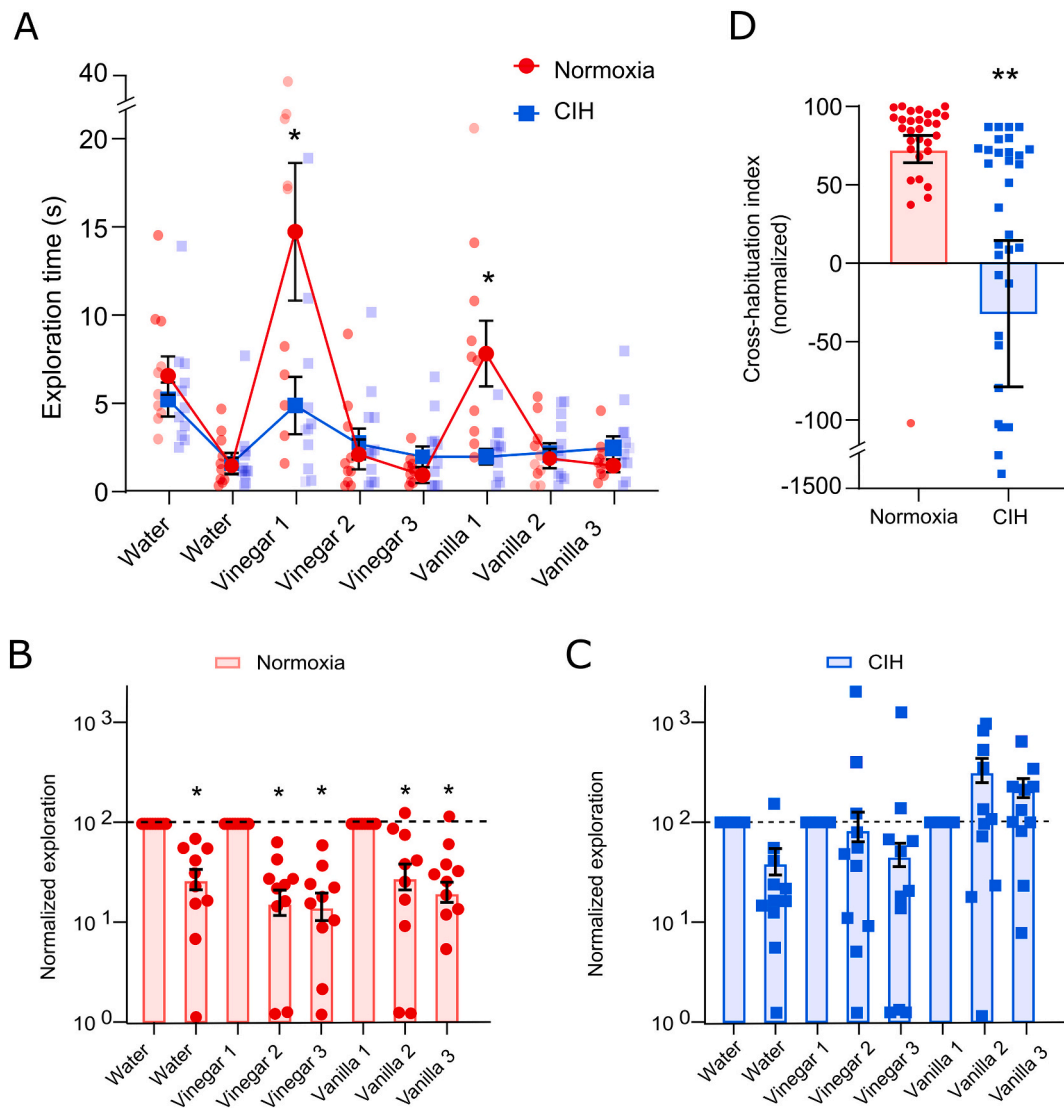
differences in exploration time between groups, we also compared their habituation to the repeated odor presentation through normalized exploration (first stimulus set as 100%) (Fig. 6B–C) and found that control animals exposed to normoxia are capable of habituating to olfactory stimuli, which is reflected in a significantly reduced exploration of the repetitive exposures to both odors ( $13.72 \pm 4.93\%$  and  $43.84 \pm 24.82\%$  in the third presentation of vinegar and vanilla respectively,  $p < 0.05$ , Fig. 6B). In contrast, animals exposed to CIH were not capable of habituating to repetitive olfactory stimuli, since they did not reduce their exploration during the repetitive stimulation ( $51.12 \pm 22.92\%$  and  $223.10 \pm 72.14\%$  in the third presentation of vinegar and vanilla respectively, Fig. 6C). To better assess the olfactory discrimination between odors (dishabituation), we calculated the “cross-habituation index” (Wesson et al., 2010) by subtracting the normalized exploration to the third presentation of one odor to normalize the exploration to the first stimulation of the next odor and found that CIH animals exhibited a significantly smaller cross-habituation index ( $-33 \pm 46.81$ ;  $n = 11$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 6D) than normoxic control animals ( $72.61 \pm 8.74$ ;  $n = 10$ ; Fig. 6D). Altogether, the results indicate that CIH affects odor processing; specifically, odor identification, discrimination and learning.

To evaluate a possible relationship between olfactory performance and MOB response to odors, we performed correlation and cluster analyses between olfactory scores and the MOB population response to amyl acetate in different frequency bands power (Fig. 7). We found that the latency to find the hidden food correlates with the change in the power of MOB activity to an odor (amyl acetate) in all frequency bands (Theta:  $r^2 = 0.56$ ,  $p < 0.05$ ; Beta:  $r^2 = 0.60$ ,  $p < 0.05$ ; Gamma:  $r^2 = 0.59$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 7A). However, this correlation was not observed with the cross-habituation index (Theta:  $r^2 = 0.33$ ,  $p > 0.05$ ; Beta:  $r^2 = 0.21$ ,  $p > 0.05$ ; Gamma:  $r^2 = 0.19$ ,  $p > 0.05$ ; Fig. 7B). The hierarchical clustering analysis revealed that the animals exposed to CIH are clustered in a homogeneous group in most of the correlation plots, while the normoxic animals represent a more heterogeneous population although clearly differentiated from the CIH cluster (Fig. 7).

## 4. Discussion

Despite the well-known relationship between OSA and olfactory dysfunctions (Salihoğlu et al., 2014; Magliulo et al., 2018), the impact of CIH on olfaction and MOB activity had not been evaluated before our study. To fill this void, we characterized the alterations induced by CIH on MOB activity and olfaction and found that CIH modifies MOB neural network activity and its response to odors while inducing olfactory impairment. Since MOB function depends on the synchronized activity of its neural components (Rojas-Líbano et al., 2014), which leads to the generation of various odor-sensitive oscillatory patterns (Martin et al., 2006; Neville and Haberly, 2003; Rojas-Líbano et al., 2014), alterations in OB neurons affect MOB oscillatory activity and olfaction (Zhang et al., 2018; Li et al., 2019; Wu et al., 2020). Moreover, CIH affects neurogenesis (Khuu et al., 2019) and alterations in neurogenesis disrupt olfaction (Lietzau et al., 2018), including odor habituation/dishabituation (Lietzau et al., 2018) and the buried pellet test (Lietzau et al., 2018), which is likely involved in CIH-induced olfactory impairment.

As reported for other pathological conditions (Grassi et al., 1996; Cheaha et al., 2015; Zhou et al., 2017), and as observed in the EEG of patients with OSA (Xiromeritis et al., 2011; Muñoz-Torres et al., 2020; Kang et al., 2020), CIH increased the proportion of MOB slow (theta) activity (Fig. 2). MOB theta is closely related to olfactory exploration (sniffing; Kay et al., 2009) and odor learning (Macrides et al., 1982; Kay et al., 2009), which indicates that alterations in this rhythm would highly impact olfactory function (Alvarado-Martínez et al., 2013; Hernández-Soto et al., 2019). Considering that theta oscillations in the MOB are coupled to the respiratory rhythm (Rojas-Líbano et al., 2014; Wu et al., 2020) and that the respiratory rhythm is modulated by acute and chronic intermittent hypoxia (Peña-Ortega, 2017; Camacho-Hernández et al., 2019), we explored if our CIH protocol changed the



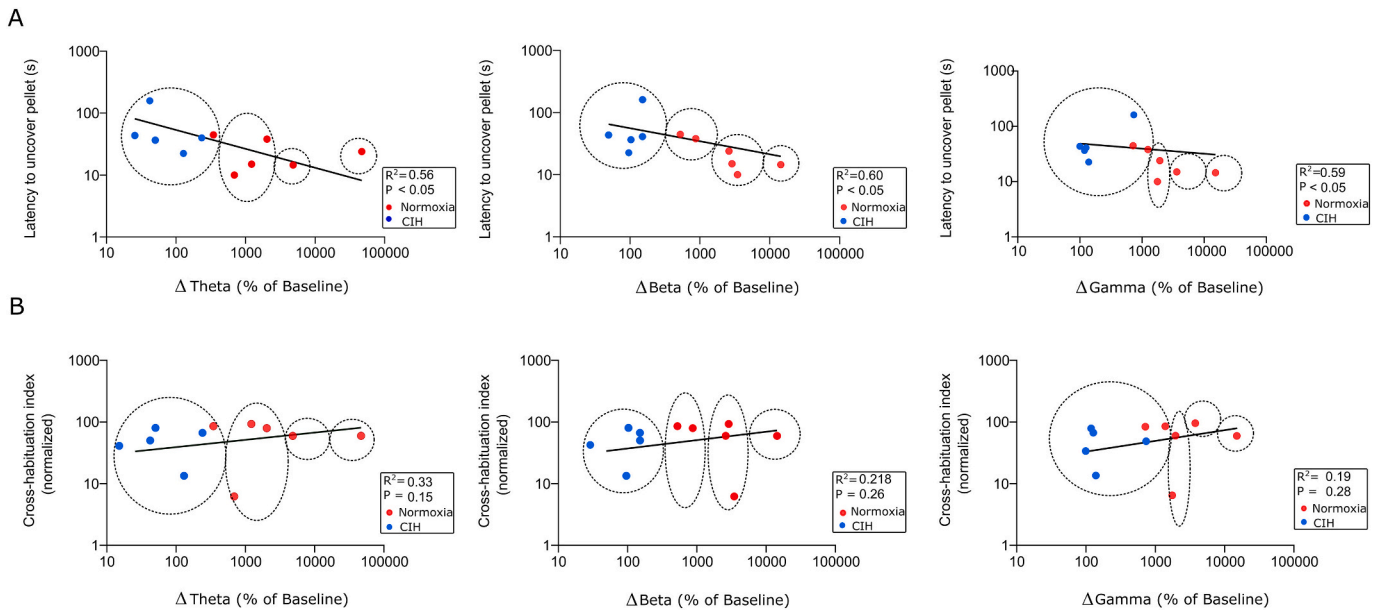
**Fig. 6.** CIH impairs odor habituation and discrimination. **A)** Exploration time to different odor presentations for animals of the normoxic ( $n = 10$ ) and CIH ( $n = 11$ ) groups. Alternatively, normalized exploration time (as % of the first exposure) for normoxic (**B**) and CIH (**C**) animals are also presented. Note that normoxic animals exhibited a reduction in the exploration time after repetitive stimulation with the same odor (habituation) and an increase upon change in the presented odor (dishabituation), which was not observed in CIH animals. **D)** Quantification of the cross-habituation index (discrimination) for CIH and normoxic animals. Note a significant reduction in cross-habituation in CIH mice. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* denotes a significant difference vs normoxic group ( $p < 0.05$ ).

respiratory rhythm and found that it is not the case (Fig. 3). Thus, the increase in theta rhythm in CIH animals cannot be associated with a change in inspiratory modulation. This finding is similar to the lack of relationship between changes in breathing pattern and alterations in MOB oscillatory activities during fasting (Wu et al., 2020). Another external influence on MOB theta oscillations is the hippocampal theta rhythm (Kay, 2005). However, we have recently shown that the intrinsic hippocampal theta rhythm in vitro is not altered after an identical CIH exposure (Villasana-Salazar et al., 2020). Still, the increase in theta power observed in the MOB can be due to an increased pathological theta-coupling with other extra-hippocampal structures (e.g. the temporal or prefrontal cortex; Grassi et al., 1996; Salimi et al., 2019). Alternatively, the increase in theta activity after CIH could also be explained by changes in the circuitry within the MOB. Since the rhythmic activity arriving at the olfactory glomeruli in theta frequency recruits local inhibition from juxtglomerular interneurons innervating mitral/tufted cells, which amplify theta activity within the MOB (Fukunaga et al., 2014), it is likely that the already reported changes produced by CIH on extrabulbar interneurons (Yuan et al., 2015; Liang

et al., 2016, 2020) might include the bulbar juxtglomerular interneuron network leading to the increase in MOB theta activity. The increase in MOB slow activity after CIH resembles the EEG slowing observed in Alzheimer's disease (Peña-Ortega, 2013, 2019), inflammation (Peña-Ortega, 2019) and indeed in OSA patients (Xiromeritis et al., 2011; Muñoz-Torres et al., 2020; Kang et al., 2020), which has been correlated to a variety of behavioral alterations.

We also found that CIH decreases the proportion of fast (beta and gamma) activity. Beta and gamma rhythms are associated with odor discrimination and learning (Hermer-Vazquez et al., 2007; Kay and Beshel, 2010; Fourcaud-Trocmé et al., 2019), while gamma rhythm is also related to odor detection (Martin et al., 2007; Chapuis et al., 2009; Lockmann et al., 2018). Since beta oscillations mainly rely on the centrifugal interactions with extrabulbar structures (Martin et al., 2007; Hermer-Vazquez et al., 2007; Chapuis et al., 2009; Kay and Beshel, 2010; Lockmann et al., 2018; Fourcaud-Trocmé et al., 2019), it is likely that, as further discussed later, the reduction in beta oscillations induced by CIH is reflecting alterations in extrabulbar structures intimately related to the MOB (Martin et al., 2006; Neville and Haberly, 2003),





**Fig. 7.** Correlation between MOB population response to odors with olfactory detection but not with odor discrimination. Correlation plots between olfactory performance with the change in normalized power (% of baseline) of the MOB during exposure to amyl acetate in different frequency bands ( $\Delta$ theta: 1–15 Hz, left;  $\Delta$ beta: 15–30 Hz, middle and  $\Delta$ gamma: 30–115 Hz, right) for all tested animals, including CIH (red dots) and normoxic (red dots) animals. Aside from the linear regressions (black line), dots were grouped through hierarchical clustering (dotted circles). Note that CIH animals are always grouped in the same cluster differentiated from normoxic clusters. Significant correlations were found between the response of the MOB to amyl acetate, in all frequency bands power, with odor detection (latency to uncover pellet; upper graphs) but not with the cross-habituation index (lower graphs).

such as the hippocampus (Villasana-Salazar et al., 2020) or the cortex (Xiromeritis et al., 2011; Muñoz-Torres et al., 2020; Kang et al., 2020). Interestingly, alterations in olfactory habituation have also been associated with changes in olfactory related cortices (Wilson, 1998; Smith et al., 2009; Campolongo et al., 2018). As for the theta activity increase, the reduction in MOB fast (beta and gamma) activity also resembles the EEG slowing observed in Alzheimer's disease (Peña-Ortega, 2013, 2019), inflammation (Peña-Ortega, 2019) and OSA patients (Xiromeritis et al., 2011; Muñoz-Torres et al., 2020; Kang et al., 2020).

Gamma oscillations are mainly generated within the MOB (Fukunaga et al., 2014), and mostly arise from the dendrodendritic synapses between the mitral cells and granular interneurons (Rojas-Líbano and Kay, 2008; Fukunaga et al., 2014; Osinski and Kay, 2016; Osinski et al., 2018). The amount of gamma is enhanced during odor detection and discrimination (Beshel et al., 2007; Lepousez and Lledo, 2013), and is closely related to olfactory task demands (Beshel et al., 2007). Moreover, alterations in MOB gamma activity have been associated with olfactory dysfunction (Lepousez and Lledo, 2013; Cheaha et al., 2015; Li et al., 2019). Considering that MOB gamma oscillations mostly rely on the activity of granule interneurons (Rojas-Líbano and Kay, 2008; Fukunaga et al., 2014; Osinski and Kay, 2016; Osinski et al., 2018), it is likely that the changes produced by CIH on interneurons (Yuan et al., 2015; Liang et al., 2016, 2020) might reach the bulbar granule interneuron network decreasing MOB gamma activity. In fact, reducing GABAergic inhibition alters gamma activity and olfactory performance (Lagier et al., 2004; Bathellier et al., 2010; Lepousez and Lledo, 2013). Alternatively, the CIH-induced reduction in NMDA-mediated transmission, already found in the hippocampus (Arias-Cavieres et al., 2020) and the nucleus of the solitary tract (De Paula et al., 2007; Almado et al., 2012), could account for the reduction in MOB gamma oscillations, since NMDA receptors at the dendrodendritic synapses, mainly those between granule and principal cells, are essential for MOB gamma generation (Osinski et al., 2018).

The MOB network suffers a reconfiguration process while transiting from spontaneous network activity in the absence of odors to odor-induced neural network activity, which involves not only an increase

in activity power (Lagier et al., 2004; Le Pichon et al., 2009; Cheaha et al., 2015; Chelminski et al., 2017; Zhou et al., 2017; Zhang et al., 2018; Li et al., 2019; Wu et al., 2020) but also changes in cellular elements and synaptic interactions required for the transition from one activity pattern to the other (Friedman and Strowbridge, 2003; Lagier et al., 2004). This reconfiguration process seems to be necessary for proper olfactory information processing (Wu et al., 2020) and is reduced under stressful conditions that affect olfaction (Wu et al., 2020). Coincidentally, here we show that CIH affects the change in the MOB activity pattern induced by the presence of odors, at least the increase in overall power (Fig. 4). Thus, it is likely that this functional alteration in MOB responsiveness might be related to CIH-induced olfactory dysfunction. Similarly, in the hippocampus, CIH alters the synaptic plasticity induced by repetitive input stimulation, which was associated with a reduction in hippocampal-dependent tasks (Payne et al., 2004; Arias-Cavieres et al., 2020).

In summary, here we found that CIH alters MOB activity, which correlates with olfactory dysfunction. The association of both phenomena has been found under other pathological or stressful conditions (Le Pichon et al., 2009; Cheaha et al., 2015; Chelminski et al., 2017; Zhou et al., 2017; Zhang et al., 2018; Li et al., 2019; Wu et al., 2020). The olfactory alterations in these conditions have been related to a variety of changes in intrinsic and synaptic properties of bulbar neurons (Zhang et al., 2018; Li et al., 2019; Wu et al., 2020), including alterations in the firing activity of olfactory neurons (Li et al., 2019; Wu et al., 2020), their response to odor stimuli (Wu et al., 2020) and their synaptic interactions (Le Pichon et al., 2009; Zhang et al., 2018; Li et al., 2019), which can be also the case for the alterations induced by CIH. This is likely because CIH alters intrinsic and synaptic properties in different circuits (Payne et al., 2004; De Paula et al., 2007; Almado et al., 2012; Arias-Cavieres et al., 2020; Villasana-Salazar et al., 2020). These potential changes in the olfactory circuits need to be explored to identify possible therapeutic targets to counteract the effects of CIH on olfactory function, which could be useful for the treatment of hyposmia in OSA patients.

It must be acknowledged that CIH-induced deterioration in olfactory function is sturdier than the CIH-induced changes in MOB network

activity. This apparent dissociation between a moderate reduction in a single-site LFP power and a clear deterioration in behavior has been observed in other pathological conditions and circuits (Radwan et al., 2016; Bygrave et al., 2019). In the absence of major changes in oscillatory activity power, behavioral alterations can be associated to alterations in the temporarily ordered and dynamic activation of ensembles within a given circuit (Radwan et al., 2016) or between distant networks (Bygrave et al., 2019). For instance, mice lacking the GLUA1 protein (which is related to schizophrenia), show impaired spatial working memory and stimulus habituation, which are not related to a dramatic change in slow or fast oscillations (although some slight state-dependent alterations in power are observed; Bygrave et al., 2019) but are, instead, correlated to major alterations in hippocampal–prefrontal coherence, in a demand-dependent manner. Similarly, cognitive discrimination deficits in fragile X mental retardation protein 1-deficient mice were not related to a dramatic change in slow or fast oscillations (Radwan et al., 2016), but were closely correlated with alterations in the dynamic transitions in the theta/gamma coupling along the somato-dendritic axis of CA1 during different demands (Radwan et al., 2016), producing what has been called a discoordinated state (Radwan et al., 2016). It must be acknowledged too, that dynamic functional impairments would be difficult to detect by steady-state measurements, by recording only one structure, or by only analyzing the changes in power of oscillatory activity. These limitations are present in our study and need to be amended by evaluating the activity of the MOB (and simultaneously other related circuits) under different olfactory demands and/or by simultaneously recording all its cellular types and layers. As it is now, we cannot discard that CIH produces differential changes within the MOB (beyond the recorded granular layer) or other extrabulbar olfactory circuits. In fact, there are olfactory-related extrabulbar structures affected by CIH, perhaps more than the MOB, such as the piriform cortex (Mukai et al., 2013), the entorhinal cortex-hippocampal circuit (Mukai et al., 2013; Villasana-Salazar et al., 2020) and neuromodulatory networks (Ma et al., 2008; Mukai et al., 2013), that could influence the CIH-induced olfactory dysfunction. The contribution of these extrabulbar circuits to the CIH-induced olfactory dysfunction needs to be addressed.

## 5. Conclusion

Our findings provide evidence that CIH disrupts MOB spontaneous and odor-evoked activity, which correlates with alterations in olfaction. It is likely that the hyposmia observed in OSA patients is induced by CIH-induced alterations in the MOB and, perhaps, in other extrabulbar circuits. Further studies are needed to reveal the cellular and network mechanisms underlying these alterations and their possible reversal.

## Funding

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, México (grant number IN202018, IG200521) and by CONACyT (grant number A1-S-7540), México.

## Author's contributions

Rebeca Hernández-Soto, Benjamín Villasana-Salazar and Fernando Peña-Ortega designed the experiments. Rebeca Hernández-Soto and Fernando Peña-Ortega wrote the manuscript. Rebeca Hernández-Soto and Benjamín Villasana-Salazar performed the electrophysiological recordings, behavioral test and analyzed the data. Benjamín Villasana-Salazar and Laura Pinedo-Vargas monitored the animals during the chronic intermittent hypoxia protocol. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

## Declaration of Competing Interest

The authors have no financial conflicts of interest.

## Acknowledgements

Rebeca Hernández-Soto, Benjamín Villasana-Salazar, Laura Pinedo-Vargas are graduate students at “Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas” at “Universidad Nacional Autónoma de México” (UNAM) and received fellowships (No. 612139, 587113 and 621862, respectively) from “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACyT), México. Authors thank Jessica González Norris and Anaïd Antaramian for editorial comments and Benito Ordaz for technical support.

## References

- Alcantara-Gonzalez, D., Villasana-Salazar, B., Peña-Ortega, F., 2019. Single amyloid-beta injection exacerbates 4-aminopyridine-induced seizures and changes synaptic coupling in the hippocampus. *Hippocampus* 29 (12), 1150–1164. <https://doi.org/10.1002/hipo.23129>.
- Almado, C.E.L., Machado, B.H., Leao, R.M., 2012. Chronic intermittent hypoxia depresses afferent neurotransmission in NTS neurons by a reduction in the number of active synapses. *J. Neurosci.* 32 (47), 16736–16746. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2654-12.2012>.
- Alvarado-Martínez, R., Salgado-Puga, K., Peña-Ortega, F., 2013. Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell. *PLoS One* 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075745>.
- Arias-Cavieres, A., Khuu, M.A., Nwakudu, C.U., Barnard, J.E., Dalgin, G., Garcia III, A.J., 2020. A HIF1a-dependent pro-oxidant state disrupts synaptic plasticity and impairs spatial memory in response to intermittent hypoxia. *Eneuro* 7 (3). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0024-20.2020>.
- Banabih, S.M., Suzina, A.H., Mohamad, H., Dinsuhaimi, S., Samsudin, A.R., Singh, G.D., 2010. Assessment of 3-D nasal airflow morphology in Southeast Asian adults with obstructive sleep apnea using acoustic rhinometry. *Clin. Oral Investig.* 14 (5), 491–498. <https://doi.org/10.1007/s00784-009-0342-9>.
- Bathellier, B., Gschwend, O., Carleton, A., 2010. Temporal coding in olfaction. In: *The Neurobiology of Olfaction*. CRC Press/Taylor & Francis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55968/>.
- Beshel, J., Kopell, N., Kay, L.M., 2007. Olfactory bulb gamma oscillations are enhanced with task demands. *J. Neurosci.* 27 (31), 8358–8365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1199-07.2007>.
- Buck, L.B., 2004. Olfactory receptors and odor coding in mammals. *Nutr. Rev.* 62 (suppl 3), S184–S188. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2004.tb00097.x>.
- Bushdid, C., Magnasco, M.O., Vossell, L.B., Keller, A., 2014. Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science* 343 (6177), 1370–1372. <https://doi.org/10.1126/science.1249168>.
- Bygrave, A.M., Jahans-Price, T., Wolff, A.R., Sprengel, R., Kullmann, D.M., Bannerman, D.M., Kätzel, D., 2019. Hippocampal-prefrontal coherence mediates working memory and selective attention at distinct frequency bands and provides a causal link between schizophrenia and its risk gene GRIA1. *Transl Psychiatry* 9 (1), 142. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0471-0>.
- Camacho-Hernández, N.P., Lorea-Hernández, J.J., Peña-Ortega, F., 2019. Microglial modulators reduce respiratory rhythm long-term facilitation in vitro. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 265, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.07.012>.
- Campolongo, M., Kazlauskas, N., Falasco, G., Urrutia, L., Salgueiro, N., Höcht, C., Depino, A.M., 2018. Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. *Mol. Autism* 9 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0221-9>.
- Chapuis, J., Garcia, S., Messaoudi, B., Thevenet, M., Ferreira, G., Gervais, R., Ravel, N., 2009. The way an odor is experienced during aversive conditioning determines the extent of the network recruited during retrieval: a multisite electrophysiological study in rats. *J. Neurosci.* 29 (33), 10287–10298. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0505-09.2009>.
- Cheaha, D., Bumrungsri, S., Chatpun, S., Kumarnsit, E., 2015. Characterization of in utero valproic acid mouse model of autism by local field potential in the hippocampus and the olfactory bulb. *Neurosci. Res.* 98, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.04.006>.
- Chelminski, Y., Magnan, C., Luquet, S.H., Everard, A., Meunier, N., Gurden, H., Martin, C., 2017. Odor-induced neuronal rhythms in the olfactory bulb are profoundly modified in ob/ob obese mice. *Front. Physiol.* 8, 2. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00002>.
- Cornejo-Montes-de-Oca, J.M., Hernández-Soto, R., Isla, A.G., Morado-Urbina, C.E., Peña-Ortega, F., 2018. Tolfenamic acid prevents amyloid  $\beta$ -induced olfactory bulb dysfunction in vivo. *Curr. Alzheimer Res.* 15 (8), 731–742. <https://doi.org/10.2174/1567205015666180223091233>.
- De Paula, P.M., Tolstykh, G., Mifflin, S., 2007. Chronic intermittent hypoxia alters NMDA and AMPA-evoked currents in NTS neurons receiving carotid body chemoreceptor inputs. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 292 (6), R2259–R2265. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00760.2006>.
- Doğan, A., Bayar Muluk, N., Şahin, H., 2019. Olfactory bulb volume and olfactory sulcus depth in patients with OSA: an MRI evaluation. *Ear Nose Throat J.* 0145561319881571 <https://doi.org/10.1177/0145561319881571>.
- Doty, R.L., Bruggler, W.E., Jurs, P.C., Orndorff, M.A., Snyder, P.J., Lowry, L.D., 1978. Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiol. Behav.* 20 (2), 175–185. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(78\)90070-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(78)90070-7).

- Fourcaud-Trocme, N., Lefevre, L., Garcia, S., Messaoudi, B., Buonviso, N., 2019. High beta rhythm amplitude in olfactory learning signs a well-consolidated and non-flexible behavioral state. *Sci. Rep.* 9 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56340-y>.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2007. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd edn. Academic, New York. ISBN: 978-0123742445.
- Friedman, D., Strowbridge, B.W., 2003. Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 89 (5), 2601–2610. <https://doi.org/10.1152/jn.00887.2002>.
- Fu, D., Pinto, J.M., Wang, L., Chen, G., Zhan, X., Wei, Y., 2015. The effect of nasal structure on olfactory function in patients with OSA. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 272 (2), 357–362. <https://doi.org/10.1007/s00405-014-3096-1>.
- Fukunaga, I., Herb, J.T., Kollo, M., Boyden, E.S., Schaefer, A.T., 2014. Independent control of gamma and theta activity by distinct interneuron networks in the olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* 17 (9), 1208. <https://doi.org/10.1038/nn.3760>.
- Grassi, B., Locatelli, M., Lazzarin, A., Scarone, S., 1996. Temporal lobe electroencephalogram power modifications during olfactory stimulation in HIV-infected patients. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 12 (6), 547–551. <https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.547>.
- Günbey, E., Güzel, A., Karlı, R., Ünal, R., 2015. The relationships between the clinical and polysomnographic findings and the olfactory function in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath.* 19 (4), 1301–1307. <https://doi.org/10.1007/s11325-015-1165-3>.
- Heiser, C., Zimmermann, I., Sommer, J.U., Hörmann, K., Herr, R.M., Stuck, B.A., 2013. Pharyngeal chemosensitivity in patients with obstructive sleep apnea and healthy subjects. *Chem. Senses* 38 (7), 595–603. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjt031>.
- Hermer-Vazquez, R., Hermer-Vazquez, L., Srinivasan, S., Chapin, J.K., 2007. Beta-and gamma-frequency coupling between olfactory and motor brain regions prior to skilled, olfactory-driven reaching. *Exp. Brain Res.* 180 (2), 217–235. <https://doi.org/10.1007/s00221-007-0850-2>.
- Hernández-Soto, R., Rojas-García, K.D., Peña-Ortega, F., 2019. Sudden intrabulbar amyloid increase simultaneously disrupts olfactory bulb oscillations and odor detection. *Neural Plastic.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3424906>.
- Kang, J.M., Kim, S.T., Mariani, S., Cho, S.E., Winkelman, J.W., Park, K.H., Kang, S.G., 2020. Difference in spectral power density of sleep EEG between patients with simple snoring and those with obstructive sleep apnea. *Sci. Rep.* 10 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62915-x>.
- Kay, L.M., 2005. Theta oscillations and sensorimotor performance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (10), 3863–3868. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407920102>.
- Kay, L.M., 2015. Olfactory system oscillations across phyla. *Curr. Opin. Neurobiol.* 31, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.10.004>.
- Kay, L.M., Beshel, J., 2010. A beta oscillation network in the rat olfactory system during a 2-alternative choice odor discrimination task. *J. Neurophysiol.* 104 (2), 829–839. <https://doi.org/10.1152/jn.00166.2010>.
- Kay, L.M., Beshel, J., Brea, J., Martin, C., Rojas-Líbano, D., Kopell, N., 2009. Olfactory oscillations: the what, how and what for. *Trends Neurosci.* 32 (4), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.008>.
- Khuu, M.A., Pagan, C.M., Nallamothu, T., Hevner, R.F., Hodge, R.D., Ramirez, J.M., García, A.J., 2019. Intermittent hypoxia disrupts adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 39 (7), 1320–1331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1359-18.2018>.
- Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., Nishihara, M., Mori, Y., 2009. Main olfactory system mediates social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Eur. J. Neurosci.* 29 (4), 777–785. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06618.x>.
- Lagier, S., Carleton, A., Lledo, P.M., 2004. Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates  $\gamma$  oscillations in the rat olfactory bulb. *J. Neurosci.* 24 (18), 4382–4392. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5570-03.2004>.
- Le Pichon, C.E., Valley, M.T., Polymenidou, M., Chesler, A.T., Sagdullaev, B.T., Aguzzi, A., Firestein, S., 2009. Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat. Neurosci.* 12 (1), 60–69. <https://doi.org/10.1038/nn.2238>.
- Lepouez, G., Lledo, P.M., 2013. Odor discrimination requires proper olfactory fast oscillations in awake mice. *Neuron* 80 (4), 1010–1024. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.025>.
- Li, W., Li, S., Shen, L., Wang, J., Wu, X., Li, J., Tu, C., Ye, X., Ling, S., 2019. Impairment of dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb of APP/PS1 mice. *Front. Aging Neurosci.* 1, 2. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00002>.
- Liang, D., Li, G., Liao, X., Yu, D., Wu, J., Zhang, M., 2016. Developmental loss of parvalbumin-positive cells in the prefrontal cortex and psychiatric anxiety after intermittent hypoxia exposures in neonatal rats might be mediated by NADPH oxidase-2. *Behav. Brain Res.* 296, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.033>.
- Liang, D., Fan, F., Ding, W., Fang, Y., Hu, L., Lei, B., Zhang, M., 2020. Increased seizure susceptibility for rats subject to early life hypoxia might be associated with brain dysfunction of NRG1-ErbB4 signaling in parvalbumin interneurons. *Mol. Neurobiol.* 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02100-3>.
- Lietzau, G., Davidsson, W., Östenson, C.G., Chiazza, F., Nathanson, D., Pintana, H., Skogsberg, J., Klein, T., Nyström, T., Darsalia, V., Patrone, C., 2018. Type 2 diabetes impairs odour detection, olfactory memory and olfactory neuroplasticity; effects partly reversed by the DPP-4 inhibitor Linagliptin. *Acta Neuropathol. Commun.* 6 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0517-1>.
- Lockmann, A.L., Laplagne, D.A., Tort, A.B., 2018. Olfactory bulb drives respiration-coupled beta oscillations in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 48 (8), 2663–2673. <https://doi.org/10.1111/ejn.13665>.
- Lorea-Hernández, J.J., Morales, T., Rivera-Angulo, A.J., Alcantara-Gonzalez, D., Peña-Ortega, F., 2016. Microglia modulate respiratory rhythm generation and autoregulation. *Glia* 64 (4), 603–619. <https://doi.org/10.1002/glia.22951>.
- Ma, S., Mifflin, S.W., Cunningham, J.T., Morilak, D.A., 2008. Chronic intermittent hypoxia sensitizes acute hypothalamic-pituitary-adrenal stress reactivity and Fos induction in the rat locus coeruleus in response to subsequent immobilization stress. *Neuroscience* 154 (4), 1639–1647. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.068>.
- Macrides, F., Eichenbaum, H.B., Forbes, W.B., 1982. Temporal relationship between sniffing and the limbic theta rhythm during odor discrimination reversal learning. *J. Neurosci.* 2 (12), 1705–1717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.02-12-01705.1982>.
- Magliulo, G., De Vincentiis, M., Iannella, G., Ciofalo, A., Pasquariello, B., Manno, A., Angeletti, D., Polimeni, A., 2018. Olfactory evaluation in obstructive sleep apnoea patients. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 38 (4), 338–345. <https://doi.org/10.14639/0392-100X-1981>.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., Buck, L.B., 1999. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96 (5), 713–723. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80581-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80581-4).
- Martin, C., Ravel, N., 2014. Beta and gamma oscillatory activities associated with olfactory memory tasks: different rhythms for different functional networks? *Front. Behav. Neurosci.* 8, 218. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00218>.
- Martin, C., Gervais, R., Messaoudi, B., Ravel, N., 2006. Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition: a network activity. *Eur. J. Neurosci.* 23 (7), 1801–1810. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04711.x>.
- Martin, C., Beshel, J., Kay, L.M., 2007. An olfactory-hippocampal network is dynamically involved in odor-discrimination learning. *J. Neurophysiol.* 98 (4), 2196–2205. <https://doi.org/10.1152/jn.00524.2007>.
- Masurkar, A.V., Devanand, D.P., 2014. Olfactory dysfunction in the elderly: basic circuitry and alterations with normal aging and Alzheimer's disease. *Curr. Geriatrics Rep.* 3 (2), 91–100. <https://doi.org/10.1007/s13670-014-0080-y>.
- Miyamoto, T., Miyamoto, M., Iwanami, M., Suzuki, K., Inoue, Y., Hirata, K., 2009. Odor identification test as an indicator of idiopathic REM sleep behavior disorder. *Mov. Dis.* 24 (2), 268–273. <https://doi.org/10.1002/mds.22361>.
- Moraes, D.J., Machado, B.H., 2015. Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *J. Physiol.* 593 (3), 619–634. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283085>.
- Mosienko, V., Chang, A.J., Alenina, N., Teschemacher, A.G., Kasparov, S., 2017. Rodents and humans are able to detect the odour of L-lactate. *PLoS One* 12 (5), e0178478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178478>.
- Mukai, T., Nagao, Y., Nishioka, S., Hayashi, T., Shimizu, S., Ono, A., Sakagami, Y., Watanabe, S., Ueda, Y., Hara, M., Tokudome, K., Kato, R., Matsumura, Y., Ohno, Y., 2013. Preferential suppression of limbic Fos expression by intermittent hypoxia in obese diabetic mice. *Neurosci. Res.* 77 (4), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.09.013>.
- Muñoz-Torres, Z., Jiménez-Correa, U., Montes-Rodríguez, C.J., 2020. Sex differences in brain oscillatory activity during sleep and wakefulness in obstructive sleep apnea. *J. Sleep Res.* e12977. <https://doi.org/10.1111/jsr.12977>.
- Nanduri, J., Peng, Y.J., Wang, N., Khan, S.A., Semenza, G.L., Kumar, G.K., Prabhakar, N.R., 2017. Epigenetic regulation of redox state mediates persistent cardiorespiratory abnormalities after long-term intermittent hypoxia. *J. Physiol.* 595 (1), 63–77. <https://doi.org/10.1113/JP272346>.
- Neville, K.R., Haberly, L.B., 2003. Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J. Neurophysiol.* 90 (6), 3921–3930. <https://doi.org/10.1152/jn.00475.2003>.
- Osinski, B.L., Kay, L.M., 2016. Granule cell excitability regulates gamma and beta oscillations in a model of the olfactory bulb dendrodendritic microcircuit. *J. Neurophysiol.* 116 (2), 522–539. <https://doi.org/10.1152/jn.00988.2015>.
- Osinski, B.L., Kim, A., Xiao, W., Mehta, N.M., Kay, L.M., 2018. Pharmacological manipulation of the olfactory bulb modulates beta oscillations: testing model predictions. *J. Neurophysiol.* 120 (3), 1090–1106. <https://doi.org/10.1152/jn.00090.2018>.
- Payne, R.S., Goldbart, A., Gozal, D., Schurr, A., 2004. Effect of intermittent hypoxia on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1029 (2), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.09.045>.
- Peña-Ortega, F., 2013. Amyloid beta-protein and neural network dysfunction. *J. Neurodegen. Dis.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/657470>.
- Peña-Ortega, F., 2017. Neural network reconfigurations: Changes of the respiratory network by hypoxia as an example. In: *The Plastic Brain*. Springer, Cham, pp. 217–237. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_12).
- Peña-Ortega, F., 2019. Brain arrhythmias induced by amyloid beta and inflammation: involvement in Alzheimer's disease and other inflammation-related pathologies. *Curr. Alzheimer Res.* 16 (12), 1108–1131. <https://doi.org/10.2174/1567205017666191213162233>.
- Peña-Ortega, F., Bernal-Pedraza, R., 2012. Amyloid beta peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations. *Int. J. Pept.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/236289>.
- Radwan, B., Dvorak, D., Fenton, A.A., 2016. Impaired cognitive discrimination and discoordination of coupled theta-gamma oscillations in Fmr1 knockout mice. *Neurobiol. Dis.* 88, 125–138. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.01.003>.
- Ramirez, J.M., Garcia III, A.J., Anderson, T.M., Koschnitzky, J.E., Peng, Y.J., Kumar, G.K., Prabhakar, N.R., 2013. Central and peripheral factors contributing to obstructive sleep apneas. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 189 (2), 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.06.004>.
- Roberts, R.O., Christianson, T.J., Kremers, W.K., Mielke, M.M., Machulda, M.M., Vassilaki, M., Alhurani, R.E., Geda, Y.E., Knopman, D.S., Petersen, R.C., 2016. Association between olfactory dysfunction and amnesic mild cognitive impairment

- and Alzheimer disease dementia. *JAMA Neurol.* 73 (1), 93–101. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.2952>.
- Rojas-Libano, D., Kay, L.M., 2008. Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system. *Cogn. Neurodyn.* 2 (3), 179–194. <https://doi.org/10.1007/s11571-008-9053-1>.
- Rojas-Libano, D., Frederick, D.E., Egaña, J.L., Kay, L.M., 2014. The olfactory bulb theta rhythm follows all frequencies of diaphragmatic respiration in the freely behaving rat. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 214. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00214>.
- Rolls, E.T., 2005. Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake. *Physiol. Behav.* 85 (1), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.03.002>.
- Salihoğlu, M., Kendirli, M.T., Altundağ, A., Tekeli, H., Sağlam, M., Cayönü, M., Şenol, M. G., Özdağ, F., 2014. The effect of obstructive sleep apnea on olfactory functions. *Laryngoscope* 124 (9), 2190–2194. <https://doi.org/10.1002/lary.24565>.
- Salimi, M., Ghazvineh, S., Zare, M., Parsazadegan, T., Dehdar, K., Nazari, M., Mirnajafi-Zadeh, J., Jamaati, H., Raoufy, M.R., 2019. Distraction of olfactory bulb-medial prefrontal cortex circuit may induce anxiety-like behavior in allergic rhinitis. *PLoS one* 14 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221978> e0221978.
- Sanchez-Andrade, G., Kendrick, K.M., 2009. The main olfactory system and social learning in mammals. *Behav. Brain Res.* 200 (2), 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.021>.
- Saraiva, L.R., Kondoh, K., Ye, X., Yoon, K.H., Hernandez, M., Buck, L.B., 2016. Combinatorial effects of odorants on mouse behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (23), E3300–E3306. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605973113>.
- Slotnick, B., Restrepo, D., 2005. Olfactometry with mice. *Curr. Protocols Neurosci.* 33 (1), 8–20. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0820s33>.
- Smith, D.R., Burruss, D.R., Johnson, A.W., 2009. An assessment of olfaction and responses to novelty in three strains of mice. *Behav. Brain Res.* 201 (1), 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.01.024>.
- Takahashi, L.K., Nakashima, B.R., Hong, H., Watanabe, K., 2005. The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (8), 1157–1167. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.008>.
- Villasana-Salazar, B., Hernández-Soto, R., Guerrero-Gómez, M.E., Ordaz, B., Manrique-Maldonado, G., Salgado-Puga, K., Peña-Ortega, F., 2020. Chronic intermittent hypoxia transiently increases hippocampal network activity in the gamma frequency band and 4-Aminopyridine-induced hyperexcitability in vitro. *Epilepsy Res.* 106375. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2020.106375>.
- Wesson, D.W., Levy, E., Nixon, R.A., Wilson, D.A., 2010. Olfactory dysfunction correlates with amyloid- $\beta$  burden in an Alzheimer's disease mouse model. *J. Neurosci.* 30 (2), 505–514. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4622-09.2010>.
- Wilson, D.A., 1998. Habituation of odor responses in the rat anterior piriform cortex. *J. Neurophysiol.* 79 (3), 1425–1440. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.3.1425>.
- Wu, J., Liu, P., Chen, F., Ge, L., Lu, Y., Li, A., 2020. Excitability of neural activity is enhanced, but neural discrimination of odors is slightly decreased, in the olfactory bulb of fasted mice. *Genes* 11 (4), 433. <https://doi.org/10.3390/genes11040433>.
- Xiromeritis, A.G., Hatziefthimiou, A.A., Hadjigeorgiou, G.M., Gourgouliaris, K.I., Anagnostopoulou, D.N., Angelopoulos, N.V., 2011. Quantitative spectral analysis of vigilance EEG in patients with obstructive sleep apnoea syndrome: EEG mapping in OSAS patients. *Sleep Breath.* 15 (1), 121–128. <https://doi.org/10.1007/s11325-010-0335-6>.
- Yuan, L., Wu, J., Liu, J., Li, G., Liang, D., 2015. Intermittent hypoxia-induced parvalbumin-immunoreactive interneurons loss and neurobehavioral impairment is mediated by NADPH-oxidase-2. *Neurochem. Res.* 40 (6), 1232–1242. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1586-1>.
- Zhang, J., Hao, C., Jiang, J., Feng, Y., Chen, X., Zheng, Y., Liu, J., Zhang, Z., Long, C., Yang, L., Yang, L., 2018. The mechanisms underlying olfactory deficits in apolipoprotein E-deficient mice: focus on olfactory epithelium and olfactory bulb. *Neurobiology of Aging* 62, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.036>.
- Zhao, Y., Wang, B., Gao, Y., Zhao, Y., Xiao, Z., Zhao, W., Chen, B., Wang, X., Dai, J., 2007. Olfactory ensheathing cell apoptosis induced by hypoxia and serum deprivation. *Neuroscience letters* 421 (3), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.04.028>.
- Zhou, Y., Fang, F.H., Pan, P., Liu, Z.R., Ji, Y.H., 2017. Visual deprivation induce cross-modal enhancement of olfactory perception. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486 (3), 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.140>.



# Alterations in Piriform and Bulbar Activity/Excitability/Coupling Upon Amyloid- $\beta$ Administration *in vivo* Related to Olfactory Dysfunction

Ignacio Martínez-García, Rebeca Hernández-Soto, Benjamín Villasana-Salazar, Benito Ordaz and Fernando Peña-Ortega\*

*Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, UNAM-Campus Juriquilla, México*

Accepted 16 December 2020

Pre-press 14 January 2021

## Abstract.

**Background:** Deficits in odor detection and discrimination are premature symptoms of Alzheimer's disease (AD) that correlate with pathological signs in the olfactory bulb (OB) and piriform cortex (PCx). Similar olfactory dysfunction has been characterized in AD transgenic mice that overproduce amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ), which can be prevented by reducing A $\beta$  levels by immunological and pharmacological means, suggesting that olfactory dysfunction depends on A $\beta$  accumulation and A $\beta$ -driven alterations in the OB and/or PCx, as well as on their activation. However, this possibility needs further exploration.

**Objective:** To characterize the effects of A $\beta$  on OB and PCx excitability/coupling and on olfaction.

**Methods:** A $\beta$  oligomerized solution (containing oligomers, monomers, and protofibrils) or its vehicle were intracerebroventricularly injected two weeks before OB and PCx excitability and synchrony were evaluated through field recordings *in vivo* and in brain slices. Synaptic transmission from the OB to the PCx was also evaluated in slices. Olfaction was assessed through the habituation/dishabituation test.

**Results:** A $\beta$  did not affect lateral olfactory tract transmission into the PCx but reduced odor habituation and cross-habituation. This olfactory dysfunction was related to a reduction of PCx and OB network activity power *in vivo*. Moreover, the coherence between PCx–OB activities was also reduced by A $\beta$ . Finally, A $\beta$  treatment exacerbated the 4-aminopyridine-induced excitation in the PCx in slices.

**Conclusion:** Our results show that A $\beta$ -induced olfactory dysfunction involves a complex set of pathological changes at different levels of the olfactory pathway including alterations in PCx excitability and its coupling with the OB. These pathological changes might contribute to hyposmia in AD.

Keywords: Alzheimer's disease, coherence, hyperexcitability, local field potential, main olfactory bulb, olfactory function, piriform cortex

## INTRODUCTION

Olfactory processing relies on a recurrent network pathway that relays first in the olfactory bulb (OB) and then in the piriform cortex (PCx) [1–3]. Disruption of either of these circuits impairs odor perception [1–3], which is an early sign of Alzheimer's disease

---

\*Correspondence to: Fernando Peña-Ortega, PhD. Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, QRO, 76230, México. E-mail: jfpena@unam.mx.



(AD) [4, 5]. Olfactory dysfunction in AD precedes cognitive impairments [5–7] and includes deficits in odor detection and discrimination, possibly due to alterations in different olfactory circuits [7–11]. Similar olfactory dysfunctions observed in AD transgenic mice that overproduce amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) [12–15] correlate with neuroanatomical changes in the OB and PCx [16–20].

Histopathological markers of AD are observed throughout the olfactory pathway [21–23]. Neurofibrillary tangles [21, 24] and A $\beta$  deposits observed in the OB and PCx [23, 24] correlate with clinical symptoms in AD patients [22]. A similar scenario, but with some variability, can be found in AD transgenic mice that overproduce A $\beta$  [19, 25–28]. For instance, A $\beta$  deposition in the OB and PCx has been observed in Tg2576 transgenic mice [28, 29] and APP/PS1 double transgenic mice [16, 30]. Alternatively, triple transgenic mice (3xTg-AD) exhibit A $\beta$  accumulation in the PCx but not in the OB [31], while PLB4 transgenic mice exhibit A $\beta$  oligomer accumulation in the PCx, with no signs of plaque deposition [32]. Despite the differences in A $\beta$  presence, these AD transgenic mice exhibit olfactory dysfunctions [26, 28–32].

Olfactory dysfunction in AD transgenic mice that overproduce A $\beta$  can be prevented by reducing A $\beta$  levels or neutralizing A $\beta$  through pharmacological means [28, 33] or immunization [34, 35], respectively, suggesting that olfactory dysfunction in AD transgenic mice depends on A $\beta$  accumulation [28, 34–36]. To further support the notion that A $\beta$  is responsible for olfactory dysfunction in AD, we have shown that direct intrabulbar microinjection of A $\beta$  oligomers [37–39] induces a reduction in odor detection [37, 39], a function that mostly relies on the OB [40–42]. Interestingly, A $\beta$  oligomers also reduce odor habituation and discrimination [38, 39], which rely on both PCx activity and PCx–OB recurrent interactions [40–42].

Odor habituation and discrimination are affected in AD patients [43] and AD transgenic mice that overproduce A $\beta$  [29, 33–36], which correlates with 1) A $\beta$  accumulation in the PCx [29, 33, 35, 36], 2) functional imaging alterations in the PCx [43, 44] and 3) hyper- and hypoexcitability in the PCx of AD transgenic mice that overproduce A $\beta$  [28]. Thus, it is likely that A $\beta$  could directly affect PCx excitability and/or its interaction with the OB. To test this possibility, we evaluated the effects of A $\beta$  on PCx activity (simultaneously recorded with the OB), PCx–OB interactions and on their excitability. We found that A $\beta$  intracerebroventricular administration

reduces odor habituation and discrimination while reducing PCx and OB network activity and their coherence. We also found that A $\beta$  exacerbates the PCx response to the pro-convulsant 4-aminopyridine (4-AP) [45–47].

## MATERIALS AND METHODS

### *Ethics statement*

The experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology at UNAM and were performed in accordance with the guidelines of the Official Mexican Norm for the Use and Care of Laboratory Animals (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) and the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook (NIH publication 80–23, Bethesda, MD, USA, 1996).

### *Subjects*

Adult CD1 mice (8 weeks old; 30–35 g) were obtained from the breeding colony of the animal facility at the Institute of Neurobiology, UNAM. The mice were housed in groups of 3–4 animals in transparent acrylic cages and maintained in a *vivarium* with controlled temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), as well as with food and water *ad libitum*. Animals were kept under a normal 12 h light–12 h dark cycle.

### *A $\beta$ preparation*

A $\beta_{1-42}$  was obtained from American Peptide (Sunnyvale, CA). Oligomerization was performed as previously described [39, 48]. Briefly, solid A $\beta_{1-42}$  peptide was dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) at a final peptide concentration of 1 mM and incubated for 60 min at room temperature. HFIP was evaporated overnight, and DMSO was added to prepare a 5 mM solution. Such solution was then diluted with F12 medium to reach a final concentration of 100  $\mu\text{M}$ . This solution was incubated at  $5^\circ\text{C}$  for 24 h and then centrifuged at 14,000 rpm at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min. The supernatant was collected and maintained at  $4^\circ\text{C}$  until used for experiments. The composition of the oligomerized A $\beta_{1-42}$  solution used for this study was corroborated with standard electrophoresis followed by silver staining, which exhibits the presence of A $\beta$  oligomers, monomers, and protofibrils (Fig. 1C; inset) [39, 48]. For this study, we administered A $\beta$  into the cerebrospinal fluid (CSF) at a dose of 500 pmoles [49]. We

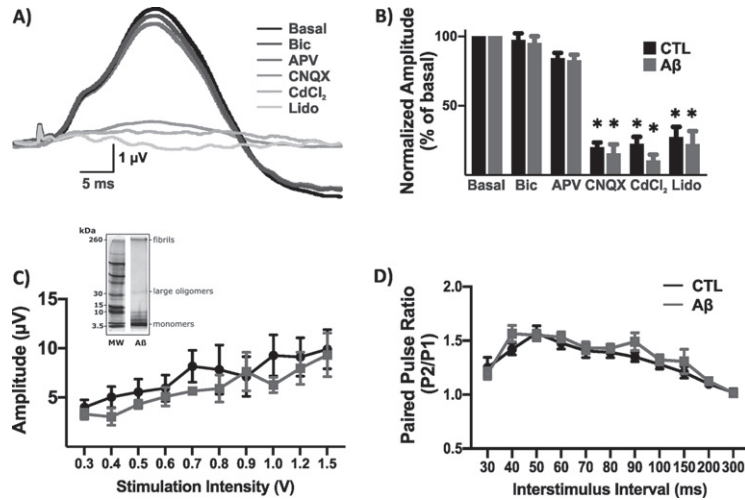


Fig. 1. Synaptic transmission from the OB to the PCx *ex vivo* is not affected by intracerebral A $\beta$  injection. A) Representative fEPSPs recorded in the PCx layer II evoked by LOT stimulation (in OB-PCx slices) under basal conditions and in the presence of synaptic blockers as follows: bicuculline (Bic) 50  $\mu$ M, APV 100  $\mu$ M, CNQX 6  $\mu$ M, CdCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M, and lidocaine 1 mM (Lido). B) Quantification of the remnant of the normalized fEPSP amplitude (basal set as 100%) after the sequential application of synaptic blockers in slices obtained from control animals (injected with F12 medium; CTL; black) and from A $\beta$ -injected animals (gray). \* $p$  < 0.05 denotes a significant difference versus basal. C) Stimulus-response curves of the EPSPs recorded in slices obtained from CTL and A $\beta$ -injected animals (same color code). Inset: Silver-stained gel of the electrophoretic pattern of the A $\beta$  oligomerized solution (right lane; monomers, dimers, trimers/tetramers, and heptamers/octamers are the main oligomeric forms) along with a molecular-weight (MW) size marker (left lane). D) Paired pulse ratio (P2/P1) as a function of the interstimulus interval (ISI) in slices obtained from CTL and A $\beta$ -injected animals (same color code). No differences were observed between the groups in any of the stimulation intensities or interstimulus intervals used.

chose this dose based on three previous experimental observations. First, we showed that 200 pmoles of A $\beta$  induces olfactory dysfunction when applied directly into the OB [37, 39]. Secondly, we already know that, when applied into the CSF, increasing A $\beta$  dose by 2.5-fold produces similar effects than those induced by its local application [50, 51]. Moreover, intraventricular injection of A $\beta$  500 pmoles is enough to induce olfactory dysfunction in mice, by reaching different circuits, while a lower dose did not induce alterations [49].

#### A $\beta$ administration, electrode implantation, and recording *in vivo*

Animals were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (4 mg/kg) (*i.p.*). Mice were also administered (*s.c.*) saline solution (0.9%) (15 ml/Kg). After verifying anesthesia depth (absence of tail pinch and pedal reflexes), animals were affixed to a stereotaxic frame (Stoelting Co. IL). A $\beta$  (500 pmoles) or its vehicle (F12 medium) was intracerebroventricularly microinjected at the following coordinates: AP = -0.2, L =  $\pm$  1, V = 2.5 [52]. A stainless-steel needle connected to a Hamilton microsyringe (10  $\mu$ l) (Hamilton Company) by

plastic tubing was used for the microinjection. An infusion volume of 5  $\mu$ l at 0.5  $\mu$ l/min was controlled by a microinfusion pump (WPI 220i). After the infusion, the needle remained inside the ventricle for at least 5 min to ensure proper diffusion of the injected content. A subgroup of injected animals was sutured, treated with an analgesic (meloxicam; 2 mg/kg; *i.m.*), and allowed to recover from the surgical procedure for 2 weeks before any behavioral or electrophysiological evaluation. After microinjection of either A $\beta$  or its vehicle, a subgroup of injected animals was implanted with recording electrodes, as follows, to perform electrophysiological evaluations *in vivo* while awake. A bipolar electrode, made of two parallel strands of stainless steel (California Fine Wire), insulated except for their tip, was implanted into the PCx at the following coordinates: AP = 1.94, L =  $\pm$  2.1, V = 4.8 [52]. A second bipolar electrode, with identical characteristics, was implanted into the OB at the following coordinates: AP = 4.8, L =  $\pm$  0.7, V = 1.6 [52]. These electrodes were attached to a male connector pin for subsequent connection to the electrophysiological recording system. Two stainless steel screws were threaded into the cranium over the cerebellum (coordinates AP = -10.0, L =  $\pm$  3.0 and V = 1.0) to ground the signal and support the

implanted electrodes. The arrangement of electrodes, screws and connector was fixed to the skull with dental acrylic (MDC Dental-NicTone R3V). Animals were treated with an analgesic (meloxicam; 2 mg/kg; i.m.) and allowed to recover from the surgical procedure for 2 weeks before any further experimental manipulation.

#### *Electrophysiological recordings in vivo*

Two weeks after A $\beta$  or F12 medium was administered, the local field potential (LFP) was simultaneously measured in the OB and PCx while animals were freely moving. These animals were introduced into a new cage, with identical characteristics as their home cage but with clean sawdust, located inside a Faraday cage. LFPs were recorded for 30 min while animals remained at rest in this new cage. The signals were amplified, filtered (high-pass, 0.1 Hz; low-pass, 0.75 kHz; Grass Instruments) and digitized at 10 kHz (Digidata, Molecular Devices).

#### *OB-PCx slice preparation*

Two weeks after either A $\beta$  or F12 medium was administered, the non-implanted animals were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital (70 mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with cold modified artificial cerebrospinal fluid (aCSF), containing 238 mM sucrose, 3 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 30 mM D-glucose, pH 7.4 and bubbled with carbogen (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). The brain was extracted and dissected in ice-cold normal aCSF containing 119 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 30 mM D-glucose, pH 7.4 and bubbled with carbogen. OB-PCx slices were obtained as previously described [53]. Briefly, one hemisphere was mounted on a plastic block, with the characteristics described by McGinley and Westbrook [53], to obtain a single parasagittal 400  $\mu$ m thick slice preserving the connectivity between the ventral anterior PCx and the OB through the lateral olfactory tract (LOT). The slices were allowed to recover in bubbled aCSF at room temperature for at least 60 min before any experimental manipulation.

#### *Electrophysiological recordings in vitro*

For LFP recordings, brain slices were transferred to a chamber that was continuously perfused with oxygenated aCSF maintained at 30–32°C. LFP was recorded with borosilicate electrodes (1 M $\Omega$ ) filled

with aCSF and positioned on anterior PCx layer II and the OB granular cell layer [37]. LFP was recorded for 20 min to obtain the basal network activity in both structures. Thereafter, 4-AP (100  $\mu$ M) [47, 54] was added to the bath and its effects were evaluated for 45 min. Finally, 1 mM lidocaine was applied to block neural activity and confirm the viability of each slice [55]. The signals were amplified, filtered (high-pass, 0.1 Hz; low-pass, 0.75 kHz; Grass Instruments) and digitized at 10 kHz (Digidata, Molecular Devices).

Synaptic transmission between the OB and PCx, and its short-term plasticity, was evaluated by recording the field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) using the paired pulse protocol *in vitro* [55, 56], in slices obtained from A $\beta$  and F12 medium microinjected animals. In the same OB-PCx slices, a concentric bipolar platinum electrode (75  $\mu$ m diameter at the tip) was placed on the LOT, near its origin in the OB, while evoked fEPSPs were recorded in PCx layer II upon LOT voltage square pulse (100  $\mu$ s, 0.1 Hz) stimulation. Any given stimulation was repeated 5 times and the averaged fEPSP was included in each data set. The stimulus intensity was increased from 0.3 to 1.5 V (by 0.1 V steps) to evaluate the input/output (I/O) relationship in this synaptic connection [55, 56]. With the stimulus intensity adjusted to induce an fEPSP with 30–50% of the maximal amplitude, paired pulses were applied with an interstimulus interval (ISI) between 30 ms and 300 ms to evaluate the short-term plasticity of this synaptic connection [55, 56]. The paired pulse ratio (PPR) was calculated as follows: P2/P1, where P2 is the amplitude of the second fEPSP and P1 is the amplitude of the first one [55, 56]. After recording the fEPSP under basal conditions, at 30–50% of the maximal amplitude, several drugs were bath applied to evaluate the synaptic components of the fEPSP. To reveal a contribution of GABA<sub>A</sub>-dependent transmission to the fEPSP, we bath applied its antagonist bicuculline (Bic 50  $\mu$ M; Sigma-Aldrich) [57, 58] and measured its effect for 10 min. Then, to evaluate the contribution of NMDA glutamate receptors to the fEPSP, we bath applied their antagonist APV (100  $\mu$ M; Sigma-Aldrich) [59, 60] and measured its effect for 10 min. To evaluate the contribution of non-NMDA glutamate receptors to the fEPSP, we bath applied their antagonist CNQX (6  $\mu$ M; Sigma-Aldrich) [61, 62] and measured its effect for 10 min. In an independent set of experiments, performed in OB-PCx slices obtained from naïve animals, the same set of fEPSPs and evaluations were recorded under control conditions as well as 60 min after the continuous presence of A $\beta$  (30 nM)

in the recording bath. At the end of all evaluations, CdCl<sub>2</sub> (200  $\mu$ M) and lidocaine (1 mM) were sequentially added to the bath to block synaptic transmission and neural activity, respectively [63]. The signals were amplified, filtered (high-pass, 0.1 Hz; low-pass, 0.75 kHz; Grass Instruments) and digitized at 10 kHz (Digidata, Molecular Devices).

#### *Habituation/dishabituation test*

Odor habituation and discrimination were evaluated through the habituation-dishabituation test, as described previously [38]. Briefly, mice were habituated to the experimental cage for 30 min. Next, a swab attached to a removable holder was presented at the side of the cage for 3 min. The tip of the swab was impregnated with either water (5  $\mu$ l) or an odor (acetic acid or vanilla; 5  $\mu$ l). This procedure was repeated several times with 1 min intervals. In the first two exposures the swab contained water. In the third trial the swab randomly contained either acetic acid (100% v/v; Herdez Company) or vanilla odor (100 % v/v; Herdez Company). The odor selected for the third trial was repeated in the fourth and fifth trials (always with 1 min intervals between trials), constituting an odor block. At the end of the first odor block, in the sixth trial, the other odor was presented. The odor selected for the sixth trial was repeated in the seventh and eighth trials (second odor block). To quantify the exploration time of each stimulus, exploration was considered when the mouse's nose remained sniffing within 2 cm of swab. The habituation phase of the test evaluates the reduction in time that mice spend smelling on each repeated stimulus with the same odor, whereas the dishabituation phase of the test evaluates whether the mice were able to spontaneously recognize a novel odorant stimulus by spending more time smelling the swab that contains it [38].

#### *Data analysis and statistics*

Data distribution was assessed with the Shapiro-Wilk normality test. When the assumptions for parametric testing were not reached, non-parametric tests were used. Electrophysiological recordings were analyzed off-line. The amplitude of the fEPSP was measured from the end of the stimulus artifact to the fEPSP peak with Clampfit software (v.10.7, Molecular Devices). For the pharmacological experiments, the amplitude of the fEPSP recorded under basal conditions was set as 100% and the amplitude of

the subsequent fEPSP in the presence of any drug was measured as % of basal. For statistical comparisons of these pharmacological experiments, an ANOVA test followed by Dunnett's correction was performed. For the comparisons of the I/O curves or the PPR curves of both experimental groups (F12 medium versus A $\beta$ ) we used a two-way ANOVA test. To compare the effects of A $\beta$  bath application on fEPSP amplitude or PPR, we used a *t*-test for independent groups.

For the spontaneous network activity, a power spectrum analysis was performed using the Rapid Fourier Transform Algorithm with a Hamming window using Clampfit. Ten segments (10 s long) were analyzed and averaged. The power of the broad-frequency band (1–55 Hz) of each individual experiment under basal conditions (i.e., activity before 4-AP application) was set as 100% and the activity in the presence of 4-AP 100  $\mu$ M was quantified as % of basal. Then, a Mann-Whitney U test was performed to compare the power before and after 4-AP application. Spontaneous population spikes induced by 4-AP were detected manually and their amplitude and frequency were measured with Clampfit. The power of population spikes was also normalized to basal condition (defined as the 100%) and analyzed using a Mann-Whitney U test. The *in vivo* LFP power spectra were segmented into the following frequency bands: delta (1–3 Hz), theta (3–12 Hz), beta (13–35 Hz), and gamma (36–55 Hz). Aside from raw power, relative power was calculated as the percentage contributed by each frequency to the total power in the broad-frequency band (1–55 Hz). These data were analyzed with the Mann-Whitney U test. The coherence between the activities of the OB and the PCx was measured using the function “mscohere” in MATLAB software (R2020a). Coherence was averaged in the following frequency bands: delta (1–3 Hz), theta (3–12 Hz), beta (13–35 Hz), and gamma (36–55 Hz). Coherence was analyzed with an ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons.

Behavioral parameters were analyzed using a two-way ANOVA followed by Fisher's LSD *post-hoc* test to evaluate the habituation between the first odor stimulus and the last stimulus of each odor block and the cross-habituation comparing the third odor stimulus of a block with the first stimulus of the second block. The cross-habituation index was also calculated by subtracting the normalized exploratory time of the last stimulus of an odor block to the normalized investigatory time of the next odor block [33]. These cross-habituation values were compared using a Mann-Whitney U test. GraphPad Prism

(version 8.0) software was used for graphs and statistical analysis. Data are presented as the mean  $\pm$  EEM. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### *Synaptic transmission between the OB and the PCx is not affected by injection of A $\beta$ in vivo*

Stimulation of the LOT in OB-PCx slices evoked a typical glutamatergic fEPSP in PCx layer II (Fig. 1A), which was mediated by non-NMDA receptors, but not by NMDA receptors, and with no contribution of GABAergic transmission (Fig. 1A, B). This fEPSP was blocked by bath application of the non-NMDA glutamate receptor CNQX 6  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ; Fig. 1A, B), but was not altered by the previous sequential application of the GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline 50  $\mu$ M ( $p = 0.9$ ,  $n = 5$ ; Fig. 1A, B) and the NMDA glutamate receptor antagonist APV 100  $\mu$ M ( $p = 0.9$ ,  $n = 5$ ; Fig. 1A, B). As expected, the fEPSP was blocked by the bath application of both CdCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M and lidocaine 1 mM ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ; Fig. 1A, B). As mentioned, CNQX 6  $\mu$ M caused a significant decrease in the fEPSP amplitude of  $79 \pm 7\%$  in the control group (injected with F12 medium) and  $84 \pm 7\%$  in the group injected with A $\beta$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ; Fig. 1B). These reductions in fEPSP amplitude induced by CNQX were not different between groups ( $p > 0.05$ ,  $n = 5$ ; Fig. 1B). No significant differences were observed between groups in the presence of any of the other transmission blocker tested ( $p > 0.05$ ,  $n = 5$ ; Fig. 1B). The A $\beta$  group was previously injected intracerebroventricularly with an oligomerized solution containing oligomers, monomers and protofibrils (Fig. 1C; inset) [39, 48].

In order to evaluate the consequences of A $\beta$  exposure *in vivo* on synaptic transmission in the OB-PCx connection *ex vivo* (in slices), the I/O relationships were evaluated in OB-PCx slices obtained from control animals (injected with F12 medium) and A $\beta$ -injected animals (Fig. 1C). We found no significant differences in the I/O relationships between groups ( $p = 0.9$ ,  $n = 9$ ; Fig. 1C). In order to evaluate the effects of A $\beta$  exposure *in vivo* on short-term plasticity of the OB-PCx connection *ex vivo*, the PPR as a function of inter-stimulus interval (ISI) relationships were evaluated in slices obtained from control animals (injected with F12 medium) and A $\beta$ -injected animals (Fig. 1D). We found no significant differences in the PPR/ISI relationships between groups ( $p = 0.8$ ,  $n = 9$ ; Fig. 1D).

### *Synaptic transmission between the OB and the PCx is not affected by acute application of A $\beta$ in vitro*

Considering that A $\beta$  microinjection *in vivo* did not affect synaptic transmission between the OB and the PCx two weeks after its application, we evaluated the sensitivity of this connection to the bath application of A $\beta$  *in vitro*. In OB-PCx slices obtained from naïve animals, the amplitude of the fEPSP recorded in the PCx layer-II exhibited an amplitude of  $6.7 \pm 0.7 \mu$ V (Fig. 2A, C) and a PPR of  $1.5 \pm 0.07$  (Fig. 2A, B) which remained unaltered 1 h after the continuous presence of A $\beta$  30 nM, since the fEPSP maintained an amplitude of  $6.8 \pm 0.7 \mu$ V ( $101 \pm 4\%$  of basal;  $p > 0.7$ ,  $n = 7$ ; Fig. 2A-D) and a PPR of  $1.5 \pm 0.09$  ( $p > 0.9$ ,  $n = 7$ ; Fig. 2A, B).

### *A $\beta$ in vivo treatment exacerbates 4-AP-induced hyperexcitability only in the PCx ex vivo*

To evaluate the effect of A $\beta$  on PCx excitability we recorded its spontaneous LFP and induced hyperexcitation by bath application of 4-Aminopyridine (4-AP 100  $\mu$ M) [47, 54]. Bath application of 4-AP induces hyperexcitation in slices obtained from control animals (injected with F12 medium) and A $\beta$ -injected animals (Fig. 3A), leading to the generation of spontaneous population spikes in the PCx, more potently in slices obtained from A $\beta$ -injected animals than in slices obtained from control animals (Fig. 3A). In the slices obtained from A $\beta$ -injected animals, the 4-AP-induced population spikes exhibited a significantly higher amplitude ( $200.9 \pm 58.3 \mu$ V;  $n = 8$ ; Fig. 3C), frequency ( $0.18 \pm 0.04$  Hz;  $n = 8$ ; Fig. 3D) and increase in power ( $7.8 \pm 4.0 \times 10^4\%$  of basal;  $n = 8$ ; Fig. 3B) than the population spikes obtained from control animals ( $70.1 \pm 16.8 \mu$ V,  $0.07 \pm 0.02$  Hz and  $7.3 \pm 2.8 \times 10^3\%$  of basal, respectively,  $n = 9$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 3).

In contrast to what we observed in the PCx, 4-AP-induced hyperexcitation tended to be smaller in OB-PCx slices obtained from control animals (injected with F12 medium) than slices obtained from A $\beta$ -injected animals (Fig. 4). In the OB, 4-AP-induced excitation lead to medium-voltage slow activity that increased the power to  $3.2 \pm 2.4 \times 10^4\%$  of basal in OB-PCx slices obtained from control animals, which was higher but not significantly different ( $p = 0.1$ ) than the increase in power (to  $2.2 \pm 1.1 \times 10^3\%$  of basal) in OB-PCx slices obtained from A $\beta$ -injected animals.

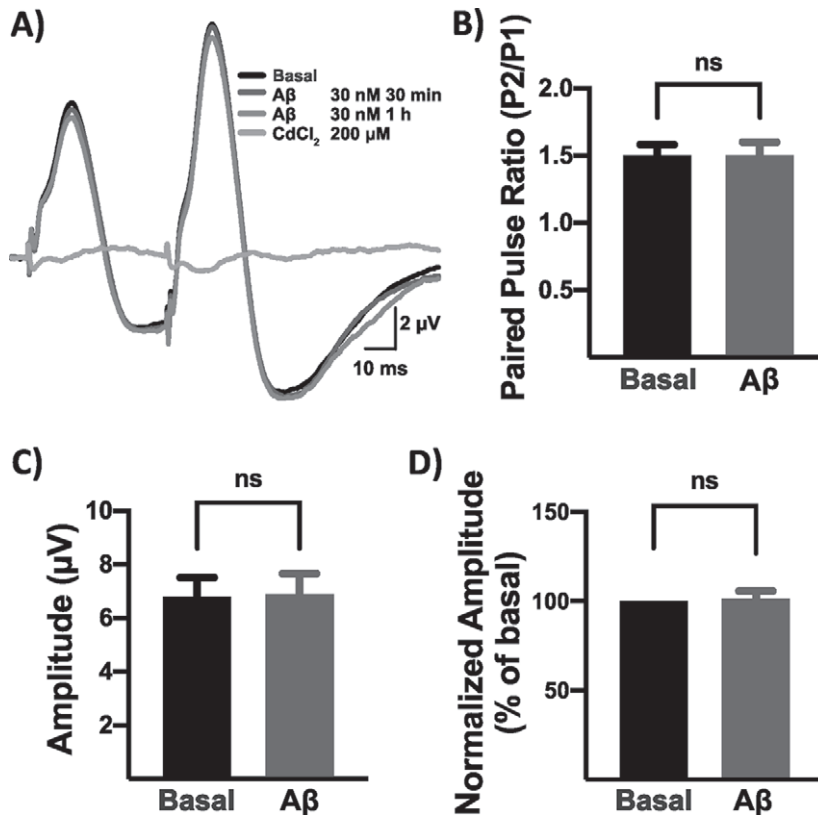


Fig. 2. Synaptic transmission from the OB to the PCx is not sensitive to A $\beta$  application *in vitro*. A) Representative fEPSPs recorded in the PCx layer II evoked by a paired LOT stimulation (in OB-PCx slices) under basal conditions 30 min and 1 h after A $\beta$  30 nM bath application and after CdCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M application. B) Quantification of the paired pulse ratio of the paired fEPSPs recorded under basal conditions and 1 h after A $\beta$  application. C) Quantification of the fEPSP amplitude of the first EPSP recorded under basal conditions and 1 h after A $\beta$  application. D) Normalized fEPSP amplitude recorded under basal conditions (set as 100%) and 1 h after A $\beta$  application. "ns" ( $p > 0.05$ ) denotes the absence of a significant difference between conditions.

#### OB and PCx network activity and coherence are depressed by injection of A $\beta$ *in vivo*

When we evaluated the effect of A $\beta$  injection *in vivo* on the spontaneous LFP in freely moving animals, we observed that two weeks after A $\beta$  administration the activity of both the OB and the PCx exhibited a reduction in amplitude (Fig. 5A). The quantification of power in the theta (3–12 Hz), beta (13–35 Hz), and gamma (36–55 Hz) frequency bands exhibited a significant reduction in A $\beta$ -injected animals compared to control animals (injected with F12 medium) ( $p < 0.05$ ,  $n = 15$ ; Fig. 5B, D). However, no differences in the delta frequency band (<3 Hz) were observed between groups ( $p > 0.1$ ,  $n = 15$ ; Fig. 5B, D). Moreover, the relative power in all frequency bands did not show differences between groups ( $p > 0.2$ ,  $n = 15$ ; Fig. 5C, E).

As a proxy for functional communication between the OB and the PCx, we evaluated the effect of A $\beta$  administration *in vivo* on their synchrony in freely moving animals. For this purpose, we measured the coherence of both signals (Fig. 6) and found that the coherence of OB-PCx activities was reduced in A $\beta$ -injected animals in the fast frequency components of the spectrum (Fig. 6A). The control group showed a coherence value of  $0.30 \pm 0.01$  for the beta frequency band (13–35 Hz), which was significantly higher than the coherence recorded in A $\beta$ -injected animals ( $0.19 \pm 0.01$ ;  $p = 0.02$ ,  $n = 15$ ; Fig. 6B). This was similar for the gamma frequency band (36–55 Hz), as the control group showed a coherence value of  $0.29 \pm 0.03$ , which was significantly higher than the coherence recorded in A $\beta$ -injected animals ( $0.18 \pm 0.01$ ;  $p = 0.04$ ,  $n = 15$ ; Fig. 6B). In addition, the theta band showed a

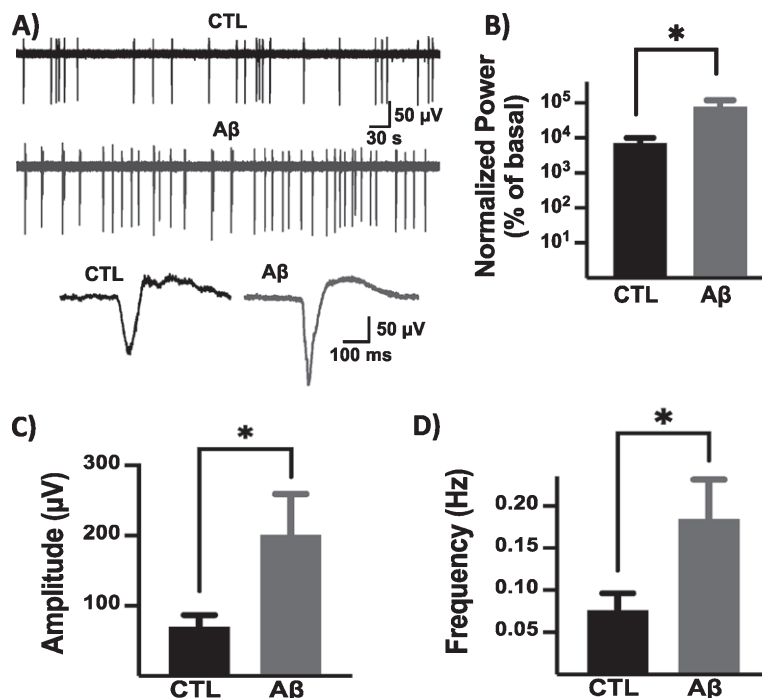


Fig. 3. A $\beta$  treatment exacerbates 4-AP-induced hyperexcitability in the PCx. A) Representative traces of the PCx local field potential in the presence of 4-AP (100  $\mu$ M) in OB-PCx slices obtained from control animals (injected with F12 medium; CTL; upper trace) and A $\beta$ -injected animals (A $\beta$ ; middle trace). The lower traces showed a representative population spike from each group. B) Normalized population spike power measured as % of basal activity (set as 100%) for the CTL (black) and A $\beta$  (gray) groups. C) Mean amplitude of the population spikes for both groups (same color code). D) Quantification of the population spike frequencies for both groups (same color code). \* $p < 0.05$  denotes a significant difference between experimental groups.

tendency toward a lower coherence value for the A $\beta$ -injected group ( $0.25 \pm 0.01$ ) compared to the control group ( $0.35 \pm 0.03$ ;  $p = 0.052$ ,  $n = 15$ ; Fig. 6B).

#### A $\beta$ disrupts odor habituation and discrimination

Since proper communication between the OB and the PCx is necessary for discrimination and olfactory learning [28, 33, 64], we evaluated whether A $\beta$  alters the habituation/dishabituation performance. We also evaluated if the implantation of electrodes in both structures affected these functions (Fig. 7). Control animals (injected with F12 medium) exhibited reduced exploration time after repeated presentations of the same odor ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$ ; Fig. 7A), which indicates odor habituation [38]. In contrast, animals injected with A $\beta$  did not exhibit a significant reduction in the exploration time between the first and last odor presentation in each block ( $p > 0.1$ ,  $n = 10$ ; Fig. 7A), which indicates that these animals are not capable of olfactory habituation [38]. We assessed odor discrimination by evaluating odor cross-habituation (i.e., difference between the

explorations of a habituated odor and a newly presented odor) through the cross-habituation index [33]. Thus, the increased investigation time (higher cross-habituation index) reflects discrimination between odors, whereas lower investigation times (small cross-habituation index) reflect generalization or a failure to discriminate [33]. We found that control animals (injected with F12 medium) significantly increased the exploration time of a newly presented odor ( $p < 0.05$ ;  $n = 10$ ; Fig. 7A) and exhibited a high cross-habituation index ( $0.93 \pm 0.02$ , Fig. 7B). In contrast, A $\beta$ -injected animals did not show a change in the investigation time of the new odor (Fig. 7A) and exhibited a small cross-habituation index ( $0.11 \pm 0.3$ ,  $p = 0.001$ ,  $n = 10$ ; Fig. 7B), indicating that they are not capable of odor discrimination. These results suggest that the animals treated with A $\beta$  present deficiencies in odor habituation and olfactory discrimination [33]. An identical scenario was observed in implanted animals ( $n = 11$ ; Fig. 7C, D), demonstrating that the damage produced by electrodes introduced in the OB and PCx do not interfere with the described phenomena.



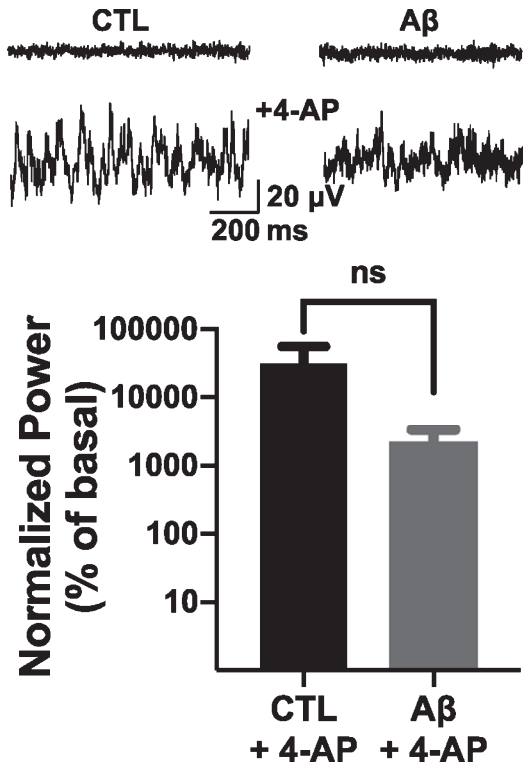


Fig. 4. Lack of effect of A $\beta$  treatment on 4-AP-induced hyperexcitability in the OB. Representative traces of OB local field potential under basal conditions (upper traces) and in the presence of 4-AP 100  $\mu$ M (lower traces) in OB-PCx slices obtained from control animals (injected with F12 medium; left traces) and A $\beta$ -injected animals (right traces). The quantification of normalized power, measured as % of basal activity (set as 100%), during 4-AP-induced hyperexcitability for both experimental groups is also shown. "ns" ( $p=0.1$ ) denotes the absence of a significant difference between experimental groups.

## DISCUSSION

In the present study, we show that intracerebral administration of an A $\beta$  oligomerized solution, containing oligomers, monomers and protofibrils (Fig. 1C; inset) [39, 48] disrupts odor habituation and discrimination while reducing both OB and PCx network activity, as well as their coherence (Fig. 8). We also found that after A $\beta$  treatment the PCx exhibited an exacerbated 4-AP-induced excitation, while the OB tended to be less excitable. Our results indicate that A $\beta$ -induced olfactory dysfunction involves complex changes at different levels of the olfactory pathway, including modifications in PCx excitability and its coupling with the OB (Fig. 8). As we have done before [50, 63], F12 medium injection was used for control experiments. Despite that the injec-

tion of the reverse A $\beta$  sequence would constitute a more accurate test for A $\beta$  specificity [39, 55], vehicle application still allows to control for a variety of experimental manipulations used in studies like ours [49, 50, 63, 65].

Our finding that intracerebral A $\beta$  administration reduces odor habituation and discrimination coincides with similar observations in AD patients [43] and AD transgenic animals that overproduce A $\beta$  [29, 33–36], but goes a bit further to show that a two-week-long increase in A $\beta$  is enough to induce this disruption in OB and PCx network activity (Fig. 8). A similar timeline was observed for the olfactory disruption induced by intrabulbar A $\beta$  application [37, 38] or by intraventricular A $\beta$  application [49], which correlates with signs of oxidative stress and neurodegeneration in the OB and the hippocampus [49]. Studies in AD transgenic animals, which are a closer proxy to the chronic and insidious nature of AD neuropathology and of long-term A $\beta$ -induced effects [66–68], have shown that olfactory dysfunction coincides with A $\beta$  accumulation in the PCx [29, 33, 35, 36] and that this disruption can be reversed by reducing A $\beta$  levels [28, 34–36]. Our data, and those just described, strongly suggest that A $\beta$  accumulation is sufficient and necessary for the induction of olfactory dysfunction in AD animal models and perhaps in AD (Fig. 8). It is likely that these A $\beta$ -induced olfactory deficits are the consequence of a variety of functional alterations, although cell-damage cannot be discarded [49], that are going to be discussed next. Before, is worth mentioning that A $\beta$  injection *in vivo* or its bath application *in vitro* did not affect synaptic transmission from the OB to the PCx, which is similar to the lack of effect of A $\beta$  in basal synaptic transmission in different circuits [63, 69–71].

The observation that A $\beta$  induces a reduction in the power of neural network activity in both the OB and the PCx (Fig. 8), coincides with previous findings that acute [37, 48, 55, 72, 73] and chronic [38, 63, 74] A $\beta$  exposure reduces neural network activity, *in vitro* and *in vivo*, in a variety of circuits including the hippocampus [48, 55, 63, 72, 73], the entorhinal cortex [75] and the prefrontal cortex [76]. Moreover, we have previously shown that acute [37, 39] and chronic [38] A $\beta$  presence reduces network activity in the OB. However, here we demonstrated for the first time that this phenomenon is also present in the PCx and might contribute to olfactory dysfunction (Fig. 8). It is likely that this reduction in PCx network activity involves changes in synaptic transmission [48, 55, 77–79] and in intrinsic neuronal properties [55, 66,



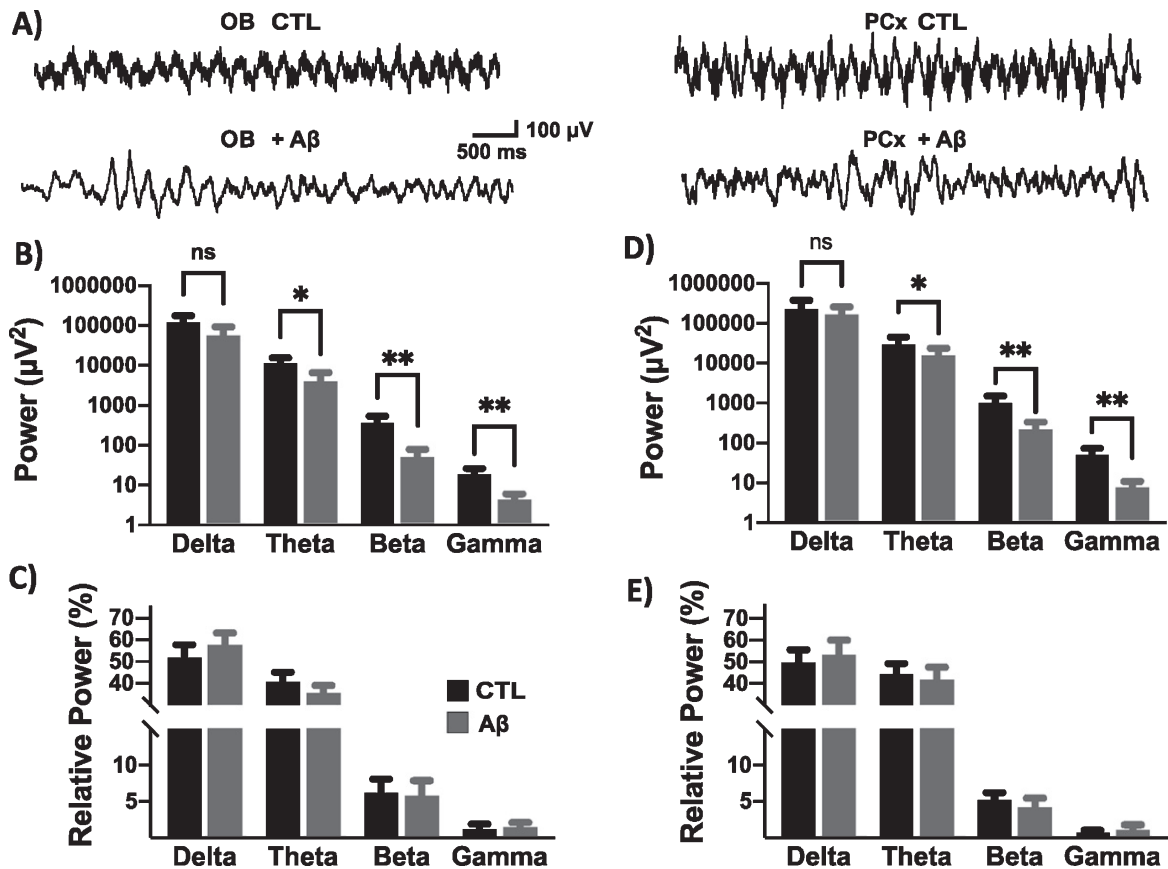


Fig. 5. PCx and OB network activity is depressed by A $\beta$  injection *in vivo*. A) Representative traces of spontaneous network activity in the OB (left traces) and PCx (right traces) obtained from control (F12-injected; CTL; upper traces) and A $\beta$ -injected (lower traces) freely moving animals. B) Quantification of the power of OB activity in CTL (black) and A $\beta$  (gray) animals in the following frequency bands: delta (1–3 Hz), theta (3–12 Hz), beta (13–35 Hz), and gamma (36–55 Hz). C) OB Relative power for the same frequency bands and experimental groups (same color code). D) Same as B but for the PCx. E) Same as C but for the PCx. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  denotes a significant difference between experimental groups. “ns” ( $p > 0.05$ ) denotes the absence of a significant difference between experimental groups.

80–82] that need to be specifically characterized in the PCx.

As observed for A $\beta$  in the present study, similar alterations of PCx activity induced by *APOE4* expression also correlate with olfactory dysfunction [83]. Thus, the PCx is likely a neural circuit that is highly sensitive to pathological conditions [83], including A $\beta$  accumulation [84]. In fact, A $\beta$  application reduces antioxidant defenses in the PCx [84], which could make it prone to dysfunction and/or to oxidative stress and neurodegeneration [49]. Another mechanism that might contribute to A $\beta$ -induced PCx dysfunction is neuroinflammation [32, 85], since the hypometabolic activity in the PCx observed in AD transgenic mice [44], and the associated olfactory dysfunction [32], have been closely related to gliosis. Neuroinflammatory conditions can

be induced directly by A $\beta$  and can contribute to the induction of neural network dysfunction [85]. Alternatively, A $\beta$ -induced PCx depression could also involve the activation of pathological intracellular pathways leading to the recruitment of GSK3 $\beta$  [19, 38, 75, 86]. In fact, GSK3 $\beta$  is accumulated in the PCx of AD transgenic mice that overproduce A $\beta$  [19] and is activated upon A $\beta$  presence [38, 75, 86]. Moreover, pharmacological and non-pharmacological GSK3 $\beta$  inhibition can prevent the A $\beta$ -induced depression of neural network activity in a variety of neural circuits [38, 75, 86], including the OB [38]. It is likely that GSK3 $\beta$  contributes to AD pathology, including olfactory loss. All these mechanisms, and others, need to be evaluated to reveal the cellular and molecular mechanism underlying A $\beta$ -induced olfactory dysfunction.

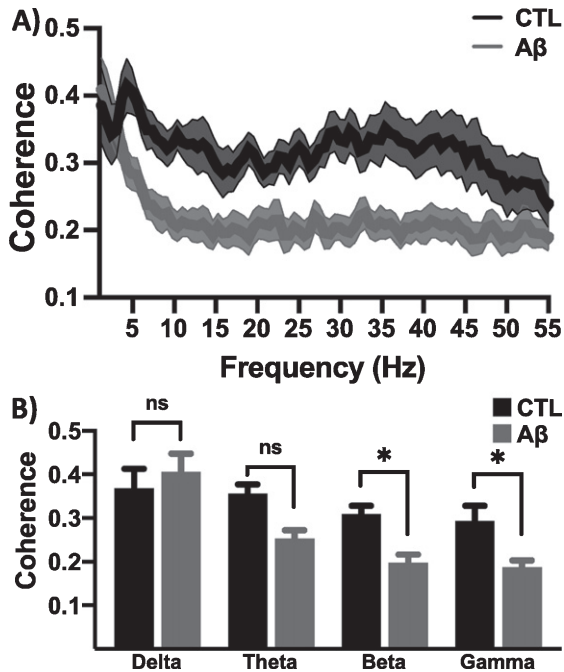


Fig. 6. A $\beta$  reduces OB-PCx functional coupling. A) Coherence between OB-PCx local field potentials (LFPs) as a function of frequency obtained from control (F12-injected; CTL; black) and A $\beta$ -injected (gray) freely moving animals. B) Quantification of the coherence between OB-PCx LFPs in the following frequency bands: delta (1–3 Hz), theta (3–12 Hz), beta (13–35 Hz), and gamma (36–55 Hz) for both experimental groups. \* $p < 0.05$  denotes a significant difference between experimental groups. “ns” ( $p > 0.05$ ) denotes the absence of a significant difference between experimental groups.

Olfactory dysfunction observed after A $\beta$  microinjection also coincides with a reduction in PCx-OB coherence (Fig. 8), that is similar to the alterations in OB-PCx coherence [28, 33] and in OB-OB coherence in AD transgenic mice that overproduce A $\beta$  [87]. Previous reports have shown that PCx-OB coherence is involved in olfactory processing [88] and that a disruption of either of these structures impairs odor perception [1–3]. Since we found that A $\beta$  microinjection did not affect the transmission from the OB through the PCx (via the LOT; Fig. 1), it is likely that the reduction in PCx-OB coherence is due to alterations in the centrifugal connection from the PCx to the OB. Since disruptions in centrifugal innervation to the OB affect olfactory discrimination [89] or odor-reward association [90], it remains to be determined whether A $\beta$  affects centrifugal transmission into the OB. This possibility is highly likely since A $\beta$  affects the long-range coupling between different brain cir-

uits [76, 91], such as the hippocampal-prefrontal cortex coupling [76] or the cortico-cortical connections [91].

We also found that after A $\beta$  treatment the PCx exhibited an exacerbated response to 4-AP, while the OB tended to be less hyperexcitable. This finding indicates that the PCx and the OB could be differentially sensitive to the presence of A $\beta$  and even produce opposite effects in identical conditions, as described for synaptic transmission in the hippocampus and the prefrontal cortex [92, 93]. This differential sensitivity between circuits of the olfactory pathway has been previously described in AD transgenic animals that overproduce A $\beta$  [27, 28, 94], where the PCx exhibits earlier and more abundant A $\beta$  accumulation than the OB [27, 31]. Moreover, in 6–7-month-old Tg2576 mice, the increase in LFP power induced by odor exposure is exacerbated in the PCx and depressed in the OB [28], which is similar to our findings. Moreover, gamma activity is increased in the PCx of 6–7-month-old Tg2576 mice, whereas these oscillations are normal in the OB [28]. This differential sensitivity between neural circuits to the presence of A $\beta$  is observed in the olfactory pathway and in other forebrain circuits (i.e., hippocampus and different cortical areas) [28, 92, 93]. The differential composition of neuronal types, their connectivity, and their sensitivity to A $\beta$  could likely account for these differences in network excitability after A $\beta$  presence [28, 93]. Moreover, differences in the interconnection with other circuits could also influence the differential response of some neural networks to the differences in excitability induced by A $\beta$  [28, 76].

The fact that the PCx becomes more prone to hyperexcitability in A $\beta$ -injected animals coincides with previous observations in transgenic AD animals that overproduce A $\beta$  exhibiting signs of hyperexcitability [28, 95] and odor hyperresponsiveness [25], which have been associated with alterations in olfactory function [28, 95]. Moreover, the worsening of 4AP-induced excitability produced by A $\beta$  injection is similar to the findings that some AD transgenic animals that overproduce A $\beta$  exhibit an increased susceptibility to seizures [96, 97]. It is likely that the PCx hyperexcitability and hyperresponsiveness in the presence of A $\beta$  might be due to the high susceptibility of the PCx to seizures [20] and alterations in intra-network inhibition caused by damage to different inhibitory interneurons (i.e., somatostatin- and calretinin-positive interneurons) within the PCx, already observed in AD transgenic

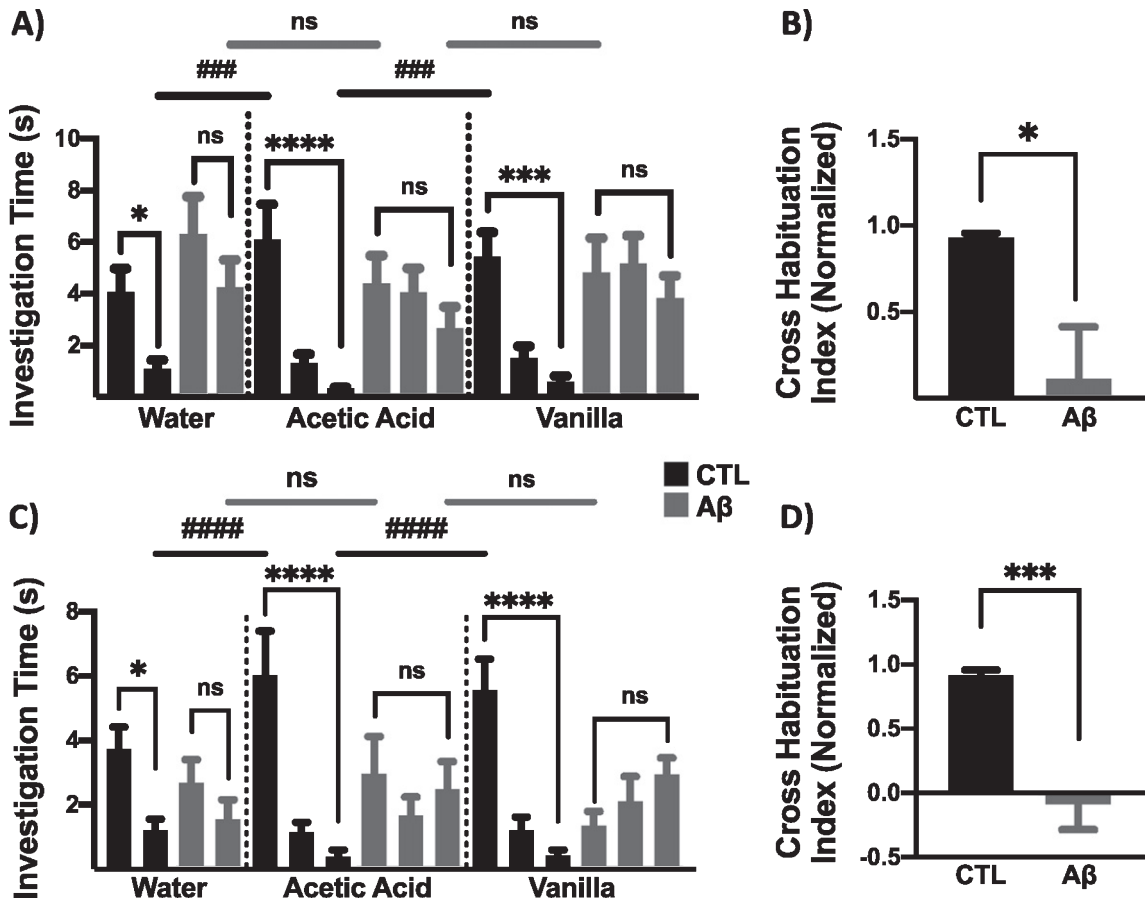


Fig. 7. A $\beta$  disrupts odor habituation and discrimination. A) Mean investigation time for the sequential and repetitive presentation of water and two odors (acetic acid and vanilla) to control (F12-medium injected; CTL; black) and A $\beta$ -injected (gray) animals. Odor habituation is reflected as a reduction in the investigation time after repeated presentation of the same odor. Cross habituation is reflected as an increase in the exploration time when a new odorant was presented. B) Cross-habituation index obtained by subtracting the normalized investigation time of the last trial of an odor block to the normalized investigation time of the first trial of the next odor block, for both experimental groups (same color code). C) Same as A, but for animals implanted with electrodes. D) Same as B, but for animals implanted with electrodes. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  denotes a significant difference between the first and the last trial of an odor block. ### $p < 0.001$ ; #### $p < 0.0001$  denotes a significant difference between the last trial of one odor block and the first trial of the next odor block (indicated by horizontal lines). "ns" ( $p > 0.05$ ) denotes the absence of significant difference between the indicated exploration times.

animals that overproduce A $\beta$  and in AD patients [16, 24].

As we have previously described in the hippocampus [51], the pro-epileptogenic effects of A $\beta$  in the PCx are associated with a reduction in the power of spontaneous network activity and with a reduction in its coupling with the OB. It is possible that both phenomena have a common origin and are correlated. In fact, the reduction in oscillatory network activity has been associated with increased pyramidal cell activity [92, 96, 98–100] and with the inhibition of GABAergic interneurons [65, 97, 101–106], which

are hallmarks of epileptic conditions [50, 107]. On the other hand, although it could be counterintuitive to associate a reduction in coupling with hyperexcitation, modeling and electrophysiological experiments have shown that weak coupling could lead neocortical networks to a state that favors the induction of epileptiform activity [108]. Thus, the A $\beta$ -induced reduction in network activity and coupling could determine the pro-epileptic effects of A $\beta$  [51, 106, 109] and, altogether, contribute to olfactory dysfunction when this complex phenomenon affects the OB-PCx network.

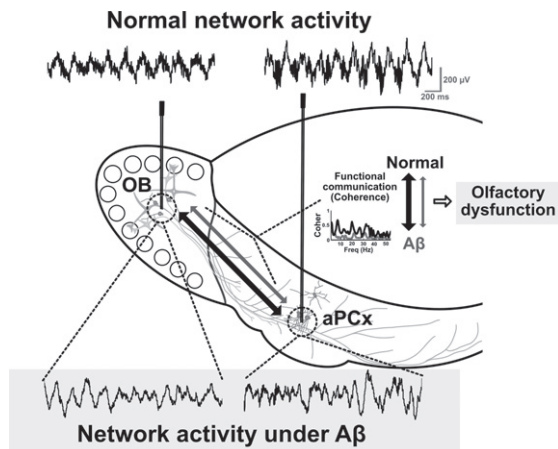


Fig. 8.  $A\beta$  disrupts OB and PCx activity and coupling, inducing olfactory dysfunction. Scheme of the complex changes in the olfactory network, including the olfactory bulb (OB) and piriform cortex (PCx), leading to olfactory dysfunction. By recording OB and PCx excitability and coherence, we found that olfactory dysfunction was related to a reduction of PCx and OB network activity and coupling, which could contribute to hyposmia in Alzheimer's disease.

## ACKNOWLEDGMENTS

Ignacio Martínez is a student from Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Rebeca Hernández and Benjamín Villasana are students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). All received fellowships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México. The authors would like to thank Jessica González-Norris and Anaïd Antaramian for the editorial comments.

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Grants IN202018 and IG20052) at UNAM and Conacyt (Grant A1-S-7540).

Authors' disclosures available online (<https://www.j-alz.com/manuscript-disclosures/20-1392r1>).

## REFERENCES

[1] Nusser Z, Kay LM, Laurent G, Homanics GE, Mody I (2001) Disruption of GABA(A) receptors on GABAergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network. *J Neurophysiol* **86**, 2823-2833.  
 [2] Wilson DA (2001) Receptive fields in the rat piriform cortex. *Chem Senses* **26**, 577-584.

[3] Doucette W, Milder J, Restrepo D (2007) Adrenergic modulation of olfactory bulb circuitry affects odor discrimination. *Learn Mem* **14**, 539-547.  
 [4] Mesholam RI, Moberg PJ, Mahr RN, Doty RL (1998) Olfaction in neurodegenerative disease: A meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Arch Neurol* **55**, 84-90.  
 [5] Murphy C (1999) Loss of olfactory function in dementing disease. *Physiol Behav* **66**, 177-182.  
 [6] Bahar-Fuchs A, Moss S, Rowe C, Savage G (2011) Awareness of olfactory deficits in healthy aging, amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* **23**, 1097-1106.  
 [7] Rahayel S, Frasnelli J, Joubert S (2012) The effect of Alzheimer's disease and Parkinson's disease on olfaction: A meta-analysis. *Behav Brain Res* **231**, 60-74.  
 [8] Albers MW, Tabert MH, Devanand DP (2006) Olfactory dysfunction as a predictor of neurodegenerative disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* **6**, 379-386.  
 [9] Conti MZ, Vicini-Chilovi B, Riva M, Zanetti M, Liberini P, Padovani A, Rozzini L (2013) Odor identification deficit predicts clinical conversion from mild cognitive impairment to dementia due to Alzheimer's disease. *Arch Clin Neuropsychol* **28**, 391-399.  
 [10] Devanand DP, Michaels-Marston KS, Liu X, Pelton GH, Padilla M, Marder K, Bell K, Stern Y, Mayeux R (2000) Olfactory deficits in patients with mild cognitive impairment predict Alzheimer's disease at follow-up. *Am J Psychiatry* **157**, 1399-1405.  
 [11] Devanand DP, Liu X, Tabert MH, Pradhaban G, Cuasay K, Bell K, de Leon MJ, Doty RL, Stern Y, Pelton GH (2008) Combining early markers strongly predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* **64**, 871-879.  
 [12] Yang D-S, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, Schmidt SD, Wesson D, Bandyopadhyay U, Jiang Y, Pawlik M, Peterhoff CM, Yang AJ, Wilson DA, St George-Hyslop P, Westaway D, Mathews PM, Levy E, Cuervo AM, Nixon RA (2011) Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain* **134**, 258-277.  
 [13] Montgomery KS, Simmons RK, Edwards G3, Nicolle MM, Gluck MA, Myers CE, Bizon JL (2011) Novel age-dependent learning deficits in a mouse model of Alzheimer's disease: Implications for translational research. *Neurobiol Aging* **32**, 1273-1285.  
 [14] Young JW, Sharkey J, Finlayson K (2009) Progressive impairment in olfactory working memory in a mouse model of mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* **30**, 1430-1443.  
 [15] Kameshima N, Nanjou T, Fukuhara T, Yanagisawa D, Tooyama I (2012) Correlation of  $A\beta$  deposition in the nasal cavity with the formation of senile plaques in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **513**, 166-169.  
 [16] Saiz-Sanchez D, Ubeda-Banon I, la Rosa-Prieto De C, Martinez-Marcos A (2012) Differential expression of interneuron populations and correlation with amyloid- $\beta$  deposition in the olfactory cortex of an  $A\beta$ PP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **31**, 113-129.  
 [17] Qin Y-Y, Li M-W, Zhang S, Zhang Y, Zhao L-Y, Lei H, Oishi K, Zhu W-Z (2013) *In vivo* quantitative whole-brain diffusion tensor imaging analysis of APP/PS1 transgenic

- mice using voxel-based and atlas-based methods. *Neuro-radiology* **55**, 1027-1038.
- [18] Kong V, Devenyi GA, Gallino D, Ayranci G, Germann J, Rollins C, Chakravarty MM (2018) Early-in-life neuroanatomical and behavioural trajectories in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* **223**, 3365-3382.
- [19] Gandy JC, Melendez-Ferro M, Bijur GN, Van Leuven F, Roche JK, Lechat B, Devijver H, Demedts D, Perez-Costas E, Roberts RC (2013) Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) expression in a mouse model of Alzheimer's disease: A light and electron microscopy study. *Synapse* **67**, 313-327.
- [20] Yan X-X, Cai Y, Shelton J, Deng S-H, Luo X-G, Oddo S, LaFerla FM, Cai H, Rose GM, Patrylo PR (2012) Chronic temporal lobe epilepsy is associated with enhanced Alzheimer-like neuropathology in 3 $\times$ Tg-AD mice. *PLoS One* **7**, e48782.
- [21] Ohm TG, Braak H (1987) Olfactory bulb changes in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **73**, 365-369.
- [22] Attems J, Jellinger KA (2006) Olfactory tau pathology in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Clin Neuropathol* **25**, 265-271.
- [23] Murray HC, Dieriks BV, Swanson MEV, Anekal PV, Turner C, Faull RLM, Belluscio L, Koretsky A, Curtis MA (2020) The unfolded protein response is activated in the olfactory system in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* **8**, 109.
- [24] Saiz-Sanchez D, la Rosa-Prieto De C, Ubeda-Banon I, Martinez-Marcos A (2015) Interneurons, tau and amyloid- $\beta$  in the piriform cortex in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* **220**, 2011-2025.
- [25] Xu W, Fitzgerald S, Nixon RA, Levy E, Wilson DA (2015) Early hyperactivity in lateral entorhinal cortex is associated with elevated levels of A $\beta$ PP metabolites in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **264**, 82-91.
- [26] Jeong YH, Park CH, Yoo J, Shin KY, Ahn S-M, Kim H-S, Lee SH, Emson PC, Suh Y-H (2006) Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV717I-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. *FASEB J* **20**, 729-731.
- [27] Zhang X-M, Xiong K, Cai Y, Cai H, Luo X-G, Feng J-C, Clough RW, Patrylo PR, Struble RG, Yan X-X (2010) Functional deprivation promotes amyloid plaque pathogenesis in Tg2576 mouse olfactory bulb and piriform cortex. *Eur J Neurosci* **31**, 710-721.
- [28] Wesson DW, Borkowski AH, Landreth GE, Nixon RA, Levy E, Wilson DA (2011) Sensory network dysfunction, behavioral impairments, and their reversibility in an Alzheimer's  $\beta$ -amyloidosis mouse model. *J Neurosci* **31**, 15962-15971.
- [29] Xu W, Lopez-Guzman M, Schoen C, Fitzgerald S, Lauer SL, Nixon RA, Levy E, Wilson DA (2014) Spared piriform cortical single-unit odor processing and odor discrimination in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **9**, e106431-10.
- [30] Wu N, Rao X, Gao Y, Wang J, Xu F (2013) Amyloid- $\beta$  deposition and olfactory dysfunction in an Alzheimer's disease model. *J Alzheimers Dis* **37**, 699-712.
- [31] Cassano T, Romano A, Macheda T, Colangeli R, Cimmino CS, Petrella A, LaFerla FM, Cuomo V, Gaetani S (2011) Olfactory memory is impaired in a triple transgenic model of Alzheimer disease. *Behav Brain Res* **224**, 408-412.
- [32] Plucińska K, Crouch B, Koss D, Robinson L, Siebrecht M, Riedel G, Platt B (2014) Knock-in of human BACE1 cleaves murine APP and reiterates Alzheimer-like phenotypes. *J Neurosci* **34**, 10710-10728.
- [33] Wesson DW, Levy E, Nixon RA, Wilson DA (2010) Olfactory dysfunction correlates with amyloid- $\beta$  burden in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci* **30**, 505-514.
- [34] Wesson DW, Morales-Corraliza J, Mazzella MJ, Wilson DA, Mathews PM (2013) Chronic anti-murine A $\beta$  immunization preserves odor guided behaviors in an Alzheimer's  $\beta$ -amyloidosis model. *Behav Brain Res* **237**, 96-102.
- [35] Morales-Corraliza J, Schmidt SD, Mazzella MJ, Berger JD, Wilson DA, Wesson DW, Jucker M, Levy E, Nixon RA, Mathews PM (2013) Immunization targeting a minor plaque constituent clears  $\beta$ -amyloid and rescues behavioral deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging* **34**, 137-145.
- [36] Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CYD, Karlo JC, Zinn AE, Casali BT, Restivo JL, Goebel WD, James MJ, Brunden KR, Wilson DA, Landreth GE (2012) ApoE-directed therapeutics rapidly clear  $\beta$ -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* **335**, 1503-1506.
- [37] Alvarado-Martínez R, Salgado-Puga K, Peña-Ortega F (2013) Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell. *PLoS One* **8**, e75745-15.
- [38] Cornejo-Montes-de-Oca JM, Hernández-Soto R, Isla AG, Morado-Urbina CE, Peña-Ortega F (2018) Tolfenamic acid prevents amyloid  $\beta$ -induced olfactory bulb dysfunction *in vivo*. *Curr Alzheimer Res* **15**, 731-742.
- [39] Hernández-Soto R, Rojas-García KD, Peña-Ortega F (2019) Sudden intrabulbar amyloid increase simultaneously disrupts olfactory bulb oscillations and odor detection. *Neural Plasticity* **2019**, 3424906.
- [40] Gottfried JA (2010) Central mechanisms of odour object perception. *Nat Rev Neurosci* **11**, 628-641.
- [41] Wilson DA, Sullivan RM (2011) Cortical processing of odor objects. *Neuron* **72**, 506-519.
- [42] Wilson DA, Stevenson RJ (2003) The fundamental role of memory in olfactory perception. *Trends Neurosci* **26**, 243-247.
- [43] Li W, Howard JD, Gottfried JA (2010) Disruption of odour quality coding in piriform cortex mediates olfactory deficits in Alzheimer's disease. *Brain* **133**, 2714-2726.
- [44] Adlimoghaddam A, Snow WM, Stortz G, Perez C, Djordjevic J, Goertzen AL, Ko JH, Albeni BC (2019) Regional hypometabolism in the 3 $\times$ Tg mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **127**, 264-277.
- [45] Peña F, Tapia R (1999) Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: A microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem* **72**, 2006-2014.
- [46] Peña F, Tapia R (2000) Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus *in vivo*: Role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* **101**, 547-561.
- [47] Villasana-Salazar B, Hernández-Soto R, Guerrero-Gómez ME, Ordaz B, Manrique-Maldonado G, Salgado-Puga K, Peña-Ortega F (2020) Chronic intermittent hypoxia transiently increases hippocampal network activity in the gamma frequency band and 4-Aminopyridine-induced hyperexcitability *in vitro*. *Epilepsy Res* **166**, 106375.

- [48] Balleza-Tapia H, Huanosta-Gutiérrez A, Márquez-Ramos A, Arias N, Peña F (2010) Amyloid  $\beta$  oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner. *Curr Alzheimer Res* **7**, 453-462.
- [49] Raj A, Dey S, Maheshwari DU, Manjula SN, Madhupantula SV, Ali M (2019) Evaluating the olfactory dysfunction and cognitive deficits induced by intracerebroventricular injection of amyloid-beta (1-42) in female C57BL/6 mice. *J App Pharm Sci* **9**, 24-34.
- [50] Salgado-Puga K, Peña-Ortega F (2015) Cellular and network mechanisms underlying memory impairment induced by amyloid  $\beta$  protein. *Protein Pept Lett* **22**, 303-321.
- [51] Alcántara-González D, Villasana-Salazar B, Peña-Ortega F (2019) Single amyloid-beta injection exacerbates 4-aminopyridine-induced seizures and changes synaptic coupling in the hippocampus. *Hippocampus* **29**, 1150-1164.
- [52] Paxinos G, Franklin K (2019) *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Elsevier Science.
- [53] McGinley MJ, Westbrook GL (2013) Hierarchical excitatory synaptic connectivity in mouse olfactory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 16193-16198.
- [54] Peña F, Alavez-Pérez N (2006) Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus *in vitro*. *Epilepsia* **47**, 47-54.
- [55] Peña F, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Bernal-Pedraza R, Márquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L, Giordano M (2010) Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: Role of Fyn-kinase. *Hippocampus* **20**, 78-96.
- [56] Peña F, Bargas J, Tapia R (2002) Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine *in vivo*. *Neuropharmacology* **42**, 807-812.
- [57] Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GAR (2003) Bilobalide, a sesquiterpene trilactone from Ginkgo biloba, is an antagonist at recombinant  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2 GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* **464**, 1-8.
- [58] Leung LS, Fu XW (1994) Factors affecting paired-pulse facilitation in hippocampal CA1 neurons *in vitro*. *Brain Res* **650**, 75-84.
- [59] Ambert N, Greget R, Haerberlé O, Bischoff S, Berger TW, Bouteiller J-M, Baudry M (2010) Computational studies of NMDA receptors: Differential effects of neuronal activity on efficacy of competitive and non-competitive antagonists. *Open Access Bioinformatics* **2**, 113-125.
- [60] Gustafsson B, Wigström H, Abraham WC, Huang YY (1987) Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials. *J Neurosci* **7**, 774-780.
- [61] Honoré T, Davies SN, Drejer J, Fletcher EJ, Jacobsen P, Lodge D, Nielsen FE (1988) Quinoxalinediones: Potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science* **241**, 701-703.
- [62] Lee S-H, Govindaiah G, Cox CL (2010) Selective excitatory actions of DNQX and CNQX in rat thalamic neurons. *J Neurophysiol* **103**, 1728-1734.
- [63] Salgado-Puga K, Rodríguez-Colorado J, Prado-Alcalá RA, Peña-Ortega F (2017) Subclinical doses of ATP-sensitive potassium channel modulators prevent alterations in memory and synaptic plasticity induced by amyloid- $\beta$ . *J Alzheimers Dis* **57**, 205-226.
- [64] Neville KR, Haberly LB (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol* **90**, 3921-3930.
- [65] Villette V, Poindessous-Jazat F, Simon A, Léna C, Roulot E, Bellessort B, Epelbaum J, Dutar P, Stéphan A (2010) Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat. *J Neurosci* **30**, 10991-11003.
- [66] Mondragón-Rodríguez S, Gu N, Manseau F, Williams S (2018) Alzheimer's transgenic model is characterized by very early brain network alterations and  $\beta$ -CTF fragment accumulation: Reversal by  $\beta$ -secretase inhibition. *Front Cell Neurosci* **12**, 121.
- [67] Mondragón-Rodríguez S, Gu N, Fasano C, Peña-Ortega F, Williams S (2019) Functional connectivity between hippocampus and lateral septum is affected in very young Alzheimer's transgenic mouse model. *Neuroscience* **401**, 96-105.
- [68] Mondragón-Rodríguez S, Salgado-Burgos H, Peña-Ortega F (2020) Circuitry and synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: A new tau hypothesis. *Neural Plasticity* **2020**, 2960343.
- [69] Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK (1999) Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* **2**, 271-276.
- [70] Giacchino J, Criado JR, Games D, Henriksen S (2000) *In vivo* synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Res* **876**, 185-190.
- [71] Peña F, Gutiérrez-Lerma A, Quiroz-Baez R, Arias C (2006) The role of beta-amyloid protein in synaptic function: Implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol* **4**, 149-163.
- [72] Adaya-Villanueva A, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Márquez-Ramos A, Peña-Ortega F (2010) Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides. *Peptides* **31**, 1761-1766.
- [73] Gutiérrez-Lerma AI, Ordaz B, Peña-Ortega F (2013) Amyloid beta peptides differentially affect hippocampal theta rhythms *in vitro*. *Int J Pept* **2013**, 328140.
- [74] Peña-Ortega F, Bernal-Pedraza R (2012) Amyloid beta peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations. *Int J Pept* **2012**, 236289.
- [75] Peña-Ortega F, Solis-Cisneros A, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Javier Lopez-Guerrero J (2012) Amyloid beta 1-42 inhibits entorhinal cortex activity in the beta-gamma range: Role of GSK-3. *Curr Alzheimer Res* **9**, 857-863.
- [76] Flores-Martínez E, Peña-Ortega F (2017) Amyloid  $\beta$  peptide-induced changes in prefrontal cortex activity and its response to hippocampal input. *Int J Pept* **2017**, 7386809.
- [77] Mura E, Zappettini S, Preda S, Biundo F, Lanni C, Grilli M, Cavallero A, Olivero G, Salamone A, Govoni S, Marchi M (2012) Dual effect of beta-amyloid on  $\alpha$ 7 and  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 nicotinic receptors controlling the release of glutamate, aspartate and GABA in rat hippocampus. *PLoS One* **7**, e29661.
- [78] Salamone A, Mura E, Zappettini S, Grilli M, Olivero G, Preda S, Govoni S, Marchi M (2014) Inhibitory effects of beta-amyloid on the nicotinic receptors which stimulate glutamate release in rat hippocampus: The glial contribution. *Eur J Pharmacol* **723**, 314-321.



- [79] Satoh Y, Hirakura Y, Shibayama S, Hirashima N, Suzuki T, Kirino Y (2001) Beta-amyloid peptides inhibit acetylcholine release from cholinergic presynaptic nerve endings isolated from an electric ray. *Neurosci Lett* **302**, 97-100.
- [80] Chen C (2005) beta-Amyloid increases dendritic Ca<sup>2+</sup>-influx by inhibiting the A-type K<sup>+</sup>-current in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1913-1919.
- [81] Hou J-F, Cui J, Yu L-C, Zhang Y (2009) Intracellular amyloid induces impairments on electrophysiological properties of cultured human neurons. *Neurosci Lett* **462**, 294-299.
- [82] Rovira C, Arbez N, Mariani J (2002) Abeta(25-35) and Abeta(1-40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 1317-1321.
- [83] Peng KY, Mathews PM, Levy E, Wilson DA (2016) Apolipoprotein E4 causes early olfactory network abnormalities and short-term olfactory memory impairments. *Neuroscience* **343**, 364-371.
- [84] Kim H-C, Yamada K, Nitta A, Olariu A, Tran MH, Mizuno M, Nakajima A, Nagai T, Kamei H, Jhoo W-K, Im D-H, Shin E-J, Hjelle OP, Ottersen OP, Park SC, Kato K, Mirault M-E, Nabeshima T (2003) Immunocytochemical evidence that amyloid beta (1-42) impairs endogenous antioxidant systems *in vivo*. *Neuroscience* **119**, 399-419.
- [85] Peña-Ortega F (2019) Brain arrhythmias induced by amyloid beta and inflammation: Involvement in Alzheimer's disease and other inflammation-related pathologies. *Curr Alzheimer Res* **16**, 1108-1131.
- [86] Isla AG, Vázquez-Cuevas FG, Peña-Ortega F (2016) Exercise prevents amyloid- $\beta$ -induced hippocampal network disruption by inhibiting GSK3 $\beta$  activation. *J Alzheimers Dis* **52**, 333-343.
- [87] Liu Q, Li A, Gong L, Zhang L, Wu N, Xu F (2013) Decreased coherence between the two olfactory bulbs in Alzheimer's disease model mice. *Neurosci Lett* **545**, 81-85.
- [88] Kay LM, Beshel J (2010) A beta oscillation network in the rat olfactory system during a 2-alternative choice odor discrimination task. *J Neurophysiol* **104**, 829-839.
- [89] Nunez-Parra A, Maurer RK, Krahe K, Smith RS, Araneda RC (2013) Disruption of centrifugal inhibition to olfactory bulb granule cells impairs olfactory discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14777-14782.
- [90] Kiselycznyk CL, Zhang S, Linstner C (2006) Role of centrifugal projections to the olfactory bulb in olfactory processing. *Learn Mem* **13**, 575-579.
- [91] Busche MA, Kekuš M, Adelsberger H, Noda T, Förstl H, Nelken I, Konnerth A (2015) Rescue of long-range circuit dysfunction in Alzheimer's disease models. *Nat Neurosci* **18**, 1623-1630.
- [92] Kurudenkandy FR, Zilberter M, Biverstål H, Presto J, Honcharenko D, Strömberg R, Johansson J, Winblad B, Fisahn A (2014) Amyloid- $\beta$ -induced action potential desynchronization and degradation of hippocampal gamma oscillations is prevented by interference with peptide conformation change and aggregation. *J Neurosci* **34**, 11416-11425.
- [93] Wang Y, Zhou TH, Zhi Z, Barakat A, Hlatky L, Querfurth H (2013) Multiple effects of  $\beta$ -amyloid on single excitatory synaptic connections in the PFC. *Front Cell Neurosci* **7**, 129.
- [94] Cassano T, Serviddio G, Gaetani S, Romano A, Dipsquale P, Cianci S, Bellanti F, Laconca L, Romano AD, Padalino I, LaFerla FM, Nicoletti F, Cuomo V, Vendemiale G (2012) Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **33**, 1121.e1-12.
- [95] Chapuis J, Cohen Y, He X, Zhang Z, Jin S, Xu F, Wilson DA (2013) Lateral entorhinal modulation of piriform cortical activity and fine odor discrimination. *J Neurosci* **33**, 13449-13459.
- [96] Minceviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fulop L, Penke B, Zilberter Y, Harkany T, Pitkanen A, Tanila H (2009) Amyloid  $\beta$ -induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci* **29**, 3453-3462.
- [97] Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu G-Q, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L (2007) Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* **55**, 697-711.
- [98] Ren S-C, Chen P-Z, Jiang H-H, Mi Z, Xu F, Hu B, Zhang J, Zhu Z-R (2014) Persistent sodium currents contribute to A $\beta$ 1-42-induced hyperexcitation of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neurosci Lett* **580**, 62-67.
- [99] Busche MA, Chen X, Henning HA, Reichwald J, Staufenbiel M, Sakmann B, Konnerth A (2012) Critical role of soluble amyloid- $\beta$  for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8740-8745.
- [100] Juhász G, Márki A, Vass G, Fülöp L, Budai D, Penke B, Falkay G, Szegei V (2009) An intraperitoneally administered pentapeptide protects against A $\beta$ 1-42 induced neuronal excitation *in vivo*. *J Alzheimers Dis* **16**, 189-196.
- [101] Rubio SE, Vega-Flores G, Martínez A, Bosch C, Pérez-Mediavilla A, del Río J, Gruart A, Delgado-García JM, Soriano E, Pascual M (2012) Accelerated aging of the GABAergic septohippocampal pathway and decreased hippocampal rhythms in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* **26**, 4458-4467.
- [102] Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AMI, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I, Mucke L, Palop JJ (2012) Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* **149**, 708-721.
- [103] Villette V, Dutar P (2017) GABAergic microcircuits in Alzheimer's disease models. *Curr Alzheimer Res* **14**, 30-39.
- [104] Albuquerque MS, Mahar I, Davoli MA, Chabot J-G, Mechawar N, Quirion R, Krantic S (2015) Regional and sub-regional differences in hippocampal GABAergic neuronal vulnerability in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* **7**, 30.
- [105] Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Luano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A (2010) Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis* **21**, 119-132.
- [106] Hazra A, Gu F, Aulakh A, Berridge C, Eriksen JL, Ziburkus J (2013) Inhibitory neuron and hippocampal circuit dysfunction in an aged mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e64318.

- [107] Peña-Ortega F (2013) Amyloid beta-protein and neural network dysfunction. *J Neurodegener Dis* **2013**, 657470.
- [108] Van Drongelen W, Lee HC, Hereld M, Chen Z, Elsen FP, Stevens RL (2005) Emergent epileptiform activity in neural networks with weak excitatory synapses. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* **13**, 236-241.
- [109] Cuevas ME, Haensgen H, Sepúlveda FJ, Zegers G, Roa J, Opazo C, Aguayo LG (2011) Soluble A $\beta$ (1-40) peptide increases excitatory neurotransmission and induces epileptiform activity in hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis* **23**, 673-687.