

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD JURIQUILLA

**“EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL EFECTO DE LA LESIÓN DE LAS
CONEXIONES GABAÉRGICAS O COLINÉRGICAS DEL SEPTUM MEDIAL Y SU
RELACIÓN CON CAMBIOS HISTOLÓGICOS A NIVEL DE HIPOCAMPO DORSAL Y
FIMBRIA”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN NEUROCIENCIAS

PRESENTA
DANIELA ALEJANDRA BRAVO COUTIÑO

DIRECTOR DE TESIS
DR. HIRAM LUNA MUNGUÍA

QUERÉTARO, QUERÉTARO., OCTUBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Juriquilla

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por Daniela Alejandra Bravo Coutiño, cuyo título es: “Evaluación inmunohistoquímica del efecto de la lesión de las conexiones gabaérgicas o colinérgicas del septum medial y su relación con cambios histológicos a nivel de hipocampo dorsal y fimbria” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Licenciada en Neurociencias y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma:

Presidenta: Dra. Rebeca Corona García-Cabral

Secretario: Dr. Hiram Luna Munguía

Integrante: Dra María Guadalupe García Gomar

Integrante: Dra. Marisol de la Mora Curiel

Integrante: Dra. Manola Cuéllar Herrera

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del programa

Dedicatoria.

Siempre estaré infinitamente agradecida con cada una de las personas que me dio su confianza, apoyo y que compartió momentos conmigo dentro o fuera de las instalaciones durante mi formación profesional.

Este trabajo se ha realizado con esfuerzo que solo aquellas personas cercanas durante el proceso son capaces de reconocer y celebrar. Por favor leánlo como una ofrenda de amor y cariño en agradecimiento a su empatía y paciencia.

Daniela Alejandra Bravo Coutiño

Agradecimientos académicos

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

A la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología

Al Bioterio del Instituto de Neurobiología

Al Laboratorio de Conectividad Cerebral

- Luis Concha
- Hiram Luna
- Ana Aquiles
- Deisy Gasca
- Ericka de los Ríos
- Ricardo Alonso Ríos
- Juan Ortiz-Retana
- Juan Olivares
- Nydia Hernández-Ríos
- Ericka de los Ríos
- Leopoldo Santos
- Lourdes Palma-Tirado
- María Carbajo
- Mirelta Regalado
- Olimpia Ortega
- Fernando Hidalgo

Donativos

Trabajo auspiciado por los proyectos UNAM-DGAPA-PAPIIT IA200621 e IN224523 (HLM), IN204720 (LC).

Agradecimientos personales

- Ruth Coutiño
- Isaac Soriano
- Francisco Bravo
- María Rangel
- Fernanda Coutiño
- Sofía Soriano
- Gerson Robles
- Ana Sofía González
- María Paula Alarcón

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.....	III
AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	IV
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
EL PAPEL FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DEL SISTEMA LÍMBICO.....	6
LAS DIFERENTES POBLACIONES NEURONALES DENTRO DE LA VÍA SEPTO-HIPOCAMPAL.....	7
LA EPILEPSIA COMO RESULTADO DE ALTERACIONES EN LA VÍA SEPTO-HIPOCAMPAL.....	8
ANTECEDENTES.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	15
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	16
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	17
1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1 ANIMALES.....	18

2 IMAGENOLOGÍA POR RESONANCIA MAGNÉTICA	18
3 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.....	19
4 INMUNOFLUORESCENCIA	20
4.1 Cálculos matemáticos para obtención del porcentaje de cambio.....	22
5 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS	22
5.1 Azul de Toluidina	23
5.2 Tinción de Timm	24
5.3 Tinción de Nissl.....	24
RESULTADOS.....	27
1 INMUNOFLUORESCENCIA.....	27
2 DAÑO TISULAR	30
3 BROTE DE FIBRAS MUSGOSAS	31
4 MUERTE NEURONAL.....	31
DISCUSIÓN.	35
CONCLUSIÓN.	40
REFERENCIAS.....	41
APÉNDICES	62
APÉNDICE 1. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.	63
APÉNDICE 2. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROTOCOLO AZUL DE TOLUIDINA.	65
APÉNDICE 3. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROTOCOLO DE TINCIÓN DE TIMM.	67
APÉNDICE 4. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROTOCOLO DE TINCIÓN DE NISSL.....	69

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN DEL COMPLEJO SEPTAL	6
FIGURA 2. COMPARACIÓN DE LA ANATOMÍA DE LA VÍA SEPTO-HIPOCAMPAL EN ROEDORES Y HUMANOS	11
FIGURA 3. DIAGRAMA DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	26
FIGURA 4. NEURONAS INMUNOPOSITIVAS A PARVALBÚMINA (PV) Y A COLINA ACETILTRANSFERASA (CHAT), ASÍ COMO EL MARCAJE NEURONAL MEDIANTE NEUÑ.....	28
TABLA 1. CONTEO DEL NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS GABAÉRGICAS Y COLINÉRGICAS DE TODOS LOS ANIMALES SOMETIDOS AL PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	30
FIGURA 5. TERMINALES DE FIBRAS MUSGOSAS Y DAÑO TISULAR	32
FIGURA 6. REBANADAS SOMETIDAS A LA TINCIÓN DE NISSL Y PÉRDIDA CELULAR.	34

RESUMEN

El sistema límbico está integrado por estructuras corticales y subcorticales implicadas en manifestaciones emocionales y procesos de aprendizaje. En roedores, el septum medial es una de las estructuras más relevantes de dicho sistema debido a la densidad de poblaciones neuronales colinérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas que se proyectan hacia el hipocampo a través de la fimbria-fórnix. Dichas proyecciones entre el septum medial y el hipocampo son recíprocas y en conjunto se conocen como la vía septo-hipocampal, crucial en la generación de la actividad eléctrica hipocampal conocida como ritmo theta. En ratas, estas oscilaciones van de los 4-12 Hz y aparecen mientras los animales duermen, caminan o exploran. Diversos estudios realizados en modelos animales han sugerido que la ausencia de estas oscilaciones podría relacionarse con la patogénesis de la epilepsia del lóbulo temporal. Este tipo de epilepsia se caracteriza por: 1) ser la forma más frecuente de epilepsia con crisis focales secundarias a una etiología estructural, 2) tener un número elevado de pacientes que reportan algún tipo de factor predisponente en etapas tempranas de su vida y 3) presentar un elevado porcentaje de pacientes resistentes al tratamiento farmacológico. En este trabajo usamos un modelo animal para lesionar poblaciones neuronales específicas del septum medial (mediante el uso de saporinas), alterando también la integridad de zonas alejadas pero conectadas al sitio de inyección. Esto nos permitió evaluar y caracterizar la histopatología en regiones del sistema límbico tras la lesión selectiva del septum medial, cuyos resultados más representativos se observaron en el grupo GABAérgico al presentar menor cantidad de neuronas, daño axonal y la presencia de la proliferación aberrante de fibras musgosas, factor reportado anteriormente en epilepsia del lóbulo temporal.

ABSTRACT

The limbic system is composed of cortical and subcortical structures involved in emotional manifestations and learning processes. In rodents, the medial septum is one of the most relevant structures of this system due to the density of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neuronal populations that project to the hippocampus through the fimbria-fornix. These projections between the medial septum and the hippocampus are reciprocal and together are known as the septo-hippocampal pathway, crucial in the generation of hippocampal electrical activity known as theta rhythm. In rats, these oscillations range from 4-12 Hz and appear while the animals are sleeping, walking or exploring. Several studies in animal models have suggested that the absence of these oscillations could be related to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. This type of epilepsy is characterized by: 1) being the most frequent form of epilepsy with focal seizures secondary to a structural etiology, 2) having a high number of patients who report some type of predisposing factor early in life, and 3) presenting a high percentage of patients resistant to pharmacological treatment. In this work we used an animal model to lesion specific neuronal populations of the medial septum (using saporins), also altering the integrity of remote areas connected to the injection site. This allowed us to evaluate and characterize the histopathology in regions of the limbic system after selective lesioning of the medial septum, whose most representative results were observed in the GABAergic group by presenting fewer neurons, axonal damage and the presence of aberrant proliferation of mossy fibers, a factor previously reported in temporal lobe epilepsy.

INTRODUCCIÓN.

El papel funcional y estructural del sistema límbico.

El sistema límbico (del latín *limbus*, que significa borde o margen) está integrado por un amplio grupo de estructuras corticales y subcorticales implicadas en manifestaciones emocionales (placer, tristeza, miedo, enojo) y en la regulación de procesos de aprendizaje y memoria (Catani et al., 2013). En roedores, una de las regiones límbicas más interconectada es la integrada por el septum medial y la banda diagonal de Broca recibiendo aferencias del hipocampo, de la amígdala, de los núcleos supra-mamilares, del tálamo y del área tegmental ventral, y proyectando hacia la amígdala, el área tegmental ventral, el hipotálamo y toda la formación hipocampal (Swanson & Cowan, 1979; Fuhrmann et al., 2015). Importante mencionar que los límites anatómicos entre el septum medial y la banda diagonal de Broca no son claros debido a la similitud neuroquímica y funcional que hay entre estas estructuras. Por ello, para facilitar la lectura de este trabajo de tesis, este complejo septal será referido a lo largo del texto como septum medial (Figura 1).

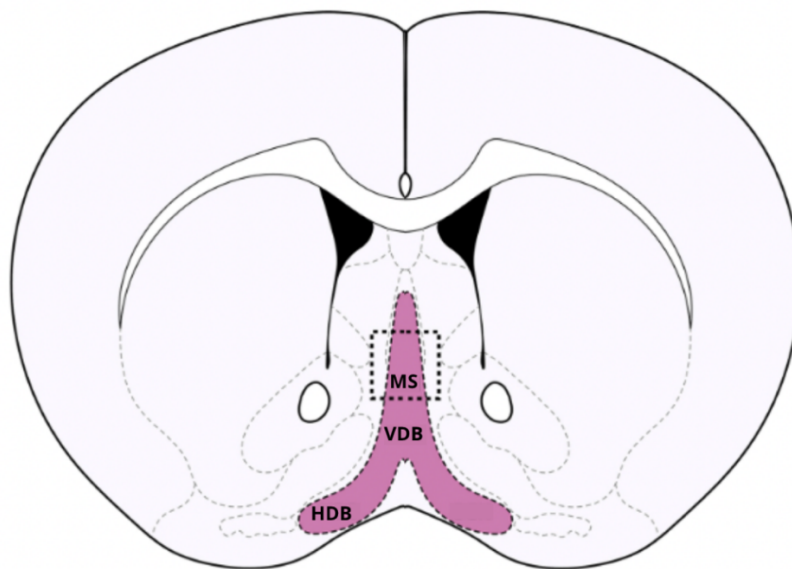


Figura 1. Representación del complejo septal. Compuesto por el septum medial (MS) y la banda diagonal de Broca (DBB), a su vez compuesta por la sección vertical (VDB) y horizontal (HDB). Figura modificada de (López-Morales et al., 2023).

Las diferentes poblaciones neuronales dentro de la vía septo-hipocampal.

El septum medial alberga poblaciones de neuronas colinérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas, todas ellas conectadas entre sí (Kiss, Patel, Baimbridge, et al., 1990; Hajszan et al., 2004; Leão et al., 2015) y proyectándose hacia ciertas regiones cerebrales como el hipocampo a través del sistema fimbria-fórnix (Sun et al., 2014). La mayoría de estas proyecciones (alrededor del 65%) son colinérgicas, conectándose principalmente con las neuronas piramidales de CA1 y representando la principal fuente de liberación de acetilcolina hipocampal (Frotscher & Léránth, 1985; Kiss, Patel, & Freund, 1990; Sun et al., 2014). En el caso de las proyecciones glutamatérgicas, éstas representan aproximadamente el 23% del total de conexiones septo-hipocampales (Colom et al., 2005) y se conectan principalmente a las interneuronas hipocampales localizadas en CA1 (específicamente a nivel de *stratum oriens*) (Sun et al., 2014); diversos estudios las han relacionado con la actividad locomotora (Li et al., 2012; Fuhrmann et al., 2015; Robinson et al., 2016; Justus et al., 2017). Finalmente, la población de neuronas GABAérgicas del septum medial, una población heterogénea que ha sido clasificada con base en su reactividad a parvalbúmina (PV), a somatostatina o a la activación de canales HCN (por sus siglas en inglés: hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated) (Freund, 1989; Sotty et al., 2003; Varga et al., 2008). Estas proyecciones GABAérgicas septales conectan principalmente con las interneuronas GABAérgicas hipocampales que expresan PV (Freund & Antal, 1988; Freund, 1989; Sun et al., 2014). Importante resaltar que en el caso específico de las conexiones GABAérgicas, éstas no sólo viajan del septum medial al hipocampo sino también a la inversa, formando un circuito conocido como la vía septo-hipocampal (Tóth et al., 1993; Takács et al., 2008).

Una de las principales funciones de la vía septo-hipocampal es la generación de la actividad eléctrica hipocampal conocida como ritmo theta (Buzsáki, 2002). En ratas, estas oscilaciones van de los 4 hasta los 12 Hz y aparecen mientras los animales duermen (sueño de movimientos oculares rápidos), caminan o exploran (Buzsáki, 2002, 2005; Buzsáki & Moser, 2013). Diversos estudios han sugerido que tanto las conexiones colinérgicas (Simon et al., 2006; Zhang et al., 2010) como glutamatérgicas (Fuhrmann et al., 2015) y GABAérgicas (Varga et al., 2008) contribuyen de alguna forma en la

generación de estas oscilaciones hipocampales. Sin embargo, trabajos realizados en modelos animales de epilepsia, han sugerido que la ausencia de estas oscilaciones podría relacionarse con la patogénesis de la epilepsia del lóbulo temporal (Miller et al., 1994; Colom et al., 2006; Chauvière et al., 2009).

La epilepsia como resultado de alteraciones en la vía septo-hipocampal.

La epilepsia se define como un trastorno cerebral crónico que se caracteriza por la predisposición continua a presentar crisis epilépticas espontáneas y recurrentes (Fisher et al., 2005). Comprende más de 40 síndromes clínicos y afecta a casi 60 millones de personas a nivel mundial. Estudios epidemiológicos mexicanos reportan una prevalencia (número de casos activos, es decir, pacientes que hayan sufrido una crisis epiléptica en los últimos cinco años y/o se encuentren bajo tratamiento) de 15 casos por cada 1000 habitantes (Tulio-Medina et al., 2001; Guzmán-Jiménez & Velasco-Monroy, 2016). En el caso específico de la epilepsia del lóbulo temporal, ésta se caracteriza por: 1) ser la forma más frecuente de epilepsia con crisis focales secundarias a una etiología estructural (Manford et al., 1992), 2) tener un número elevado de pacientes que reportan haber sufrido algún tipo de factor predisponente (crisis febril, traumatismo craneoencefálico severo, *status epilepticus*) en etapas tempranas de su vida (Sultana et al., 2021) y 3) presentar un elevado porcentaje (30%) de pacientes resistentes al tratamiento farmacológico, situación usualmente asociada a la presencia de esclerosis hipocampal (Walker, 2015).

A nivel clínico resulta muy complicado dar un seguimiento al proceso epileptogénico pues generalmente los pacientes llegan con la enfermedad establecida. Por ello, la relevancia de los modelos animales pues nos ayudan a representar las características celulares, moleculares, clínicas y fisiopatológicas de una enfermedad. En este trabajo usamos un modelo animal en el que es posible eliminar poblaciones neuronales específicas mediante la inyección intracerebral (septum medial) de toxinas conocidas como saporinas. Estas sustancias inactivan el ribosoma de las células a través de la inhibición

de la síntesis de proteínas, provocándoles la muerte. Una de las saporinas usadas en este trabajo, se utilizó para dañar a la población de neuronas GABAérgicas del septum medial (GAT1-SAP) (Pang et al., 2011; Roland, Stewart, et al., 2014, 2014) y la otra para dañar a la población de neuronas colinérgicas de la misma región cerebral (192-IgG) (Ferencz et al., 2001; Soares et al., 2019). Esto nos permitió evaluar y caracterizar las anomalías histológicas que aparecieron en regiones cerebrales alejadas pero conectadas al sitio de inyección.

ANTECEDENTES.

El sistema límbico está integrado por la formación hipocampal, el área septal, el área subcallosa, el cíngulo, el giro parahipocampal, el núcleo accumbens, el complejo amigdalino, los cuerpos mamilares, el sistema rincefálico (formaciones olfatorias), la corteza órbito-frontal y todos aquellos fascículos de sustancia blanca que interconectan estas estructuras entre ambos hemisferios (Catani et al., 2013).

Las estructuras que integran a la formación hipocampal se encargan de llevar toda la información que viene de las áreas somatosensoriales y asociativas neocorticales hacia el giro dentado y el hipocampo. El hipocampo, en particular, es una prominencia de sustancia gris dividida en cuatro subregiones denominadas como *cornu ammonis* (CA1-CA4) (McDonald et al., 2010). Diversos estudios han reportado que el hipocampo es crucial en los procesos de aprendizaje y memoria debido, en parte, a la elevada capacidad que tiene para establecer conexiones plásticas con regiones intra- y extra-límbicas (Tzilivaki et al., 2023). Sin embargo, esta característica es la que también lo implica en el proceso epileptogénico (Scharfman, 2007).

Las proyecciones glutamatérgicas son las principales eferencias hipocampales, las cuales se juntan en la fimbria y viajan a través del fórnix (lámina de sustancia blanca constituida por axones mielinizados y no mielinizados) hasta alcanzar el núcleo septal lateral (Swanson & Cowan, 1977, 1979). A partir de este núcleo, se proyectan fibras GABAérgicas hacia el complejo conocido como núcleo septal medial – banda diagonal de Broca, dentro del cual está interconectada una población heterogénea de neuronas (Kiss, Patel, & Freund, 1990; Hajszan et al., 2004; Leão et al., 2015). Finalmente, de este complejo se proyectan fibras colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas que llegarán al hipocampo a través del mismo sistema fimbria-fórnix (Amaral & Kurz, 1985; Unal et al., 2015). En conjunto, todas estas conexiones establecen un circuito conocido como la vía septo-hipocampal, crucial en la generación y mantenimiento de la actividad eléctrica hipocampal conocida como ritmo theta (Buzsáki, 2002; Unal et al., 2015) (Figura 2). Trabajos electrofisiológicos realizados en modelos animales de epilepsia han sugerido

que la ausencia de estas oscilaciones podría relacionarse con la patogénesis de la epilepsia del lóbulo temporal (Miller et al., 1994; Colom et al., 2006; Chauvière et al., 2009). Otros estudios tanto clínicos como experimentales han usado la imagenología por resonancia magnética con tensor de difusión y han reportado alteraciones específicas en el sistema fimbria-fórnix en sujetos con epilepsia del lóbulo temporal (Concha et al., 2005, 2010; Parekh et al., 2010; Luna-Munguia et al., 2021).

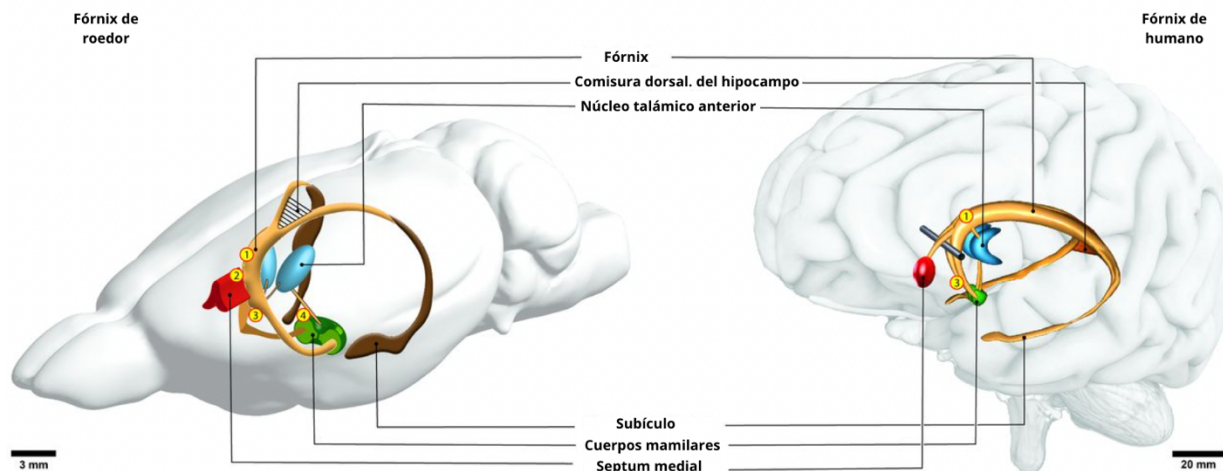


Figura 2. Comparación de la anatomía de la vía septo-hipocampal en roedores (izquierda) y humanos (derecha). En ambos casos se muestra cómo el septum medial (rojo) se conecta con el hipocampo (azul) a través del sistema fimbria-fórnix (amarillo). 1 y 3) Regiones pre y post comisurales de la fimbria o fórnix, 2) núcleo del septum medial). 4) cuerpos mamilares. Imagen tomada de Senova, 2020.

En el caso específico de la región septal, está localizada entre el cuerno anterior del ventrículo lateral y la parte dorsal de la línea media de la comisura anterior, dividiéndose en cuatro subregiones de acuerdo con su ubicación anatómica (lateral, medial, posterior y ventral). Desafortunadamente, muchos trabajos se han referido de manera vaga al área septal y sólo la han denominado como septum. Aspecto que puede llegar a provocar confusión y discrepancia al momento del reporte de resultados. Esto debido a que cada región septal cumple con roles funcionales específicos pues cada una conecta con

estructuras cerebrales diferentes, recibiendo y proyectando diversos tipos de fibras en cada una de ellas (Dutar et al., 1995; Takeuchi et al., 2021). En este proyecto de tesis denominaremos a nuestra región de interés como septum medial. Como ya se mencionó anteriormente, esta estructura alberga poblaciones de neuronas colinérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas, todas ellas conectadas entre sí (Kiss, Patel, Baimbridge, et al., 1990; Hajszan et al., 2004; Leão et al., 2015) y proyectándose hacia otras regiones cerebrales como el hipocampo a través del sistema fimbria-fórnix (Sun et al., 2014) (Figura 2). En este sentido, pocos estudios se han enfocado en el estudio de la participación del septum medial en el desarrollo de la epilepsia del lóbulo temporal (Y. Wang et al., 2020; Hristova et al., 2021a).

La epilepsia del lóbulo temporal es la forma más frecuente de epilepsia con crisis focales secundarias a una etiología estructural, siendo las más comunes: las lesiones cerebrales, los tumores, y las malformaciones estructurales de regiones cerebrales específicas (Mathern et al., 1995; Engel, 1996; Blair, 2012). Sin embargo, algunos pacientes carecen de evidencia inicial alguna que haya precipitado la enfermedad, casos donde los factores hereditarios cargan con la causa de la enfermedad (Harvey et al., 1997; Sztriha et al., 2002). En estos casos, aún se desconocen los mecanismos que subyacen el origen del desorden neurológico y los cambios progresivos que van ocurriendo en la microestructura de ciertas regiones cerebrales antes de la detonación de la primera crisis epiléptica. A nivel clínico resulta muy complicado dar un seguimiento al proceso epileptogénico, por ello la relevancia de los modelos animales. Estudios longitudinales realizados en modelos animales de epilepsia del lóbulo temporal han descrito cambios estructurales tanto a nivel de sustancia gris como de sustancia blanca (Laitinen et al., 2010; Parekh et al., 2010; van Eijsden et al., 2011; Janz et al., 2017; Salo et al., 2017; H. Wang et al., 2017; Luna-Munguia et al., 2021). La inducción del *status epilepticus*, definido por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) como resultado de mecanismos que conducen a convulsiones anormalmente prolongadas o la falla de los mecanismos que las detienen (Trinka, E., 2015), es el factor que detona los diversos cambios conductuales y neurofisiológicos característicos de la patogénesis de la epilepsia del lóbulo temporal. Sin embargo, aún quedan pendientes los estudios que permitan rastrear los cambios

microestructurales e histológicos que ocurren como consecuencia de un sutil defecto o daño a nivel de una estructura límbica específica. A la postre, representará el factor predisponente capaz de incrementar la susceptibilidad a detonar la primera crisis epiléptica y el subsecuente desarrollo de la enfermedad.

El desbalance entre la neurotransmisión excitadora e inhibitoria ha sido señalado como uno de los mecanismos esenciales de la ictogénesis (proceso a través del cual se inicia una crisis epiléptica) (Thomas et al., 2003, 2004; Blauwblomme et al., 2014; Luna-Munguia et al., 2019) y del desarrollo de la epilepsia del lóbulo temporal (During & Spencer, 1993; Cavus et al., 2005, 2008; Luna-Munguia et al., 2011). Reportándose niveles extracelulares elevados de glutamato y disminuidos de ácido gamma amino butírico (GABA), en ambos casos consecuencia de la pérdida masiva de neuronas y las diversas alteraciones que esto provoca a nivel de transportadores, enzimas y receptores entre otros.

Otros estudios se han enfocado en el estudio de la participación del sistema colinérgico en la epilepsia del lóbulo temporal pues se considera a la acetilcolina como el segundo neurotransmisor excitador más abundante a nivel cerebral. Los resultados obtenidos sugieren que las fallas en la neurotransmisión colinérgica pueden alterar la actividad del ritmo theta hipocampal (en ratas, su rango de frecuencia va de 4 hasta 12 Hz) y desencadenar desde trastornos en los procesos de aprendizaje y memoria hasta epilepsia (Jerusalinsky et al., 1997; Kitchigina et al., 2013; Lévesque & Avoli, 2018).

En el caso específico de la ELT, 30% de los pacientes desarrollan farmacorresistencia (Löscher, 2005; Löscher & Schmidt, 2011). Siendo la esclerosis hipocampal, la anomalía estructural más relacionada con dicha refractariedad (Bernasconi, 2006; Blümcke & Spreafico, 2012; Thom, 2014; Walker, 2015). Dicha esclerosis hipocampal se caracteriza por una pérdida segmentaria de neuronas piramidales y astrogliosis en regiones como CA1 y CA4. A nivel de giro dentado se ha reportado una pérdida masiva de neuronas hilares asociada a la adopción de un patrón de dispersión de las neuronas granulares, lo cual provoca que aumente el grosor y se difuminen los bordes de la capa granular

(Sloviter, 1987; Houser, 1990; Bernasconi, 2006; Blümcke & Spreafico, 2012; Blümcke et al., 2013). Este patrón restringido del daño permite diferenciar la esclerosis hipocampal de otras patologías como las lesiones isquémicas o hipóxicas, donde el daño suele estar más generalizado.

En condiciones normales, la presencia de células piramidales y granulares conforman las capas del hipocampo, donde las fibras musgosas son los axones de las células granulares que comunican a las piramidales en la región CA3. Sin embargo, bajo condiciones patológicas todos los cambios estructurales e histopatológicos culminarán en alteraciones a nivel de conectividad, pues la descarga repetida de las neuronas granulares destruirá a las células musgosas y neuronas piramidales en CA3 (Sloviter, 1991; Curia et al., 2014).

Los modelos animales tienen como objetivo representar las características celulares, moleculares, clínicas y fisiopatológicas de una enfermedad (Curia et al., 2008). En este trabajo nuestra intención no era favorecer los cambios estructurales e histológicos a través de la detonación de crisis epilépticas en un modelo animal de epilepsia. Nuestro objetivo fue dañar a la población de neuronas GABAérgicas y a la población de neuronas colinérgicas del septum medial de ratas sanas (intactas) mediante la inyección de saporinas y evaluar los cambios que a la postre se suscitarían tanto en la región septal como en estructuras alejadas pero conectadas al sitio de la inyección. Dichas saporinas son sustancias que inactivan el ribosoma de las células a través de la inhibición de la síntesis de proteínas. Por ello, al conjugarse con anticuerpos específicos son capaces de actuar sobre células específicas, provocando la muerte de dichas células y alterando el funcionamiento de las regiones aledañas a la inyección. Para dañar a la población de neuronas GABAérgicas del septum medial usamos una saporina conocida como GAT1-SAP (Pang et al., 2011; Köppen et al., 2013; Roland, Stewart, et al., 2014; Zafar & Jabeen, 2018). Para el caso de la población de neuronas colinérgicas del septum medial, usamos una saporina conocida como 192-IgG-SAP (Silveira et al., 2002; Rosal Lustosa et al., 2019; Soares et al., 2019).

JUSTIFICACIÓN.

Alrededor de 60 millones de personas sufren epilepsia a nivel mundial. Específicamente, la epilepsia del lóbulo temporal es el tipo de epilepsia más frecuente y el más relacionado a la farmacorresistencia. Este trastorno se ha asociado a factores predisponentes que ocurren en etapas tempranas de la vida del paciente. Sin embargo, algunos pacientes carecen de evidencia inicial alguna que haya precipitado la enfermedad. En estos casos, aún se desconocen los mecanismos que subyacen el origen del desorden neurológico y los cambios progresivos que van ocurriendo en la microestructura de ciertas regiones cerebrales antes de la detonación de la primera crisis epiléptica. Una de las explicaciones al desarrollo de la epilepsia del lóbulo temporal se enfoca en el desbalance en la neurotransmisión excitadora e inhibitoria originado por fallas en el funcionamiento de las proyecciones septo-hipocampales. Pocos estudios se han enfocado en el estudio de la participación del septum medial en el desarrollo de la epilepsia del lóbulo temporal. A nivel clínico resulta muy complicado dar un seguimiento al proceso epileptogénico pues generalmente el paciente llega al médico con la enfermedad establecida. Por ello, la relevancia de los modelos animales y de las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas. Esto nos permitirá evaluar y caracterizar las anomalías anatómicas que ocurren tanto en el sitio de inyección de las saporinas como en regiones alejadas pero conectadas a dicho lugar.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿El daño en las conexiones GABAérgicas o colinérgicas del septum medial de ratas intactas inducirá cambios en la estructura e integridad de otras regiones cerebrales alejadas pero conectadas al sitio de la lesión?

HIPÓTESIS.

El daño de las conexiones GABAérgicas o colinérgicas del septum medial de ratas intactas inducirá una reducción significativa de dichas poblaciones neuronales a nivel de la lesión, lo cual afectará no sólo la densidad neuronal sino también la estructura y la integridad de regiones cerebrales alejadas pero conectadas al sitio de la lesión.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar los efectos posteriores a la lesión inducida sobre la vía septo-hipocampal en ratas.

1 Objetivos específicos.

- Evaluar la ausencia de malformaciones cerebrales en las ratas mediante imágenes por resonancia magnética de tipo anatómicas previo al protocolo de experimentación del proyecto.

- Evaluar los efectos que causará el daño inducido sobre las interneuronas GABAérgicas o colinérgicas del septum medial de ratas.

- Evaluar, mediante el marcaje inmunohistoquímico de transportadores GAT1, el grado de lesión que inducirá la inyección de la saporina GABAérgica en el septum medial como región de origen de la vía septo-hipocampal

- Evaluar, mediante la técnica de inmunohistoquímica la presencia de la enzima colina acetiltransferasa, lo cual refleja el grado de lesión que inducirá la inyección de la saporina colinérgica en el septum medial como región de origen de la vía septo-hipocampal.

- Evaluar, mediante la técnica histológica Azul de toluidina, el daño axonal inducido en la fimbria como región comunicante de la vía septo-hipocampal.

- Evaluar, mediante la técnica histológica de tinción de Timm, el daño estructural y neuronal inducido en el hipocampo dorsal como región blanco o diana de la vía septo-hipocampal.

- Evaluar, mediante la técnica histológica de tinción de Nissl, la pérdida neuronal y citoarquitectura en hipocampo dorsal, de la fimbria, del tálamo dorso-medial y de la amígdala

MATERIALES Y MÉTODOS.

1 Animales

Se utilizaron 44 ratas Sprague-Dawley macho (con el fin de evitar alteraciones estructurales y de neurotransmisión debido a los cambios hormonales de las hembras) de 38 días de edad al inicio del estudio,. Los animales fueron solicitados al Bioterio del Instituto de Neurobiología y se mantuvieron en sus cuartos de alojamiento bajo condiciones controladas de ventilación, temperatura (20-22°C), humedad (50-60%) y ciclos normales luz/obscuridad de 12 horas. Los animales tuvieron acceso al agua y alimento *ad libitum*. El cuidado y manejo de los animales se hizo acorde a lo establecido por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999/SAGARPA). El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Neurobiología (Protocolo CICUAL #105A).

2 Imagenología por Resonancia Magnética

El protocolo de escaneo se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM). Aquí, se utilizó un resonador Bruker de 7 Teslas para especies pequeñas, el cual estaba conectado a una consola con software Paravision 7.0. Para la detección de la señal y la transmisión de pulsos de radiofrecuencia se usó una antena de superficie 2x2 de recepción única y una antena de volumen, respectivamente. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano (4%) - oxígeno a un flujo de 2.5 litros/minuto. Una vez corroborada la sedación, los animales fueron colocados sobre el riel e introducidos al resonador. Durante el escaneo, los animales inhalaban una mezcla de isoflurano (2%) - oxígeno a un flujo similar al de la inducción, se les mantuvo a 37°C mediante un sistema de recirculación de agua caliente y se les monitoreó su frecuencia respiratoria.

El objetivo de este escaneo de 4 minutos por animal fue obtener imágenes anatómicas con contraste T2 que nos permitieran garantizar que los animales que íbamos a utilizar

no tuvieran algún tipo de lesión cerebral (desde quistes hasta ventriculomegalia). Aproximadamente entre 10 y 15% de los animales se excluyeron de este protocolo por anomalías anatómicas.

3 Cirugía estereotáxica

Seis días después del escaneo, los 44 animales usados para el desarrollo de este proyecto de tesis fueron asignados al azar a uno de los siguientes grupos (Figura 4):

a) Grupo Control (n=11). Sin procedimiento quirúrgico.

b) Grupo PBS (por sus siglas en inglés, Phosphate Buffer Saline) o vehículo (n=11).

A cada animal se le inyectaron 1.2 μ l de la solución amortiguadora a una concentración de 0.1M. Flujo de la administración: 0.1 μ l/min.

c) Grupo saporina GABAérgica (GAT1-SAP, comprada a Advanced Targeting Systems; n=11). La saporina fue disuelta en PBS 0.1M. A cada animal se inyectaron en el septum medial 1.2 μ l de dicha solución a una concentración de 325 ng/ μ l (Pang et al., 2011; Roland et al., 2014a, 2014b). Flujo de la administración: 0.1 μ l/min.

d) Grupo saporina colinérgica (192-IgG-SAP, comprada a Advanced Targeting Systems; n=11). La saporina fue disuelta en PBS 0.1M. A cada animal se le inyectaron en el septum medial 1.2 μ l de dicha solución a una concentración de 375 ng/ μ l (Ferencz et al., 2000, 2001). Flujo de la administración: 0.1 μ l/min.

Los animales sometidos a la cirugía fueron anestesiados con una mezcla de ketamina-xilacina (70 y 10 mg/kg, respectivamente), inyectada vía intraperitoneal. Posteriormente, se les colocó sobre el marco estereotáxico (Stoelting). Con base en el atlas estereotáxico de Paxinos (George Paxinos & Charles Watson, 2023) y cuyas coordenadas fueron previamente establecidas en el laboratorio para este tamaño de animales (anteroposterior = 0.1 mm; lateral = -2 mm; profundidad = -6.8 mm; ángulo de inclinación de 20°), se les realizó un trépano craneal a nivel de septum medial. La inyección del líquido correspondiente se hizo a través de una jeringa Hamilton acoplada a una bomba de

infusión conectada a un controlador digital (Micro4 MicroSyringe Pump Controller, WPI). Al terminar la inyección, la aguja se retiró paulatinamente y se suturó la incisión. A todos los animales se les inyectó una dosis de ketorolaco (30 mg/ml; PiSA) al finalizar la cirugía y 24 horas después del procedimiento.

4 Inmunofluorescencia

Esta técnica se utilizó para evaluar el daño neuronal infligido a nivel del septum medial. Siete días después de la cirugía, dos animales por grupo fueron perfundidos de manera intracardiaca con solución salina (0.9%) y posteriormente con solución de paraformaldehído (4%). Los cerebros de los animales fueron removidos y post-fijados en solución fresca de paraformaldehído (4%) por 24 horas. Al día siguiente, los cerebros se colocaron en vasos limpios con solución de sacarosa al 20%. Dos días después, se movieron a vasos limpios con solución de sacarosa al 30%. Cuarenta y ocho horas después fueron congelados con hielo seco y almacenados a -70°C. Días después, cada cerebro fue rebanado mediante el uso de un crióstato (Leica Biosystems 3050S). Las rebanadas coronales de 20 micras de grosor (específicamente a la altura donde se encuentra el septum medial) se colectaron de manera seriada en placas con pocillos que contenían PBS 1X frío; al finalizar, las placas se guardaron en un refrigerador a 4°C hasta el día en que fueran a ser procesadas para inmunofluorescencia (Figura 3).

Para llevar a cabo el protocolo de inmunofluorescencia, cada rebanada se incubó en solución bloqueadora (albúmina bovina sérica al 2% y tritón X-100 al 0.3%) por 45 minutos a 4°C y bajo agitación constante. Posteriormente, para el doble marcaje, cuatro rebanadas por cerebro fueron usadas para determinar el grado de pérdida de neuronas tanto GABAérgicas como colinérgicas.

Para evaluar la pérdida de neuronas GABAérgicas a nivel del septum medial, las rebanadas fueron incubadas con los anticuerpos primarios preparados en una mezcla de 100µl de PBS 1X y solución bloqueadora (anti-parvalbumin mouse monoclonal (1:300;

Sigma-Aldrich) y anti-NeuN rabbit polyclonal (1:500; Sigma-Aldrich)) por 24 horas a 4°C. Pasado este tiempo, las rebanadas se sumergieron tres veces (10 minutos cada vez) en PBS 1X y fueron incubadas con los anticuerpos secundarios (Invitrogen; AlexaFluor 647 goat anti-mouse para el anticuerpo que marca neuronas GABAérgicas y AlexaFluor 488 donkey anti-rabbit para el anticuerpo que marca neuronas; diluidos en solución bloqueadora 1:400 y 1:500, respectivamente). Finalmente, las rebanadas se volvieron a sumergir tres veces (10 minutos cada vez) en PBS 1X y protegidas cuidadosamente con cubreobjetos de vidrio y medio de montaje Mowiol 4-88 previamente preparado con glicerol, buffer Tris-HCl (0.2 M, pH 8.5) y DABCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane). Las imágenes se adquirieron mediante el uso de un microscopio confocal láser (Zeiss LSM 780 DUO) bajo los siguientes parámetros: objetivo 25X, resolución 512 x 512, velocidad de captura 7 y Z stack (profundidad) a 7 en un mosaico de 5 x 8 con un *track laser* de 3.500 para cada anticuerpo. El procesamiento de imágenes y conteo neuronal en la región de interés (septum medial) se llevó a cabo de manera manual con el software Image J (FIJI), desarrollado por el National Institute of Health (NIH) (Schindelin et al., 2012).

Para evaluar la pérdida de neuronas colinérgicas a nivel del septum medial, las rebanadas fueron incubadas con los anticuerpos primarios (anti-choline acetyltransferase (ChAT) rabbit polyclonal (1:500; Sigma-Aldrich) y anti-NeuN mouse monoclonal (1:500; Abcam)) por 24 horas a 4°C. Luego, como se describió en el párrafo anterior, las rebanadas fueron lavadas e incubadas con los anticuerpos secundarios (Invitrogen; AlexaFluor 555 goat anti-rabbit para el anticuerpo que marca neuronas colinérgicas y AlexaFluor 488 goat anti-mouse para el anticuerpo que marca neuronas; ambos diluidos a 1:500 en solución bloqueadora). Posteriormente, las rebanadas fueron sumergidas y cubiertas como se describió anteriormente. Las imágenes se adquirieron mediante el uso de un microscopio de fluorescencia Apotome-Zeiss conectado a una computadora con el software AxioVision. El procesamiento de imágenes y conteo neuronal en la región de interés (septum medial) se llevó a cabo de manera manual con el software Image J (FIJI).

El uso de 2 diferentes microcopios de fluorescencia se debe a que la longitud de onda a la que se lee el anticuerpo 647 para poblaciones GABAérgicas no se encuentra habilitado en el Apotome, por lo que se requiere el uso del microscopio confocal. El resto de las rebanadas se visualizaron en el Apotome gracias a su capacidad para emitir el resto de las longitudes de onda (488 y 555) de las poblaciones colinérgicas, así como la facilidad de agenda y rapidez de la adquisición.

4.1 Cálculos matemáticos para obtención del porcentaje de cambio

Los porcentajes de cambio del conteo neuronal realizado de forma manual, se calcularon con base en el promedio del total de neuronas que tenían los dos animales que integraban al grupo control. Importante resaltar la similitud en los datos de los dos sujetos.

El cálculo para obtener el porcentaje de cambio correspondiente se hizo de la siguiente forma:

Promedio del par de animales Control : 100% :: Valor de la rata inyectada : x

$x = \text{Valor de la rata inyectada} (100) / \text{Promedio del par de animales Control}$

Porcentaje de cambio = 100 - x

5 Análisis histológicos

Siete semanas después de la cirugía (o el equivalente para las ratas del grupo Control), a todos los animales se les inyectó una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico. Aleatoriamente, tres animales por grupo fueron elegidos para ser sometidos al protocolo de azul de toluidina, tinción de Timm y tinción de Nissl (Figura 3).

5.1 Azul de Toluidina

El azul de toluidina es un colorante acidofílico que pertenece al grupo de las tiazidas, capaz de teñir los componentes ácidos de los tejidos (sulfatos y radicales fosfatos incorporados al ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico de las células). También usado en el campo de la epilepsia para identificar cambios estructurales y morfológicos del tejido cerebral como consecuencia del daño axonal (Sitovskaya et al., 2020).

Siete semanas después de la cirugía, cuatro animales de cada grupo fueron perfundidos de manera intracardiaca con solución salina (0.9%) y posteriormente con solución de paraformaldehído (4%) y glutaraldehído (50%). Los cerebros de los animales fueron removidos y post-fijados en solución fresca de paraformaldehído y glutaraldehído por 24 horas a 4°C. Al día siguiente, cada cerebro se colocó en un contenedor limpio con solución de paraformaldehído (4%) fresca y almacenados a 4°C hasta el día de la disección. Este día, a cada cerebro se le cortó un primer bloque pequeño que abarcaba la región de la fimbria y del hipocampo dorsal izquierdo; el segundo bloque pequeño abarcaba la región de la fimbria y del hipocampo dorsal derecho. Todos los bloques fueron lavados con un buffer de cacodilato sódico 0.1 M y una solución de glutaraldehído al 3% durante 60 minutos. Después, los bloques fueron tratados con tetróxido de osmio (0.1%) y una solución amortiguadora de cacodilato sódico 0.1 M por 6 horas. Posteriormente, cada bloque fue lavado un par de veces con solución amortiguadora de cacodilato sódico fresco (0.1 M; 10 minutos cada lavado), deshidratados un par de veces con alcohol etílico (empezando en 10%, 20%, 30%, hasta alcanzar una concentración absoluta; 10 minutos cada uno), y finalmente tratados con óxido de propileno por 30 minutos. Cada bloque fue sumergido en una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica por 48 horas. Las muestras fueron removidas y puestas en resina epóxica fresca por 5 horas. Después fueron sacadas y puestas en cápsulas BEEM que contenían resina epóxica fresca. Se llevaron a un horno y se dejaron ahí a 60°C por 36 horas. Después de la polimerización, cada bloque fue rebanado usando un ultramicrotomo (RMC Power Tone XL). Cada sección (de 600 nanómetros de grosor) fue teñida con azul de toluidina

y una solución de tetraborato de sodio al 5%. Las imágenes se adquirieron mediante el uso de un microscopio trinocular (AmScope) acoplado a una cámara digital.

5.2 Tinción de Timm

Esta tinción se utilizó para evaluar el brote de fibras musgosas que aparece a nivel de la capa molecular del giro dentado. También usada en el campo de la epilepsia (Sloviter, 1991; Feria-Romero et al., 2013; Zhao et al., 2022). El protocolo aquí usado se basó parcialmente en lo reportado previamente (Cintra et al., 1997). Tres animales de cada grupo fueron perfundidos de manera intracardiaca con solución salina (0.9%) y posteriormente con solución nonahidratada de sulfito de sodio 0.1 M y solución de Karnovsky (paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 1.25%, disueltos en PBS 0.1X; pH 7.4). Los cerebros de los animales fueron removidos y post-fijados en solución fresca de Karnovsky mezclada con solución de sucrosa al 30% para crioproteger al tejido. Una vez que los cerebros precipitaron, cada cerebro fue rebanado mediante el uso de un crióstato (Leica Biosystems 3050S). Las rebanadas coronales de 40 micras de grosor (específicamente a la altura donde se encuentra el hipocampo dorsal) se montaron en portaobjetos electro-cargados y las laminillas se sumergieron en solución de Timm (goma arábica al 30%, ácido cítrico 0.13 M, citrato de sodio 0.08 M, hidroquinona 0.15 M y nitrato de plata 0.005 M) por 90 minutos, a temperatura ambiente y en un cuarto oscuro. Finalmente, las rebanadas teñidas fueron contra-teñidas con una solución de violeta de cresilo al 0.1%. Para la visualización de las imágenes se utilizó un microscopio de luz AM Scope T690C-PL (objetivos 4X, 10X y 40X) acoplado a una cámara conectada al software AM Lite.

5.3 Tinción de Nissl

De cada grupo, dos animales fueron perfundidos de manera intracardiaca con solución salina (0.9%) y posteriormente con solución de paraformaldehído (4%). Los cerebros de los animales fueron removidos y post-fijados en solución fresca de paraformaldehído (4%) por 24 horas a 4°C. Al día siguiente, los cerebros se colocaron en vasos limpios con solución de sacarosa al 20%. Dos días después, se movieron a vasos limpios con

solución de sacarosa al 30%. Cuarenta y ocho horas después fueron congelados con hielo seco y almacenados a -70°C . Días después, cada cerebro fue rebanado mediante el uso de un crióstato (Leica Biosystems 3050S). Las rebanadas coronales de 90 micras de grosor (específicamente a la altura donde se encuentra el hipocampo dorsal, la fimbria, el tálamo dorso-medial y la amígdala) se iban colectando en placas con pocillos que contenían PBS 1X frío; al finalizar, las placas se guardaron en un refrigerador a 4°C hasta el día en que fueran a ser montadas en portaobjetos. Una vez montadas las rebanadas, las laminillas fueron teñidas con violeta de cresilo y usadas para identificar los límites citoarquitectónicos del hipocampo dorsal, de la fimbria, del tálamo dorso-medial y de la amígdala. Las imágenes se adquirieron mediante el uso de un microscopio de luz trinocular (AmScope) acoplado a una cámara digital. Con base en estas imágenes, se evaluó la severidad del daño tisular (Figura 3).

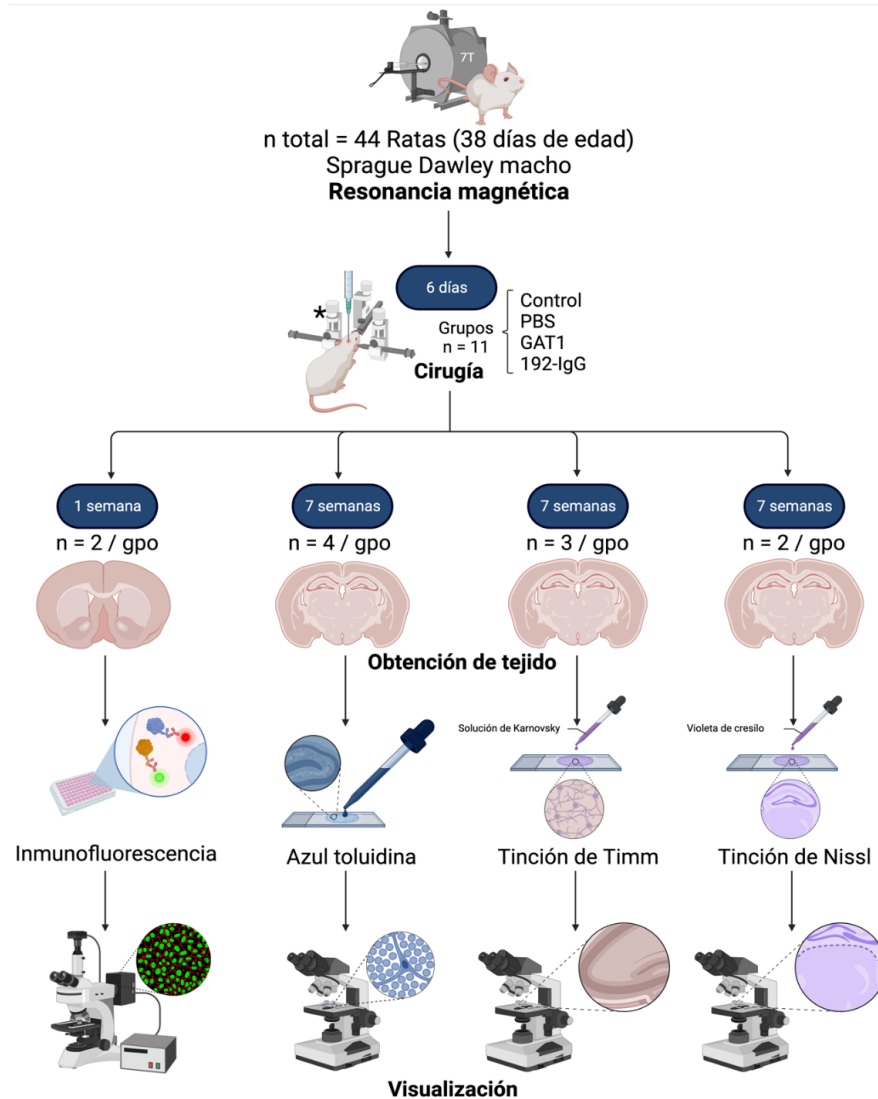


Figura 3. Diagrama del protocolo experimental. Todos los animales fueron escaneados para garantizar la integridad del tejido cerebral. Posteriormente, fueron divididos en cuatro grupos. Algunos animales fueron sometidos al análisis de inmunofluorescencia para confirmar el sitio de lesión a nivel del septum medial y evaluar la extensión del daño neuronal después de una semana de haber hecho la inyección correspondiente. Los demás animales fueron sometidos a tres protocolos histológicos: 1) azul de toluidina para identificar cambios estructurales y morfológicos del tejido cerebral como consecuencia del daño axonal, 2) tinción de Timm para evaluar el brote de fibras musgosas que aparece a nivel de las diferentes regiones que integran al hipocampo dorsal y 3) tinción de Nissl para evaluar el daño tisular y la muerte neuronal que ocurrió en regiones alejadas pero conectadas al sitio de la inyección.

RESULTADOS.

1 Inmunofluorescencia

Una semana después de la inyección de la saporina GABAérgica (GAT1-SAP) dentro del septum medial, se observó una reducción preferente de neuronas GABAérgicas ($\downarrow 73\%$ y $\downarrow 80\%$) (Figura 4C) y no de colinérgicas ($\downarrow 40\%$ y $\downarrow 35\%$) (Figura 4G). Los animales inyectados con la saporina colinérgica (192-IgG) dentro del septum medial mostraron una evidente reducción de neuronas colinérgicas ($\downarrow 89\%$ y $\downarrow 90\%$) (Figura 4H) y no de GABAérgicas ($\downarrow 30\%$ y $\downarrow 35\%$) (Figura 4D). Esto confirma que la inyección se realizó correctamente sobre el septum medial y demuestra que ambas saporinas usadas en este proyecto de tesis no son 100% selectivas pues son capaces de eliminar neuronas pertenecientes a otras poblaciones neuronales aunque en mucho menor medida.

En el caso de los animales inyectados con el vehículo (PBS), sus imágenes también se compararon con las de los animales del grupo Control y se observó un ligero decremento en el número de células tanto parvalbúmina(PV)-inmunoreactivas ($\downarrow 18\%$ y $\downarrow 19\%$) como colina acetiltransferasa(ChAT)-inmunoreactivas ($\downarrow 20\%$ y $\downarrow 21\%$) (Figura 4B, 4F). Esto indica que la lesión mecánica, secundaria a la inyección del vehículo, también puede inducir cierta destrucción de las poblaciones neuronales tanto GABAérgicas como colinérgicas; sin embargo, no al grado en que lo provocan las saporinas. Con base en estos resultados, establecimos el grado de efectividad de ambas saporinas y procedimos a los siguientes experimentos.

Importante resaltar la similitud en los datos de los dos sujetos que integran cada grupo. Esto nos permitió llevar a cabo una buena comparación de los porcentajes de cambio entre grupos.

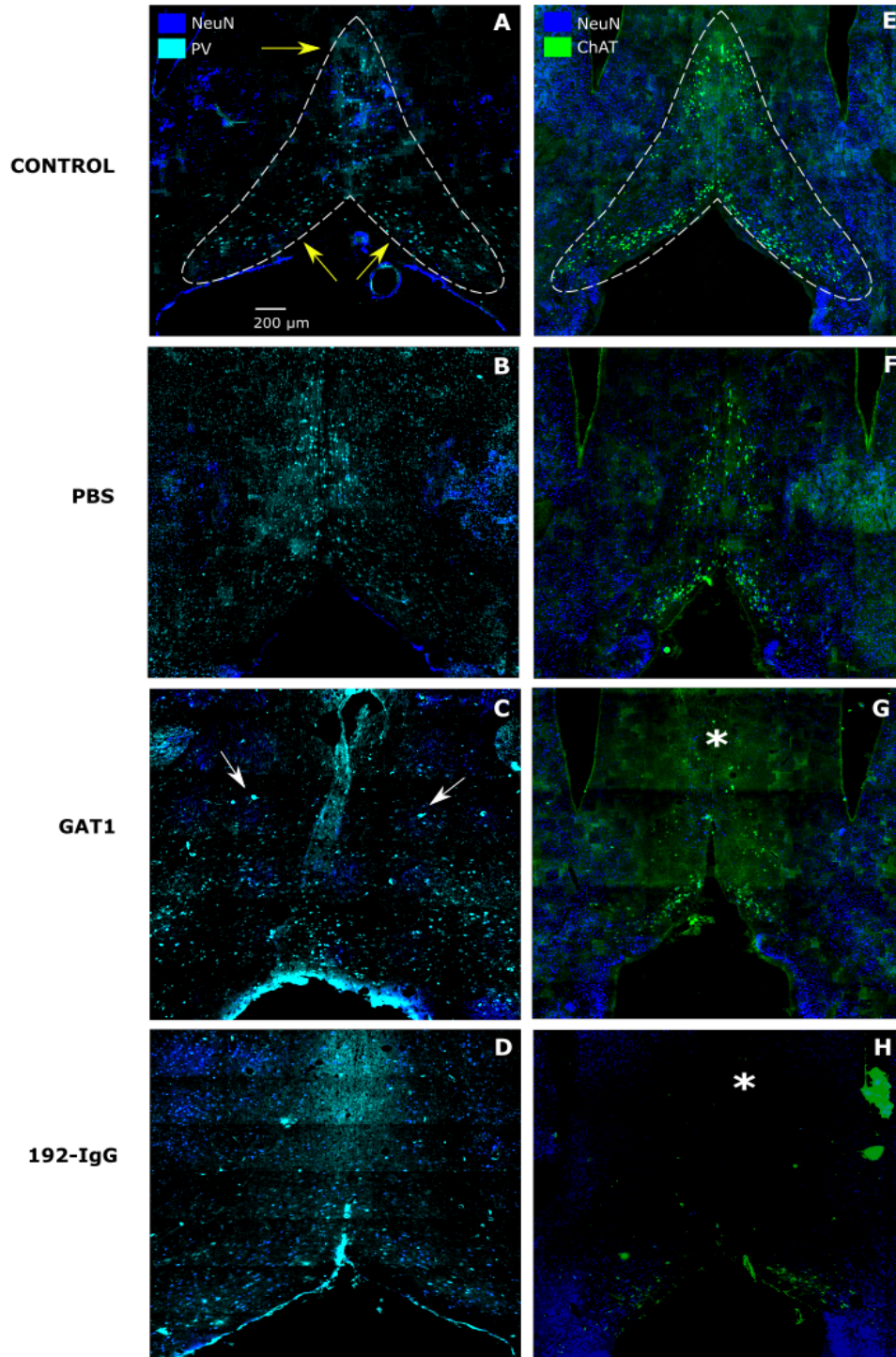


Figura 4. Neuronas inmunopositivas a parvalbúmina (PV) y a colina acetiltransferasa (ChAT), así como el marcaje neuronal mediante NeuN. Las líneas punteadas en A y E limitan el perímetro del septum medial intacto de las ratas control; las flechas amarillas indican las áreas del septum

medial donde se llevó a cabo la cuantificación neuronal. B y F muestran una ligera reducción de las neuronas GABAérgicas o colinérgicas, respectivamente, después de la inyección del vehículo (PBS) en el septum medial. C: la inyección de la saporina GABAérgica (GAT1-SAP) dentro del septum medial claramente deforma la estructura de dicha región y reduce principalmente la presencia de neuronas PV-inmunopositivas; la saporina GABAérgica es parcialmente selectiva pues las células ChAT-inmunoreactivas también se vieron afectadas, principalmente en la parte superior del septum medial (asterisco) (G). El efecto a la inversa ocurrió con la inyección de la saporina colinérgica (192-IgG) dentro del septum medial: las células ChAT-inmunopositivas fueron las principales afectadas (asterisco) (H) pero las células parvalbúmina-inmunoreactivas también se vieron ligeramente afectadas (D).

En la Tabla 1 se muestra el total de neuronas parvalbúmina-inmunoreactivas y colina acetiltransferasa-inmunoreactivas de las ocho ratas usadas para este fin. El conteo se realizó de manera manual a través de la herramienta *measure / Multi-point / ROIs* de Image J (FIJI) solo en aquellas células que inmunopositivas tanto a NeuN que identifica neuronas, como al anticuerpo selectivo a ChAT (colinérgico) o PV (GABAérgico) para evitar falsos positivos en sitios de ruido a causa de la técnica de inmunofluorescencia.

Cabe mencionar que esta técnica nos asegura que se hizo la inyección en el sitio de correcto al presentar una reducida cantidad de las poblaciones debido en parte a la lesión mecánica, pero principalmente a las saporinas parcialmente selectivas, por esta razón es que la $n = 2$ grupal parece suficiente para dicho propósito, ya que sumado al resto de la caracterización histológica se describe con éxito el desarrollo histopatológico secundario a la lesión de la vía septo-hipocampal.

Tabla 1. Conteo del número total de células GABAérgicas y colinérgicas de todos los animales sometidos al protocolo de inmunofluorescencia.

Grupo	Rata	ChAT-inmunoreactivas	PV-inmunoreactivas
Control	R352	355	228
Control	R353	308	251
Vehículo (PBS)	R354	229	198
Vehículo (PBS)	R355	255	203
GAT1-SAP	R397	201	62
GAT1-SAP	R398	218	51
192-IgG	R399	40	170
192-IgG	R400	34	155

2 Daño tisular

El grupo inyectado con la saporina GABAérgica en el septum medial presentó daño visible en la estructura en la fimbria (Figura 5G). La fimbria de los animales inyectados con el vehículo (PBS) o con la saporina colinérgica, no presentaron alteraciones histológicas (Figura 5D, J). Esto demuestra que el daño observado en el grupo inyectado con la saporina GABAérgica se debe a la neurotoxina y no a defectos relacionados con el tejido o a la tinción.

Los resultados obtenidos a partir de esta tinción sugieren que los cambios observados en el grupo inyectado con la saporina GABAérgica son secundarios a la pérdida axonal, aspecto que podría facilitar la hiperexcitabilidad neuronal.

Importante mencionar que las imágenes son presentadas en blanco y negro para evitar la sugerencia de artefactos y la malinterpretación de resultados.

3 Brote de fibras musgosas

El brote de fibras musgosas a nivel del hipocampo dorsal fue evaluado a través de la tinción de Timm (Figura 5), útil para la visualización del depósito de zinc vesicular contenido en dichas fibras, en una formación condensada de color oscuro presente en CA2 del hipocampo. Observándose un incremento evidente en el brote de fibras musgosas de los animales inyectados con la saporina GABAérgica (Figura 5I) al compararlos con los animales control (Figura 5C). Este brote aberrante de fibras musgosas no apareció ni en los animales inyectados con el vehículo (Figura 5F) ni en los animales inyectados con la saporina colinérgica (Figura 5L).

4 Muerte neuronal

Las rebanadas sometidas a la tinción de Nissl revelaron un daño significativo en el hipocampo dorsal, el tálamo dorso-medial y la amígdala de los animales a los que se les inyectó la saporina GABAérgica; efecto no observado en los animales de los otros grupos. Siendo evidente la reducción en el grosor de la capa piramidal a nivel de CA1 y CA3, así como un patrón de dispersión de las células remanentes (Figura 6D). Además, se observó una considerable muerte neuronal a nivel del tálamo dorso-medial (Figura 6H) y de la amígdala (Figura 6L), cuyo efecto se aprecia en la difusión de sus límites estructurales. Los cambios en los animales inyectados con la saporina colinérgica también fueron evidentes aunque no tan dramáticos como los observados en los animales inyectados con la saporina GABAérgica.

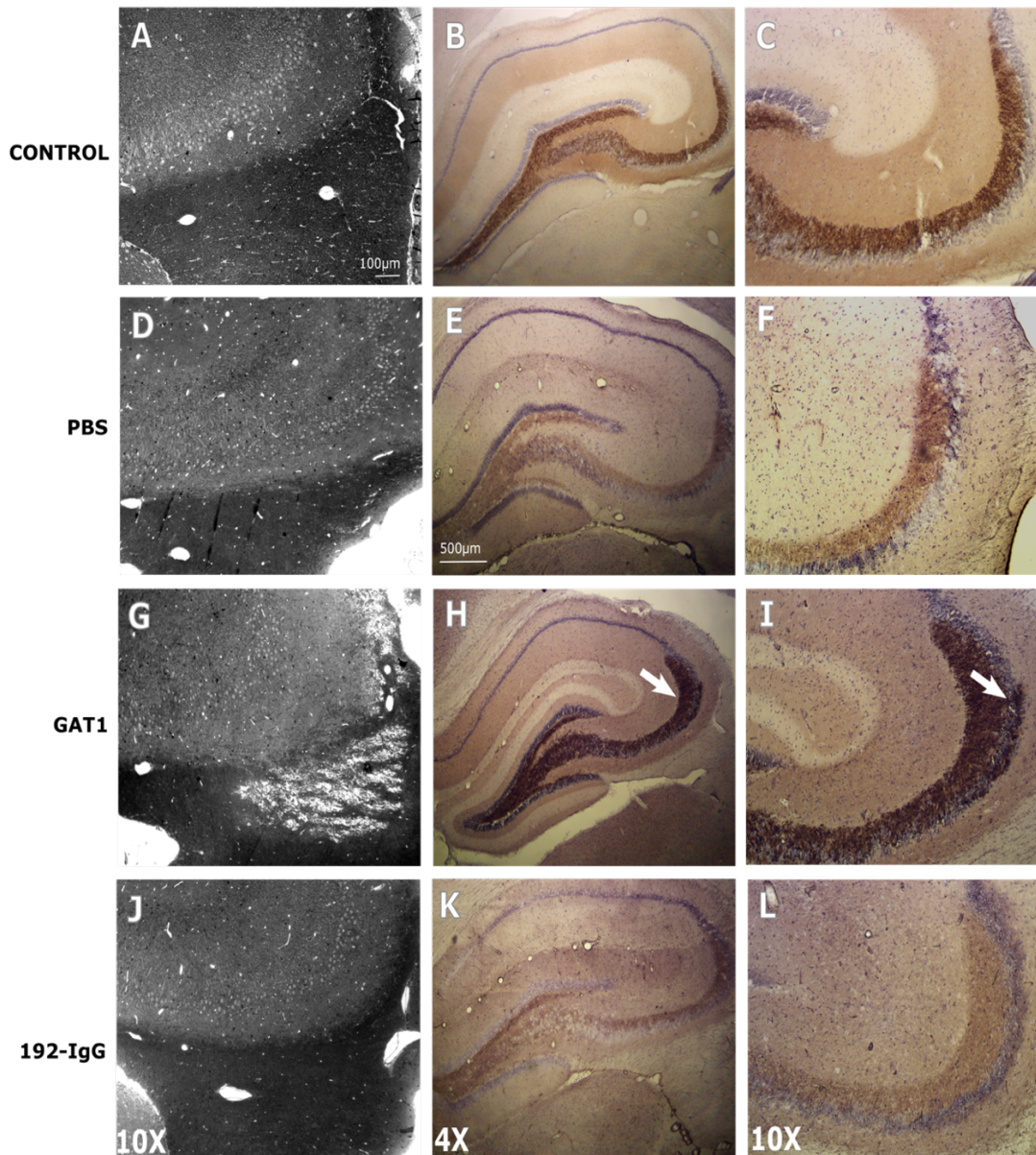


Figura 5. Terminales de fibras musgosas y daño tisular. La primera columna muestra las imágenes obtenidas a partir de la tinción con azul de toluidina. La segunda (objetivo de 4X) y la tercera columna (objetivo de 10X) muestran las imágenes obtenidas a partir de la tinción de Timm. Las microfotografías obtenidas a partir de la tinción con azul de toluidina abarcan la frontera entre el hipocampo dorsal (parte alta de las imágenes) y la fimbria (parte baja de las imágenes; la vainas de mielina de los axones se tiñieron de color obscuro) (A,D,G,J). La inyección de la saporina

GABAérgica dentro del septum medial claramente provocó daño tisular en la fimbria (G), un efecto no observado en los otros grupos. La tinción de Timm muestra las fibras musgosas a nivel de hipocampo dorsal de las ratas control (B, C) y de las ratas inyectadas con el vehículo (PBS) (E, F), con la saporina GABAérgica (H, I) y con la saporina colinérgica (K, L). Las flechas en (H,I) muestran un aumento aberrante en el brote de fibras musgosas a lo largo de la región de CA3 y de giro dentado. Este brote aberrante de fibras musgosas no se observó en los demás grupos.

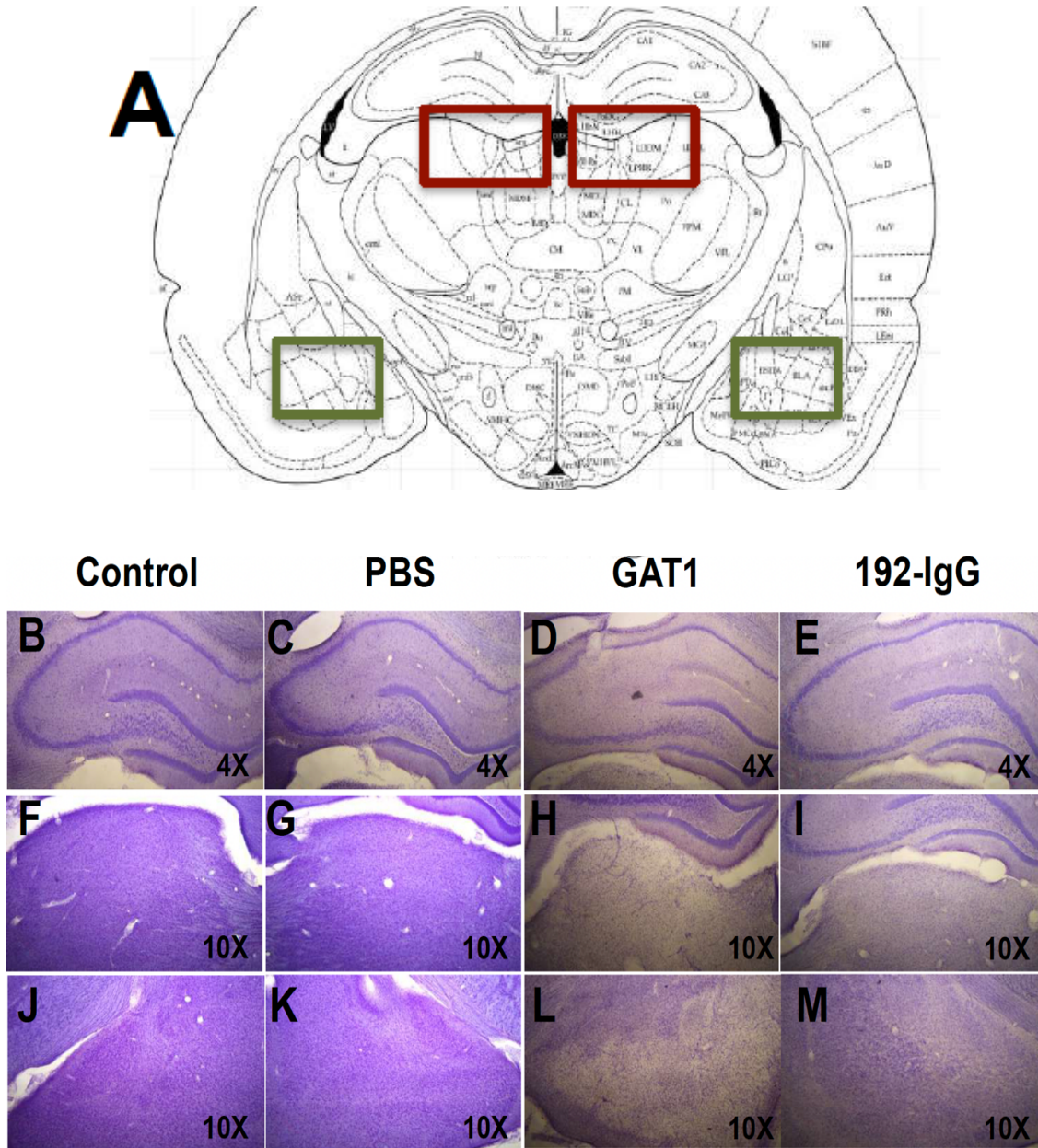


Figura 6. Rebanadas sometidas a la tinción de Nissl y pérdida celular. A: esquema representativo para enmarcar las áreas evaluadas (tálamo dorso-medial en rojo y amígdala en verde). La primera fila muestra las imágenes del hipocampo dorsal; la segunda fila muestra el tálamo dorso-medial; la tercera fila muestra a la amígdala. La inyección de la saporina GABAérgica en el septum medial indujo una dramática pérdida celular en las tres regiones cerebrales evaluadas (D, H, L). La inyección de la saporina colinérgica no causó semejante impacto (E, I, M). No se observó efecto alguno después de la inyección del vehículo (PBS) (C, G, K).

DISCUSIÓN.

Este trabajo de tesis muestra por primera vez que la lesión parcialmente selectiva de neuronas GABAérgicas y colinérgicas del septum medial puede afectar de manera diferencial tanto estructuras de sustancia gris como de sustancia blanca. A nivel histológico, la inyección de la saporina GABAérgica en septum medial dañó de manera visible la estructura de la fimbria, indujo pérdida neuronal en hipocampo dorsal, tálamo dorso-medial y amígdala, y provocó la aparición de un brote aberrante de fibras musgosas a nivel del hipocampo dorsal. Este último efecto llamó poderosamente nuestra atención pues es una característica histopatológica común en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal y que también ha llegado a ser reproducida en modelos animales de epilepsia (Thom, 2014). Estos cambios inducidos en ratas saludables a través de la alteración del septum medial sugieren el establecimiento de una red hiperexcitable que pudiera predisponer al cerebro a desarrollar actividad epileptiforme.

El septum medial es una región cerebral altamente interconectada con otras estructuras cerebrales y que además alberga poblaciones neuronales GABAérgicas (parvalbúmina-inmunoreactivas) (Freund, 1989) y colinérgicas (colina acetiltransferasa-inmunoreactivas) (Rye et al., 1984). Ambas con diferentes blancos hipocampales: las primeras inervan interneuronas hipocampales GABAérgicas (Freund & Antal, 1988), las cuales luego hacen sinapsis con las células piramidales (Tóth et al., 1997); las segundas contactan interneuronas inhibitorias, células piramidales y células granulares del dentado (Frotscher & Léránth, 1985). Además, el septum medial constituye una fuente de inervación hipocampal a través del sistema fimbria-fórnix, sitio donde la selectividad por cada blanco puede llegar a jugar un rol específico en la regulación de la actividad eléctrica hipocampal (Hangya et al., 2009; Lévesque & Avoli, 2018). Esto ha incrementado la relevancia del septum medial como un potencial modulador de la interfase septo-hipocampal tanto en la formación de la memoria como en la patofisiología de desórdenes neurológicos como la epilepsia.

Las anomalías del fórnix suelen ser bilaterales y simétricas en pacientes epilépticos con esclerosis hipocampal unilateral, sugiriendo que poblaciones adicionales de fibras a nivel del fórnix pudieran contribuir al daño bilateral. Entre éstas destacan las aferentes y en menor medida las comisurales (Concha et al., 2005, 2007; McDonald et al., 2010). Estudios en modelos animales han reportado que las lesiones en el sistema fimbria-fórnix que llegan a provocar denervación de las aferencias hipocampales, facilitan el desarrollo de la actividad epiléptica (Buzsáki et al., 1989; Ferencz et al., 1997, 2001). Este efecto podría deberse a la pérdida de las acciones moduladoras que ejerce la vía septo-hipocampal sobre la actividad eléctrica hipocampal pues dicha vía está relacionada con el ritmo theta (Lee et al., 1994; Buzsáki, 2002; Unal et al., 2015). Sin embargo, dada la complejidad de los circuitos involucrados, aún se desconocen cuáles son las alteraciones responsables de estos cambios. En este sentido, se han llegado a sugerir posibles causas como: 1) la muerte de interneuronas GABAérgicas septales (Covolan & Mello, 2000; Garrido Sanabria et al., 2006) y 2) la disminución en el número de neuronas colinérgicas septales (Cavalheiro, 1995; Follesa et al., 1999).

Estudios previos han simulado el daño a nivel de poblaciones neuronales GABAérgicas o colinérgicas mediante el uso de modelos animales. En estos trabajos han realizado lesiones permanentes de poblaciones neuronales mediante la inyección de saporinas, mismas que usamos en este trabajo de tesis a nivel del septum medial.

La saporina 192-IgG ha sido utilizada como un agente tóxico para las neuronas colinérgicas (Claudio Cuello et al., 1990; Wiley et al., 1991). Estudios previos, incluyendo el nuestro, han reportado que la inyección de la saporina 192-IgG en septum medial reduce los marcadores colinérgicos dentro del lapso de una semana post-inyección, observándose también una ligera reducción en el número de neuronas GABAérgicas septales (parvalbúmina-inmunoreactivas) (Craig et al., 2008). En este trabajo se reporta por primera vez cómo la inyección de la saporina colinérgica a nivel del septum medial es capaz de provocar ciertas alteraciones a nivel del hipocampo dorsal, fimbria, tálamo dorso-medial y amígdala. En términos generales, este efecto podría estar involucrado, en parte, en el proceso epileptogénico y a la postre en una mayor susceptibilidad a generar

crisis convulsivas y en la generalización de éstas. Estudios previos han descrito el efecto de la inyección de la saporina 192-IgG en diferentes regiones cerebrales previo a la estimulación eléctrica tipo “kindling” (estimulaciones eléctricas de baja intensidad de corriente que aumentan paulatinamente la excitabilidad neuronal), reportándose un aumento en la susceptibilidad de los animales para establecer el estado “kindled” (Ferencz et al., 2000, 2001; Silveira et al., 2002; Craig et al., 2008; Soares et al., 2019).

En este trabajo de tesis, también administramos una inmunotoxina GABAérgica en el septum medial para examinar la importancia de esta población neuronal. Como se ha reportado con anterioridad, esta saporina redujo significativamente el número de neuronas GABAérgicas parvalbúmina-inmunoreactivas dentro de los siete días post-inyección; sin embargo, no se alteró de manera considerable el número de neuronas colinérgicas presentes en dicha región (Pang et al., 2011; Köppen et al., 2013; Roland, Stewart, et al., 2014; Roland, Janke, et al., 2014). En adición al efecto celular inducido a nivel del sitio de inyección, también observamos efectos dramáticos que ocurrieron al paso de las semanas como: 1) un daño estructural evidente en la fimbria, posiblemente secundario a la pérdida axonal; algunos autores sugieren que este daño podría llegar a facilitar la hiperexcitabilidad neuronal (Scharfman, 2000); 2) pérdida neuronal en regiones cerebrales alejadas pero conectadas al sitio de inyección; 3) brote aberrante de fibras musgosas a nivel del hipocampo dorsal.

Uno de los resultados que más llamaron nuestra atención fue precisamente la presencia de un brote aberrante de fibras musgosas a nivel del hipocampo dorsal de los animales inyectados con la saporina GABAérgica. Estudios anteriores han sugerido que tras una lesión del sistema fimbria-fórnix, la vía GABAérgica septo-hipocampal pudiera estar involucrada en el brote aberrante de fibras musgosas a nivel del giro dentado (Mohapel et al., 1997). Los factores involucrados en la generación del brote de fibras musgosas aún se desconocen en su totalidad y representan un amplio debate a la hora de considerarlos como causa o consecuencia de las crisis epilépticas (Acsády et al., 1998; Cavazos et al., 1991; Buckmaster et al., 2002; Kim et al., 2003; Koyama & Ikegaya, 2004; Evstratova & Tóth, 2014). Algunos estudios han utilizado la microscopía electrónica y la

tinción de Timm para visualizar las proyecciones y terminaciones axonales de las fibras musgosas del giro dentado bajo condiciones normales y bajo condiciones experimentales que involucran cambios en la conectividad neuronal inducidos por lesiones específicas (Zimmer, 1973; Danscher, 1981; Laurberg & Zimmer, 1981; Frotscher & Zimmer, 1983).

En condiciones relacionadas con epilepsia, las fibras musgosas del giro dentado se ramifican y proyectan de manera aberrante hacia diversas capas moleculares, incluyendo proyecciones inversas (o en reversa) que forman sinapsis excitadoras con las dendritas de las células granulares, una situación que se cree que puede jugar un rol crucial en la generación de la actividad epiléptica (Buckmaster et al., 2002; Cavazos et al., 2003). Brotes abundantes de fibras musgosas aberrantes han sido reportados en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente (Mathern et al., 1995; Proper et al., 2000; Blümcke & Spreafico, 2012; Blümcke et al., 2013; Schmeiser et al., 2017), el tipo más común de epilepsia de origen focal (Téllez-Zenteno & Hernández-Ronquillo, 2012). Este brote aberrante también ha sido reportado en modelos animales de epilepsia (Cavazos et al., 1991; Lévesque et al., 2016). Sin embargo, existe un gran debate con respecto al rol que juega el brote de fibras musgosas en la epileptogénesis y en la epilepsia crónica. Algunos autores argumentan que es compensatoria (Sloviter et al., 2006; Schmeiser et al., 2017) mientras que otros claman que es epileptogénica (Feng et al., 2003; Hendricks et al., 2019). En nuestro caso, las ratas inyectadas con la saporina GABAérgica no exhibieron conductas alteradas típicas de un proceso epileptogénico, a pesar de las alteraciones histopatológicas descritas. Sin embargo, el brote de fibras musgosas puede ser considerado como un factor de riesgo capaz de influir no sólo en la susceptibilidad a detonar crisis epilépticas sino también en el riesgo a morir durante una crisis (datos del laboratorio sometidos a publicación).

Estudios recientes en modelos animales de epilepsia del lóbulo temporal sugieren que enfocarse en poblaciones neuronales específicas de la vía septo-hipocampal pudiera ser una herramienta promisorio para entender el proceso de epileptogénesis y para encontrar nuevas estrategias para evitar la detonación de las crisis epilépticas (Bao et al., 2020; Y. Wang et al., 2020; Hristova et al., 2021b; Velasquez et al., 2023). Los resultados

obtenidos servirán de base para la realización de otros proyectos de investigación dentro del laboratorio en donde se busque establecer si los cambios inducidos pudieran ser considerados como un factor predisponente al desarrollo de la epilepsia del lóbulo temporal y provocar un aumento en la susceptibilidad de los animales a presentar crisis epilépticas.

CONCLUSIÓN.

Uno de los factores asociados de manera importante a la epileptogénesis es el daño en el desarrollo y/o funcionamiento de las proyecciones septo-hipocampales, que a su vez están mediadas por la neurotransmisión tanto de GABA como acetilcolina, puesto que representan un elevado porcentaje de las aferencias hipocampales. Este tipo de lesión traerá como consecuencia el desbalance provocado por las fallas en los sistemas inhibitorios y por ende, un incremento de la excitabilidad. A nivel clínico, es muy complicado dar un seguimiento puntual a la serie de mecanismos que se van suscitando durante el desarrollo de la enfermedad. Por ello, se han desarrollado distintos modelos animales que simulan específicamente algunas de las características de la epilepsia del lóbulo temporal que se observan comúnmente dentro de la clínica. El desarrollo de otros modelos animales se ha enfocado en la inducción de la hiperexcitabilidad neuronal y rearrreglos estructurales del circuito hipocampal a través de lesiones de poblaciones neuronales específicas. A través de este proyecto de tesis se llevaron a cabo lesiones de poblaciones neuronales específicas dentro del septum medial, y se evaluó su efecto en estructuras cerebrales participantes de la vía septo-hipocampal que se encontraban lejanas pero conectadas al sitio de la lesión. Estos cambios podrían repercutir directamente sobre la susceptibilidad de los animales para el desarrollo de crisis recurrentes que deriven en epilepsia. Incluso, podrían repercutir en otras habilidades, afectando su actividad locomotora, su coordinación, o su capacidad para desempeñarse en diversas tareas conductuales (para evaluar memoria, o bien, conductas tipo ansiosas). Por ello, a futuro resulta de gran importancia el desarrollo y la implementación de nuevos modelos de análisis, así como la retroalimentación de los resultados presentes junto con otro tipo de técnicas (imagenológicas, electroencefalográficas, moleculares, optogenéticas), que nos permitan evaluar y diferenciar de manera longitudinal los cambios progresivos que sufre la formación hipocampal tras la lesión del septum medial ya descritos, sumado a las alteraciones en regiones lejanas pero conectadas al sitio de lesión.

REFERENCIAS

- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., & Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), 3386–3403. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-09-03386.1998>
- Amaral, D. G., & Kurz, J. (1985). An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 240(1), 37–59. <https://doi.org/10.1002/cne.902400104>
- Bao, J., Jin, Y., Jiang, Y., Khanna, R., & Yu, J. (2020). The Septum–Hippocampal Cholinergic Circuit: A Novel Pathway for Seizure Control. *Biological Psychiatry*, 87(9), 785–786. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.02.003>
- Bernasconi, A. (2006). Magnetic resonance imaging in intractable epilepsy: Focus on structural image analysis. *Advances in Neurology*, 97, 273–278.
- Blair, R. D. G. (2012). Temporal lobe epilepsy semiology. *Epilepsy Research and Treatment*, 2012, 751510. <https://doi.org/10.1155/2012/751510>
- Blauwblomme, T., Jiruska, P., & Huberfeld, G. (2014). Mechanisms of ictogenesis. *International Review of Neurobiology*, 114, 155–185. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418693-4.00007-8>
- Blümcke, I., & Spreafico, R. (2012). Cause matters: A neuropathological challenge to human epilepsies. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 22(3), 347–349. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00584.x>
- Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D. D., Bartolomei, F., Bernasconi, A., Bernasconi, N., Bien, C. G., Cendes, F., Coras, R., Cross, J. H., Jacques, T. S.,

- Kahane, P., Mathern, G. W., Miyata, H., Moshé, S. L., Oz, B., Özkara, Ç., Perucca, E., ... Spreafico, R. (2013). International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, *54*(7), 1315–1329. <https://doi.org/10.1111/epi.12220>
- Buckmaster, P. S., Zhang, G. F., & Yamawaki, R. (2002). Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(15), 6650–6658. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06650.2002>
- Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, *33*(3), 325–340. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00586-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00586-x)
- Buzsáki, G. (2005). Theta rhythm of navigation: Link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus*, *15*(7), 827–840. <https://doi.org/10.1002/hipo.20113>
- Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience*, *16*(2), 130–138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>
- Buzsáki, G., Ponomareff, G. L., Bayardo, F., Ruiz, R., & Gage, F. H. (1989). Neuronal activity in the subcortically denervated hippocampus: A chronic model for epilepsy. *Neuroscience*, *28*(3), 527–538. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90002-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90002-x)
- Catani, M., Dell'acqua, F., & Thiebaut de Schotten, M. (2013). A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *37*(8), 1724–1737. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.07.001>

- 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>
- Cavazos, J. E., Golarai, G., & Sutula, T. P. (1991). Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: Time course of development, progression, and permanence. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(9), 2795–2803. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-09-02795.1991>
- Cavazos, J. E., Zhang, P., Qazi, R., & Sutula, T. P. (2003). Ultrastructural features of sprouted mossy fiber synapses in kindled and kainic acid-treated rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 458(3), 272–292. <https://doi.org/10.1002/cne.10581>
- Cavus, I., Kasoff, W. S., Cassaday, M. P., Jacob, R., Gueorguieva, R., Sherwin, R. S., Krystal, J. H., Spencer, D. D., & Abi-Saab, W. M. (2005). Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Annals of Neurology*, 57(2), 226–235. <https://doi.org/10.1002/ana.20380>
- Cavus, I., Pan, J. W., Hetherington, H. P., Abi-Saab, W., Zaveri, H. P., Vives, K. P., Krystal, J. H., Spencer, S. S., & Spencer, D. D. (2008). Decreased hippocampal volume on MRI is associated with increased extracellular glutamate in epilepsy patients. *Epilepsia*, 49(8), 1358–1366. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01603.x>
- Chauvière, L., Raftafi, N., Thinus-Blanc, C., Bartolomei, F., Esclapez, M., & Bernard, C. (2009). Early deficits in spatial memory and theta rhythm in experimental temporal lobe epilepsy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(17), 5402–5410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4699-08.2009>

- Cintra, L., Granados, L., Aguilar, A., Kemper, T., DeBassio, W., Galler, J., Morgane, P., Durán, P., & Díaz-Cintra, S. (1997). Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus*, 7(2), 184–191. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1997\)7:2<184::AID-HIPO5>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:2<184::AID-HIPO5>3.0.CO;2-N)
- Claudio Cuello, A., Pioro, E. P., & Ribeiro-da-Silva, A. (1990). Cellular and subcellular localization of nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neurochemistry International*, 17(2), 205–213. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(90\)90143-h](https://doi.org/10.1016/0197-0186(90)90143-h)
- Colom, L. V., Castaneda, M. T., Reyna, T., Hernandez, S., & Garrido-Sanabria, E. (2005). Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse (New York, N.Y.)*, 58(3), 151–164. <https://doi.org/10.1002/syn.20184>
- Colom, L. V., García-Hernández, A., Castañeda, M. T., Perez-Cordova, M. G., & Garrido-Sanabria, E. R. (2006). Septo-hippocampal networks in chronically epileptic rats: Potential antiepileptic effects of theta rhythm generation. *Journal of Neurophysiology*, 95(6), 3645–3653. <https://doi.org/10.1152/jn.00040.2006>
- Concha, L., Beaulieu, C., & Gross, D. W. (2005). Bilateral limbic diffusion abnormalities in unilateral temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, 57(2), 188–196. <https://doi.org/10.1002/ana.20334>
- Concha, L., Beaulieu, C., Wheatley, B. M., & Gross, D. W. (2007). Bilateral white matter diffusion changes persist after epilepsy surgery. *Epilepsia*, 48(5), 931–940. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01006.x>

- Concha, L., Livy, D. J., Beaulieu, C., Wheatley, B. M., & Gross, D. W. (2010). In Vivo Diffusion Tensor Imaging and Histopathology of the Fimbria-Fornix in Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 30(3), 996–1002. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1619-09.2010>
- Covolán, L., & Mello, L. E. (2000). Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Research*, 39(2), 133–152. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(99\)00119-9](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(99)00119-9)
- Craig, L. A., Hong, N. S., Kopp, J., & McDonald, R. J. (2008). Reduced cholinergic status in hippocampus produces spatial memory deficits when combined with kainic acid induced seizures. *Hippocampus*, 18(11), 1112–1121. <https://doi.org/10.1002/hipo.20471>
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S. G., & Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*, 172(2), 143–157. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.019>
- Danscher, G. (1981). Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry*, 71(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/BF00592566>
- During, M. J., & Spencer, D. D. (1993). Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet (London, England)*, 341(8861), 1607–1610. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90754-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90754-5)
- Dutar, P., Bassant, M. H., Senut, M. C., & Lamour, Y. (1995). The septohippocampal pathway: Structure and function of a central cholinergic system. *Physiological Reviews*, 75(2), 393–427. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.2.393>

- 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)
- Evstratova, A., & Tóth, K. (2014). Information processing and synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber terminals. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 28. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00028>
- Feng, L., Molnár, P., & Nadler, J. V. (2003). Short-Term Frequency-Dependent Plasticity at Recurrent Mossy Fiber Synapses of the Epileptic Brain. *Journal of Neuroscience*, 23(12), 5381–5390. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-12-05381.2003>
- Ferencz, I., Kokaia, M., Keep, M., Elmér, E., Metsis, M., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (1997). Effects of cholinergic denervation on seizure development and neurotrophin messenger RNA regulation in rapid hippocampal kindling. *Neuroscience*, 80(2), 389–399. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00006-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00006-7)
- Ferencz, I., Leanza, G., Nanobashvili, A., Kokaia, M., & Lindvall, O. (2000). Basal forebrain neurons suppress amygdala kindling via cortical but not hippocampal cholinergic projections in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 12(6), 2107–2116. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00077.x>
- Ferencz, I., Leanza, G., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Kokaia, M., & Lindvall, O. (2001). Septal cholinergic neurons suppress seizure development in hippocampal kindling in rats: Comparison with noradrenergic neurons. *Neuroscience*, 102(4), 819–832. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00499-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00499-1)
- Feria-Romero, I. A., Alonso-Vanegas, M., Rocha-Arrieta, L., Villeda-Hernández, J., Escalante-Santiago, D., Lorigados-Pedré, L., Morales-Chacón, L., Grijalva-Otero, I., & Orozco-Suárez, S. (2013). Mecanismos de neurodegeneración en la epilepsia

del lóbulo temporal. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 51(2), 137–148.
<https://doi.org/10.4067/S0717-92272013000200007>

Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (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>

Follesa, P., Tarantino, A., Floris, S., Mallei, A., Porta, S., Tuligi, G., Cagetti, E., Caddeo, M., Mura, A., Serra, M., & Biggio, G. (1999). Changes in the gene expression of GABAA receptor subunit mRNAs in the septum of rats subjected to pentylenetetrazol-induced kindling. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 70(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(99\)00118-7](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(99)00118-7)

Freund, T. F. (1989). GABAergic septohippocampal neurons contain parvalbumin. *Brain Research*, 478(2), 375–381. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91520-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91520-5)

Freund, T. F., & Antal, M. (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 336(6195), 170–173.
<https://doi.org/10.1038/336170a0>

Frotscher, M., & Léránth, C. (1985). Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: A combined light and electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology*, 239(2), 237–246. <https://doi.org/10.1002/cne.902390210>

Frotscher, M., & Zimmer, J. (1983). Lesion-induced mossy fibers to the molecular layer of the rat fascia dentata: Identification of postsynaptic granule cells by the Golgi-EM technique. *The Journal of Comparative Neurology*, 215(3), 299–311.
<https://doi.org/10.1002/cne.902150306>

- Fuhrmann, F., Justus, D., Sosulina, L., Kaneko, H., Beutel, T., Friedrichs, D., Schoch, S., Schwarz, M. K., Fuhrmann, M., & Remy, S. (2015). Locomotion, Theta Oscillations, and the Speed-Related Firing of Hippocampal Neurons Are Controlled by a Medial Septal Glutamatergic Circuit. *Neuron*, 86(5), 1253–1264. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.001>
- Garrido Sanabria, E. R., Castañeda, M. T., Banuelos, C., Perez-Cordova, M. G., Hernandez, S., & Colom, L. V. (2006). Septal GABAergic neurons are selectively vulnerable to pilocarpine-induced status epilepticus and chronic spontaneous seizures. *Neuroscience*, 142(3), 871–883. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.06.057>
- George Paxinos, & Charles Watson. (2023). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (7a ed.). Academic Press.
- Guzmán-Jiménez, D. E., & Velasco-Monroy, A. L. (2016). Alteraciones Genéticas y Pruebas Citogenéticas relacionadas con Epilepsia de Lóbulo Temporal Mesial. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 16(5), 39–47.
- Hajszan, T., Alreja, M., & Leranth, C. (2004). Intrinsic vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive input to septohippocampal parvalbumin-containing neurons: Novel glutamatergic local circuit cells. *Hippocampus*, 14(4), 499–509. <https://doi.org/10.1002/hipo.10195>
- Hangya, B., Borhegyi, Z., Szilágyi, N., Freund, T. F., & Varga, V. (2009). GABAergic Neurons of the Medial Septum Lead the Hippocampal Network during Theta Activity. *The Journal of Neuroscience*, 29(25), 8094–8102. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5665-08.2009>

- Harvey, A. S., Berkovic, S. F., Wrennall, J. A., & Hopkins, I. J. (1997). Temporal lobe epilepsy in childhood: Clinical, EEG, and neuroimaging findings and syndrome classification in a cohort with new-onset seizures. *Neurology*, *49*(4), 960–968. <https://doi.org/10.1212/wnl.49.4.960>
- Hendricks, W. D., Westbrook, G. L., & Schnell, E. (2019). Early detonation by sprouted mossy fibers enables aberrant dentate network activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(22), 10994–10999. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821227116>
- Houser, C. R. (1990). Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Research*, *535*(2), 195–204. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91601-c](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91601-c)
- Hristova, K., Martinez-Gonzalez, C., Watson, T. C., Codadu, N. K., Hashemi, K., Kind, P. C., Nolan, M. F., & Gonzalez-Sulser, A. (2021a). Medial septal GABAergic neurons reduce seizure duration upon optogenetic closed-loop stimulation. *Brain: A Journal of Neurology*, *144*(5), 1576–1589. <https://doi.org/10.1093/brain/awab042>
- Hristova, K., Martinez-Gonzalez, C., Watson, T. C., Codadu, N. K., Hashemi, K., Kind, P. C., Nolan, M. F., & Gonzalez-Sulser, A. (2021b). Medial septal GABAergic neurons reduce seizure duration upon optogenetic closed-loop stimulation. *Brain: A Journal of Neurology*, *144*(5), 1576–1589. <https://doi.org/10.1093/brain/awab042>
- Janz, P., Schwaderlapp, N., Heining, K., Häussler, U., Korvink, J. G., von Elverfeldt, D., Hennig, J., Egert, U., LeVan, P., & Haas, C. A. (2017). Early tissue damage and microstructural reorganization predict disease severity in experimental epilepsy. *eLife*, *6*, e25742. <https://doi.org/10.7554/eLife.25742>

- Jerusalinsky, D., Kornisiuk, E., & Izquierdo, I. (1997). Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochemical Research*, 22(4), 507–515. <https://doi.org/10.1023/a:1027376230898>
- Justus, D., Dalügge, D., Bothe, S., Fuhrmann, F., Hannes, C., Kaneko, H., Friedrichs, D., Sosulina, L., Schwarz, I., Elliott, D. A., Schoch, S., Bradke, F., Schwarz, M. K., & Remy, S. (2017). Glutamatergic synaptic integration of locomotion speed via septoentorhinal projections. *Nature Neuroscience*, 20(1), 16–19. <https://doi.org/10.1038/nn.4447>
- Kim, J.-A., Yamada, M. K., Nishiyama, N., Matsuki, N., & Ikegaya, Y. (2003). Mossy Fiber Pathfinding in Multilayer Organotypic Cultures of Rat Hippocampal Slices. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(1), 115–119. <https://doi.org/10.1023/A:1022501302972>
- Kiss, J., Patel, A. J., Baimbridge, K. G., & Freund, T. F. (1990). Topographical localization of neurons containing parvalbumin and choline acetyltransferase in the medial septum-diagonal band region of the rat. *Neuroscience*, 36(1), 61–72. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90351-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90351-4)
- Kiss, J., Patel, A. J., & Freund, T. F. (1990). Distribution of septohippocampal neurons containing parvalbumin or choline acetyltransferase in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 298(3), 362–372. <https://doi.org/10.1002/cne.902980308>
- Kitchigina, V., Popova, I., Sinelnikova, V., Malkov, A., Astasheva, E., Shubina, L., & Aliev, R. (2013). Disturbances of septohippocampal theta oscillations in the epileptic brain: Reasons and consequences. *Experimental Neurology*, 247, 314–327. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.029>

- Köppen, J. R., Winter, S. S., Stuebing, S. L., Cheatwood, J. L., & Wallace, D. G. (2013). Infusion of GAT1-saporin into the medial septum/vertical limb of the diagonal band disrupts self-movement cue processing and spares mnemonic function. *Brain Structure & Function*, *218*(5), 1099–1114. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0449-7>
- Koyama, R., & Ikegaya, Y. (2004). Mossy fiber sprouting as a potential therapeutic target for epilepsy. *Current Neurovascular Research*, *1*(1), 3–10. <https://doi.org/10.2174/1567202043480242>
- Laitinen, T., Sierra, A., Pitkänen, A., & Gröhn, O. (2010). Diffusion tensor MRI of axonal plasticity in the rat hippocampus. *NeuroImage*, *51*(2), 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.02.077>
- Laurberg, S., & Zimmer, J. (1981). Lesion-induced sprouting of hippocampal mossy fiber collaterals to the fascia dentata in developing and adult rats. *The Journal of Comparative Neurology*, *200*(3), 433–459. <https://doi.org/10.1002/cne.902000310>
- Leão, R. N., Targino, Z. H., Colom, L. V., & Fisahn, A. (2015). Interconnection and synchronization of neuronal populations in the mouse medial septum/diagonal band of Broca. *Journal of Neurophysiology*, *113*(3), 971–980. <https://doi.org/10.1152/jn.00367.2014>
- Lee, M. G., Chrobak, J. J., Sik, A., Wiley, R. G., & Buzsáki, G. (1994). Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience*, *62*(4), 1033–1047. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90341-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90341-7)
- Lévesque, M., & Avoli, M. (2018). Carbachol-Induced theta-like oscillations in the rodent brain limbic system: Underlying mechanisms and significance. *Neuroscience and*

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.10.018>

Lévesque, M., Avoli, M., & Bernard, C. (2016). Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *Journal of Neuroscience Methods*, 260, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.03.009>

Li, J.-Y., Kuo, T. B. J., Hsieh, I.-T., & Yang, C. C. H. (2012). Changes in hippocampal theta rhythm and their correlations with speed during different phases of voluntary wheel running in rats. *Neuroscience*, 213, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.020>

López-Morales, M. A., Escobar, I., Saul, I., Jackson, C. W., Ferrier, F. J., Fagerli, E. A., Raval, A. P., Dave, K. R., & Perez-Pinzon, M. A. (2023). Resveratrol Preconditioning Mitigates Ischemia-Induced Septal Cholinergic Cell Loss and Memory Impairments. *Stroke*, 54(4), 1099–1109. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.040899>

Löscher, W. (2005). How to Explain Multidrug Resistance in Epilepsy? *Epilepsy Currents*, 5(3), 107–112. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2005.05311.x>

Löscher, W., & Schmidt, D. (2011). Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia*, 52(4), 657–678. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03024.x>

Luna-Munguia, H., Marquez-Bravo, L., & Concha, L. (2021). Longitudinal changes in gray and white matter microstructure during epileptogenesis in pilocarpine-induced epileptic rats. *Seizure*, 90, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.02.011>

Luna-Munguia, H., Orozco-Suarez, S., & Rocha, L. (2011). Effects of high frequency electrical stimulation and R-verapamil on seizure susceptibility and glutamate and

- GABA release in a model of phenytoin-resistant seizures. *Neuropharmacology*, 61(4), 807–814. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.05.027>
- Luna-Munguia, H., Zestos, A. G., Gliske, S. V., Kennedy, R. T., & Stacey, W. C. (2019). Chemical biomarkers of epileptogenesis and ictogenesis in experimental epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 121, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.10.005>
- Manford, M., Hart, Y. M., Sander, J. W., & Shorvon, S. D. (1992). National General Practice Study of Epilepsy (NGPSE): Partial seizure patterns in a general population. *Neurology*, 42(10), 1911–1917. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.10.1911>
- Mathern, G. W., Babb, T. L., Vickrey, B. G., Melendez, M., & Pretorius, J. K. (1995). The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain: A Journal of Neurology*, 118 (Pt 1), 105–118. <https://doi.org/10.1093/brain/118.1.105>
- McDonald, C. R., Hagler, D. J., Girard, H. M., Pung, C., Ahmadi, M. E., Holland, D., Patel, R. H., Barba, D., Tecoma, E. S., Iragui, V. J., Halgren, E., & Dale, A. M. (2010). Changes in fiber tract integrity and visual fields after anterior temporal lobectomy. *Neurology*, 75(18), 1631–1638. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181fb44db>
- Miller, J. W., Turner, G. M., & Gray, B. C. (1994). Anticonvulsant effects of the experimental induction of hippocampal theta activity. *Epilepsy Research*, 18(3), 195–204. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(94\)90040-x](https://doi.org/10.1016/0920-1211(94)90040-x)
- Mohapel, P., Armitage, L. L., Hannesson, D. K., & Corcoran, M. E. (1997). The effects of fimbria/fornix transections on perforant path kindling and mossy fiber sprouting. *Brain Research*, 778(1), 186–193. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)01079-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)01079-2)
- Pang, K. C. H., Jiao, X., Sinha, S., Beck, K. D., & Servatius, R. J. (2011). Damage of GABAergic neurons in the medial septum impairs spatial working memory and

extinction of active avoidance: Effects on proactive interference. *Hippocampus*, 21(8), 835–846. <https://doi.org/10.1002/hipo.20799>

Parekh, M. B., Carney, P. R., Sepulveda, H., Norman, W., King, M., & Mareci, T. H. (2010). Early MR Diffusion and Relaxation Changes in the Parahippocampal Gyrus Precede the Onset of Spontaneous Seizures in an Animal Model of Chronic Limbic Epilepsy. *Experimental neurology*, 224(1), 258–270. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.03.031>

Proper, E. A., Oestreicher, A. B., Jansen, G. H., Veelen, C. W., van Rijen, P. C., Gispen, W. H., & de Graan, P. N. (2000). Immunohistochemical characterization of mossy fibre sprouting in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain: A Journal of Neurology*, 123 (Pt 1), 19–30. <https://doi.org/10.1093/brain/123.1.19>

Robinson, J., Manseau, F., Ducharme, G., Amilhon, B., Vigneault, E., El Mestikawy, S., & Williams, S. (2016). Optogenetic Activation of Septal Glutamatergic Neurons Drive Hippocampal Theta Rhythms. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(10), 3016–3023. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2141-15.2016>

Roland, J. J., Janke, K. L., Servatius, R. J., & Pang, K. C. H. (2014). GABAergic neurons in the medial septum-diagonal band of Broca (MSDB) are important for acquisition of the classically conditioned eyeblink response. *Brain Structure & Function*, 219(4), 1231–1237. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0560-4>

Roland, J. J., Stewart, A. L., Janke, K. L., Gielow, M. R., Kostek, J. A., Savage, L. M., Servatius, R. J., & Pang, K. C. H. (2014). Medial septum-diagonal band of Broca (MSDB) GABAergic regulation of hippocampal acetylcholine efflux is dependent on

cognitive demands. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(2), 506–514.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2352-13.2014>

Rosal Lustosa, Í., Soares, J. I., Biagini, G., & Lukoyanov, N. V. (2019). Neuroplasticity in Cholinergic Projections from the Basal Forebrain to the Basolateral Nucleus of the Amygdala in the Kainic Acid Model of Temporal Lobe Epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5688. <https://doi.org/10.3390/ijms20225688>

Rye, D. B., Wainer, B. H., Mesulam, M. M., Mufson, E. J., & Saper, C. B. (1984). Cortical projections arising from the basal forebrain: A study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience*, 13(3), 627–643. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90083-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90083-6)

Salo, R. A., Miettinen, T., Laitinen, T., Gröhn, O., & Sierra, A. (2017). Diffusion tensor MRI shows progressive changes in the hippocampus and dentate gyrus after status epilepticus in rat—Histological validation with Fourier-based analysis. *NeuroImage*, 152, 221–236. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.03.003>

Scharfman, H. E. (2000). Epileptogenesis in the parahippocampal region. Parallels with the dentate gyrus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911, 305–327. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06734.x>

Scharfman, H. E. (2007). The Neurobiology of Epilepsy. *Current neurology and neuroscience reports*, 7(4), 348–354.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-

- source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmeiser, B., Zentner, J., Prinz, M., Brandt, A., & Freiman, T. M. (2017). Extent of mossy fiber sprouting in patients with mesiotemporal lobe epilepsy correlates with neuronal cell loss and granule cell dispersion. *Epilepsy Research*, 129, 51–58.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.11.011>
- Silveira, D. C., Cha, B. H., & Holmes, G. L. (2002). Effects of lesions of basal forebrain cholinergic neurons in newborn rats on susceptibility to seizures. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 139(2), 277–283. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(02\)00586-2](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(02)00586-2)
- Simon, A. P., Poindessous-Jazat, F., Dutar, P., Epelbaum, J., & Bassant, M.-H. (2006). Firing properties of anatomically identified neurons in the medial septum of anesthetized and unanesthetized restrained rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(35), 9038–9046.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1401-06.2006>
- Sitovskaya, D. A., Zabrodskaya, Y. M., Sokolova, T. V., Kuralbaev, A. K., Nezdorovina, V. G., & Dobrogorskaya, L. N. (2020). [Structural heterogeneity of epileptic foci in local drug-resistant epilepsy]. *Arkhiv Patologii*, 82(6), 5–15.
<https://doi.org/10.17116/patol2020820615>
- Sloviter, R. S. (1987). Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4784), 73–76. <https://doi.org/10.1126/science.2879352>
- Sloviter, R. S. (1991). Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: The “dormant basket cell”

hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, 1(1), 41–66. <https://doi.org/10.1002/hipo.450010106>

Sloviter, R. S., Zappone, C. A., Harvey, B. D., & Frotscher, M. (2006). Kainic acid-induced recurrent mossy fiber innervation of dentate gyrus inhibitory interneurons: Possible anatomical substrate of granule cell hyper-inhibition in chronically epileptic rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 494(6), 944–960. <https://doi.org/10.1002/cne.20850>

Soares, J. I., Da Costa, C., Ferreira, M. H., Andrade, P. A., Maia, G. H., & Lukoyanov, N. V. (2019). Partial depletion of septohippocampal cholinergic cells reduces seizure susceptibility, but does not mitigate hippocampal neurodegeneration in the kainate model of epilepsy. *Brain Research*, 1717, 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.04.027>

Sotty, F., Danik, M., Manseau, F., Laplante, F., Quirion, R., & Williams, S. (2003). Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: Novel implications for hippocampal rhythmicity. *The Journal of Physiology*, 551(Pt 3), 927–943. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046847>

Sultana, B., Panzini, M.-A., Veilleux Carpentier, A., Comtois, J., Rioux, B., Gore, G., Bauer, P. R., Kwon, C.-S., Jetté, N., Josephson, C. B., & Keezer, M. R. (2021). Incidence and Prevalence of Drug-Resistant Epilepsy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Neurology*, 96(17), 805–817. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000011839>

Sun, Y., Nguyen, A. Q., Nguyen, J. P., Le, L., Saur, D., Choi, J., Callaway, E. M., & Xu, X. (2014). Cell-type-specific circuit connectivity of hippocampal CA1 revealed

through Cre-dependent rabies tracing. *Cell Reports*, 7(1), 269–280.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.030>

Swanson, L. W., & Cowan, W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 172(1), 49–84. <https://doi.org/10.1002/cne.901720104>

Swanson, L. W., & Cowan, W. M. (1979). The connections of the septal region in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 186(4), 621–655.
<https://doi.org/10.1002/cne.901860408>

Sztriha, L., Gururaj, A. K., Bener, A., & Nork, M. (2002). Temporal lobe epilepsy in children: Etiology in a cohort with new-onset seizures. *Epilepsia*, 43(1), 75–80.
<https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.24201.x>

Takács, V. T., Freund, T. F., & Gulyás, A. I. (2008). Types and synaptic connections of hippocampal inhibitory neurons reciprocally connected with the medial septum. *The European Journal of Neuroscience*, 28(1), 148–164.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06319.x>

Takeuchi, Y., Nagy, A. J., Barcsai, L., Li, Q., Ohsawa, M., Mizuseki, K., & Berényi, A. (2021). The Medial Septum as a Potential Target for Treating Brain Disorders Associated With Oscillopathies. *Frontiers in Neural Circuits*, 15, 701080.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2021.701080>

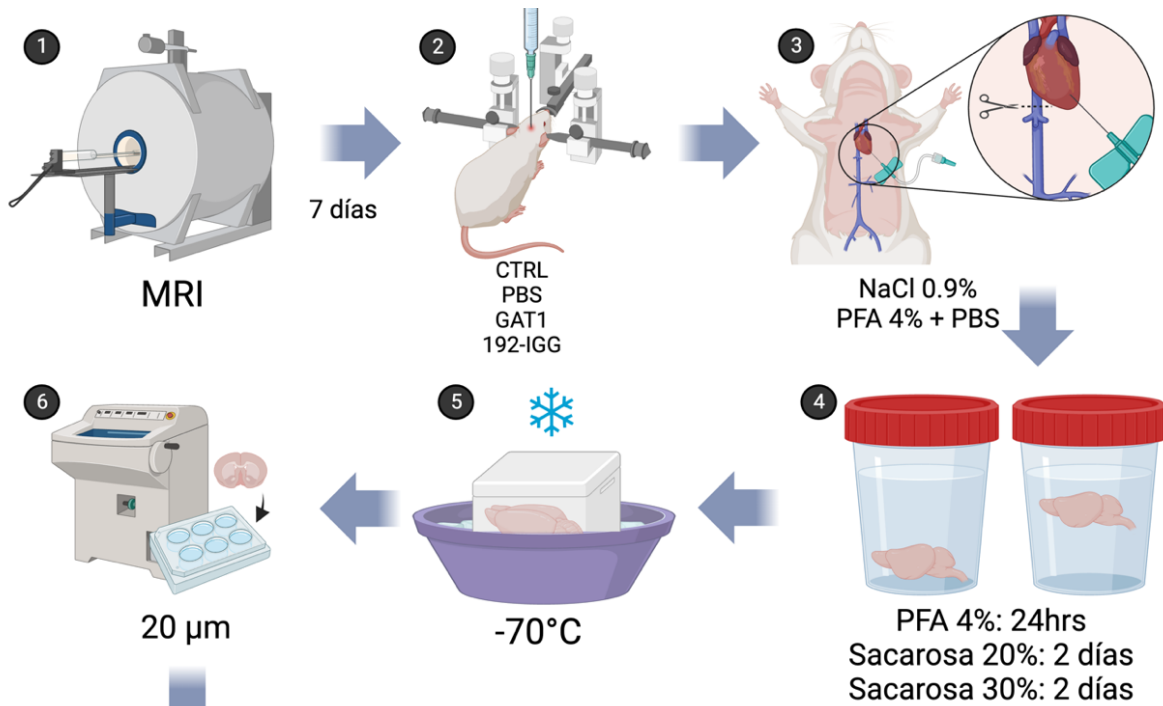
Téllez-Zenteno, J. F., & Hernández-Ronquillo, L. (2012). A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research and Treatment*, 2012, 630853.
<https://doi.org/10.1155/2012/630853>

- Thom, M. (2014). Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(5), 520–543. <https://doi.org/10.1111/nan.12150>
- Thomas, P. M., Phillips, J. P., Delanty, N., & O'Connor, W. T. (2003). Elevated extracellular levels of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid within the intraoperative, spontaneously epileptiform human hippocampus. *Epilepsy Research*, 54(1), 73–79. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(03\)00035-4](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(03)00035-4)
- Thomas, P. M., Phillips, J. P., & O'Connor, W. T. (2004). Hippocampal microdialysis during spontaneous intraoperative epileptiform activity. *Acta Neurochirurgica*, 146(2), 143–151. <https://doi.org/10.1007/s00701-003-0189-9>
- Tóth, K., Borhegyi, Z., & Freund, T. F. (1993). Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(9), 3712–3724. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-09-03712.1993>
- Tóth, K., Freund, T. F., & Miles, R. (1997). Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum. *The Journal of Physiology*, 500(Pt 2), 463–474.
- Tulio-Medina, M., Franz Chaves-Sell, Nelson Chinchilla-Calix, & Fernando Gracia. (2001). *Las Epilepsias en Centroamerica* (1a ed.). Impreso en Tegucigalpa, Honduras.
- Tzilivaki, A., Tukker, J. J., Maier, N., Poirazi, P., Sammons, R. P., & Schmitz, D. (2023). Hippocampal GABAergic interneurons and memory. *Neuron*, 111(20), 3154–3175. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.06.016>
- Unal, G., Joshi, A., Viney, T. J., Kis, V., & Somogyi, P. (2015). Synaptic Targets of Medial Septal Projections in the Hippocampus and Extrahippocampal Cortices of the

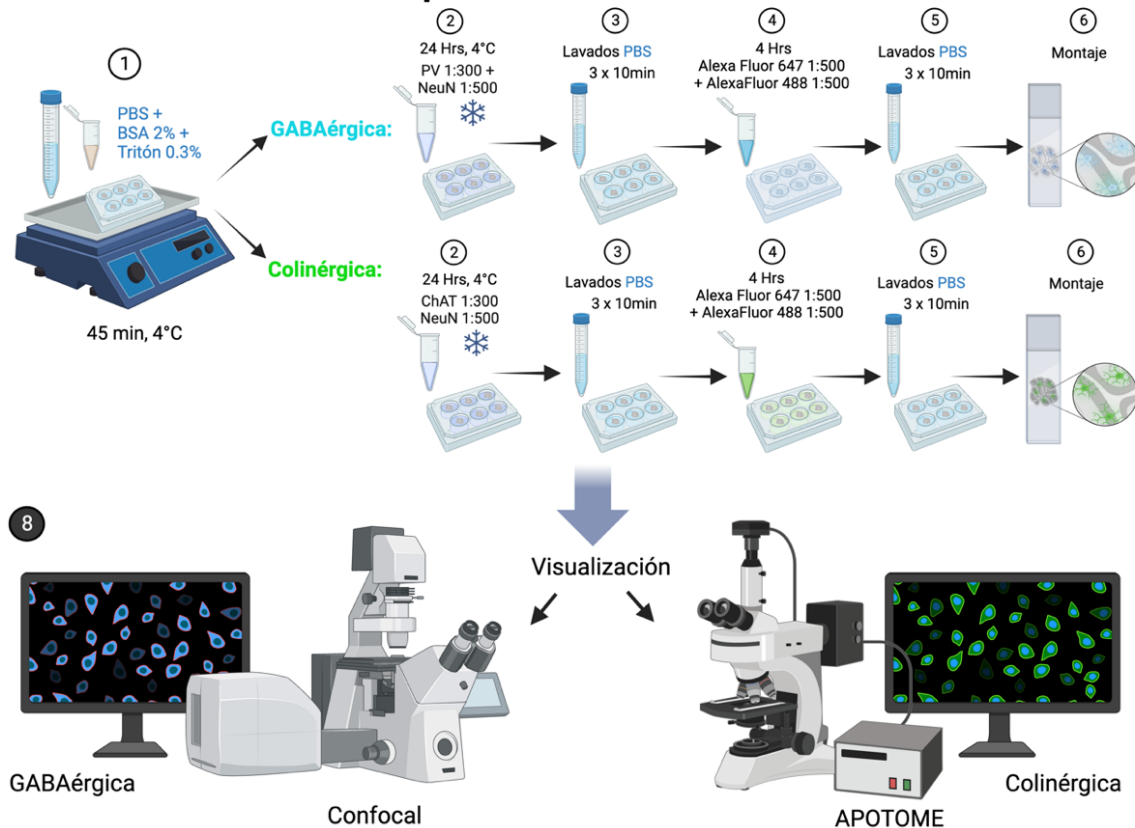
- Mouse. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(48), 15812–15826. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2639-15.2015>
- van Eijsden, P., Otte, W. M., van der Hel, W. S., van Nieuwenhuizen, O., Dijkhuizen, R. M., de Graaf, R. A., & Braun, K. P. J. (2011). In vivo diffusion tensor imaging and ex vivo histologic characterization of white matter pathology in a post-status epilepticus model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 52(4), 841–845. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.02991.x>
- Varga, V., Hangya, B., Kránitz, K., Ludányi, A., Zemankovics, R., Katona, I., Shigemoto, R., Freund, T. F., & Borhegyi, Z. (2008). The presence of pacemaker HCN channels identifies theta rhythmic GABAergic neurons in the medial septum. *The Journal of Physiology*, 586(Pt 16), 3893–3915. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.155242>
- Velasquez, F., Dickson, C., Kloc, M. L., Schneur, C. A., Barry, J. M., & Holmes, G. L. (2023). Optogenetic modulation of hippocampal oscillations ameliorates spatial cognition and hippocampal dysrhythmia following early-life seizures. *Neurobiology of Disease*, 178, 106021. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106021>
- Walker, M. C. (2015). Hippocampal Sclerosis: Causes and Prevention. *Seminars in Neurology*, 35(3), 193–200. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1552618>
- Wang, H., Huang, Y., Coman, D., Munbodh, R., Dhaher, R., Zaveri, H. P., Hyder, F., & Eid, T. (2017). Network evolution in mesial temporal lobe epilepsy revealed by diffusion tensor imaging. *Epilepsia*, 58(5), 824–834. <https://doi.org/10.1111/epi.13731>

- Wang, Y., Wang, Y., Xu, C., Wang, S., Tan, N., Chen, C., Chen, L., Wu, X., Fei, F., Cheng, H., Lin, W., Qi, Y., Chen, B., Liang, J., Zhao, J., Xu, Z., Guo, Y., Zhang, S., Li, X., ... Chen, Z. (2020). Direct Septum-Hippocampus Cholinergic Circuit Attenuates Seizure Through Driving Somatostatin Inhibition. *Biological Psychiatry*, *87*(9), 843–856. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.11.014>
- Wiley, R. G., Oeltmann, T. N., & Lappi, D. A. (1991). Immunolesioning: Selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor. *Brain Research*, *562*(1), 149–153. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91199-b](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91199-b)
- Zafar, S., & Jabeen, I. (2018). Structure, Function, and Modulation of γ -Aminobutyric Acid Transporter 1 (GAT1) in Neurological Disorders: A Pharmacoinformatic Prospective. *Frontiers in Chemistry*, *6*, 397. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00397>
- Zhang, H., Lin, S.-C., & Nicolelis, M. A. L. (2010). Spatiotemporal coupling between hippocampal acetylcholine release and theta oscillations in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(40), 13431–13440. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1144-10.2010>
- Zhao, S., Liu, F., Shi, W., Wang, J., Zhou, Z., & Zhang, X. (2022). DL-3-n-butylphthalide promotes hippocampal neurogenesis and reduces mossy fiber sprouting in chronic temporal lobe epilepsy rats. *BMC Neurology*, *22*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12883-021-02516-x>
- Zimmer, J. (1973). Changes in the Timm sulfide silver staining pattern of the rat hippocampus and fascia dentata following early postnatal deafferentation. *Brain Research*, *64*, 313–326. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90186-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90186-8)

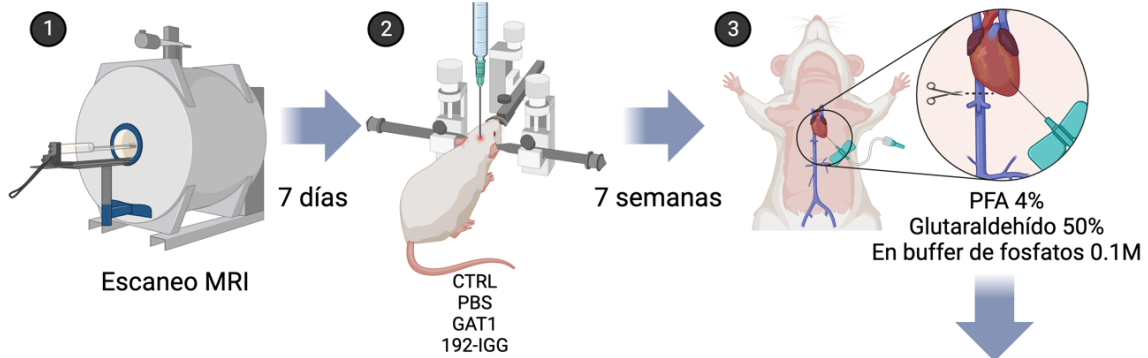
APÉNDICES



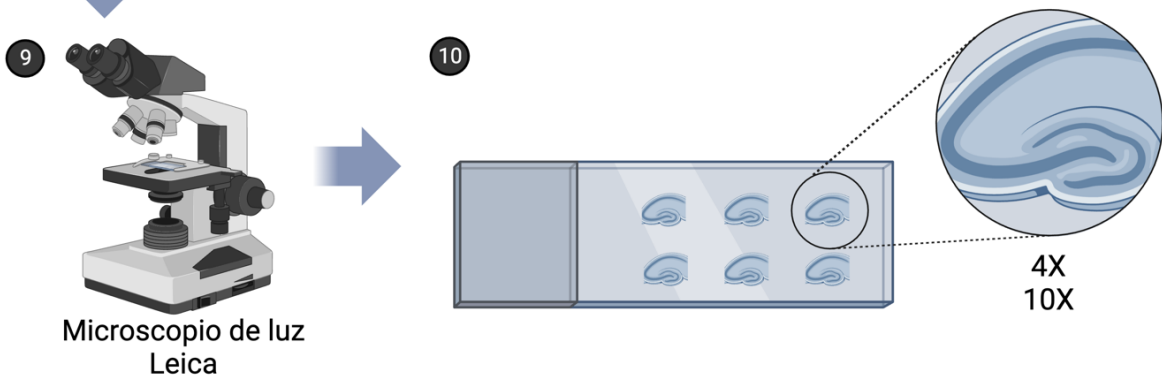
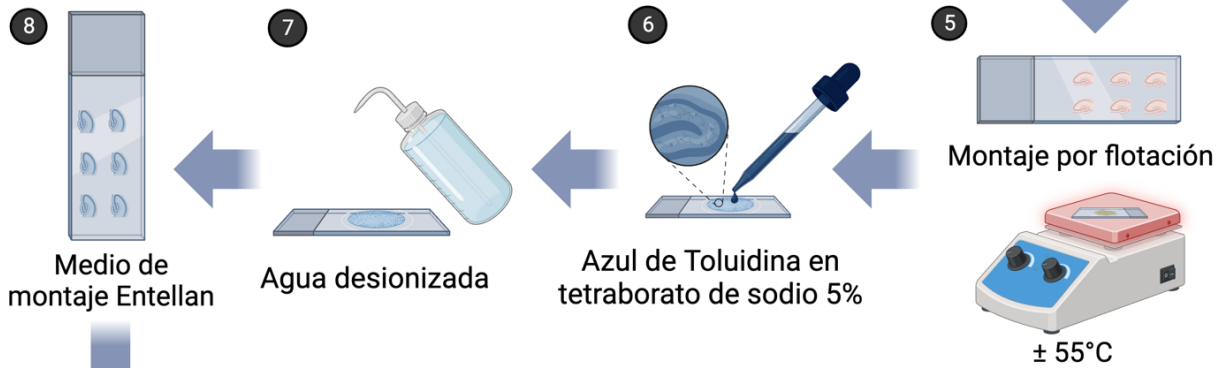
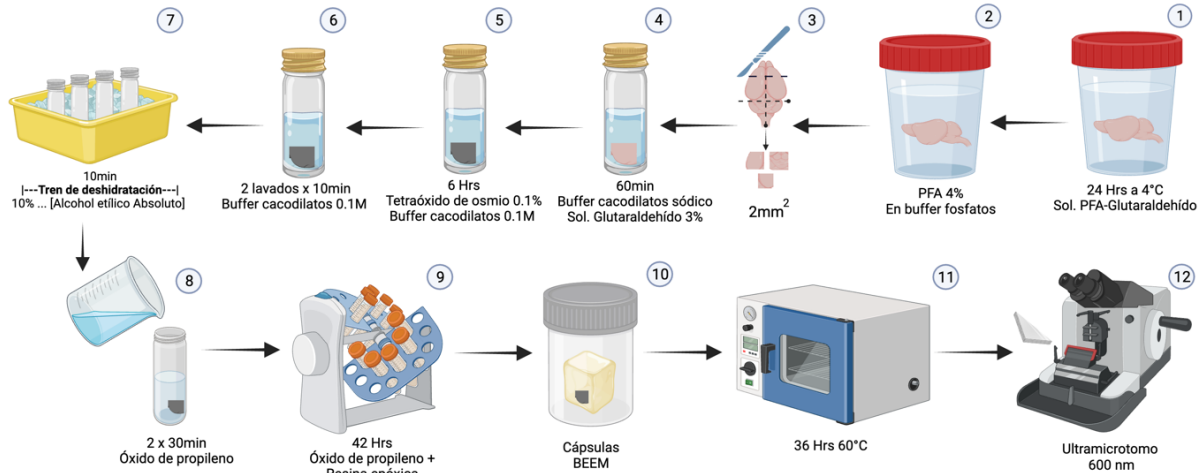
7 Protocolo inmunohistoquímica:



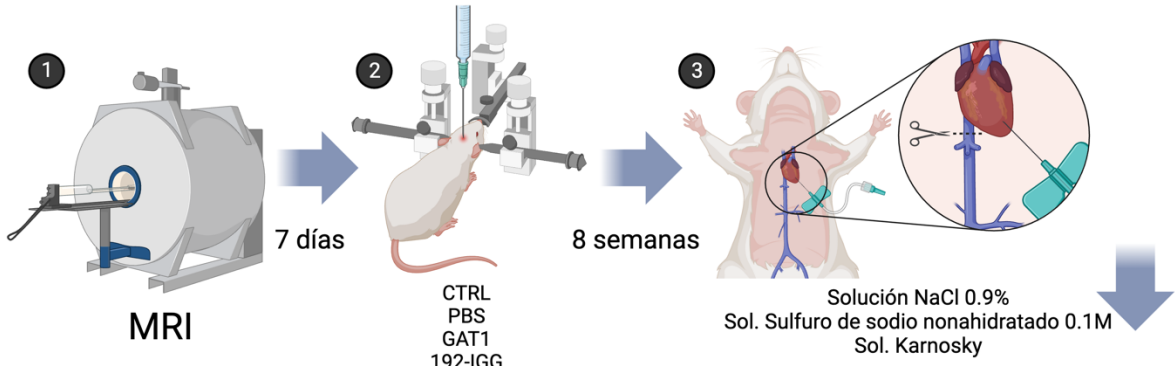
Apéndice 1. Diagrama de flujo del protocolo de inmunohistoquímica. Esta es la representación visual de los pasos que se describen detalladamente en el texto. Después de hacer una resonancia estructural T1 de las ratas Sprague Dawley (1), se lleva a cabo la cirugía estereotáxica que divide la n total en los 4 grupos experimentales: control, PBS, saporina GAT1 y saporina 192-IgG (2). Posteriormente, se hace la perfusión intracardiaca utilizando cloruro de sodio al 0.9%, posteriormente PFA 4% junto con PBS o solución salina (3) y se extraen los cerebros e incluyen en sacarosa al 20% y 30% respectivamente hasta que el tejido precipite (4). El tejido se debe mantener envuelto en aluminio a -70°C para su almacenamiento (5). Después se harán cortes coronales de 20 micras de la región del septum medial utilizando el criostato y su mantenimiento en pocillos llenos de PBS (6) y dará inicio el protocolo de inmunohistoquímica (6). En este, la inclusión de rebanadas se hace en una mezcla de PBS junto con BSA al 2% y Tritón X-100 al 0.3%, división de técnica para cada población neuronal, en agitación (7.1), se incuban los anticuerpos primarios durante 24hrs a 4°C en agitación (7.2). Al día siguiente se lavan los tejidos 3 veces durante 10 min cada uno (7.3) e incuban los Alexas (anticuerpos secundarios) durante 4hrs a 4°C en agitación (7.4) y se vuelven a lavar los tejidos 3 veces durante 10 min cada uno (7.5). Para el montaje del tejido se utiliza Mowiol y se coloca el cubreobjetos (7.6). La visualización de las muestras se hace mediante el microscopio de fluorescencia APOTOME para las poblaciones colinérgicas y el microscopio confocal para las poblaciones GABAérgicas (8).



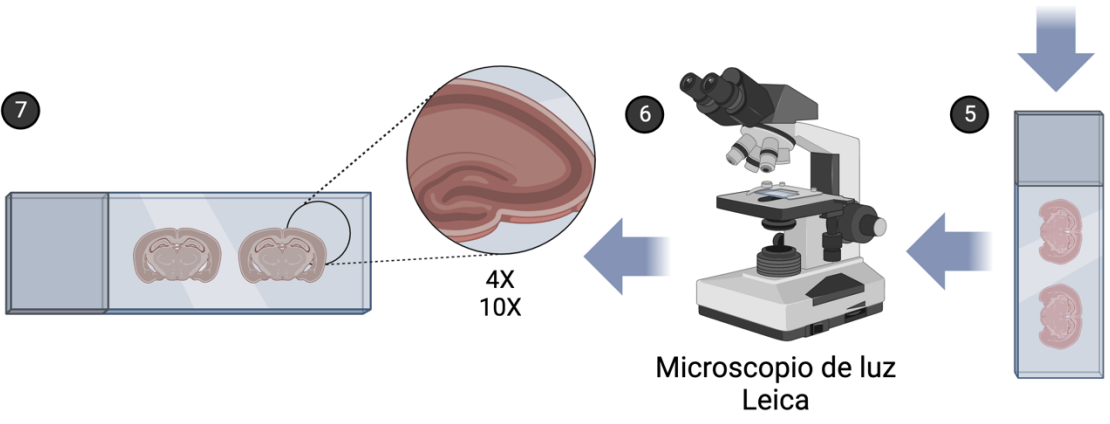
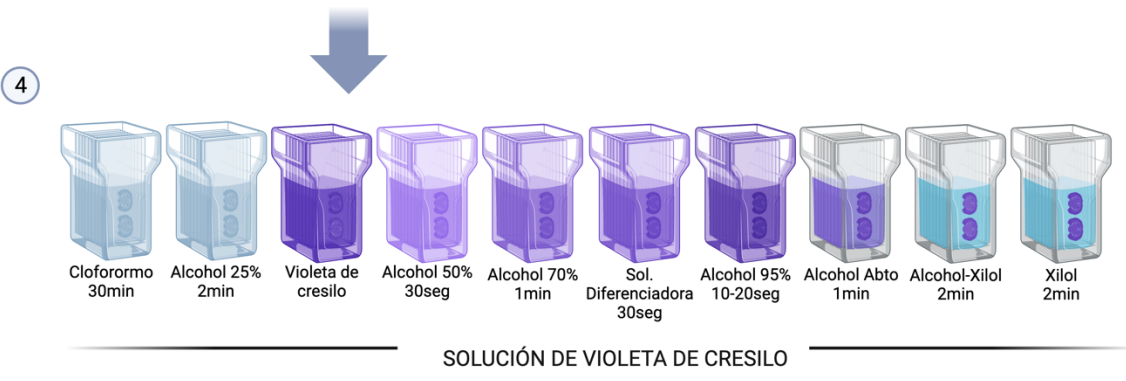
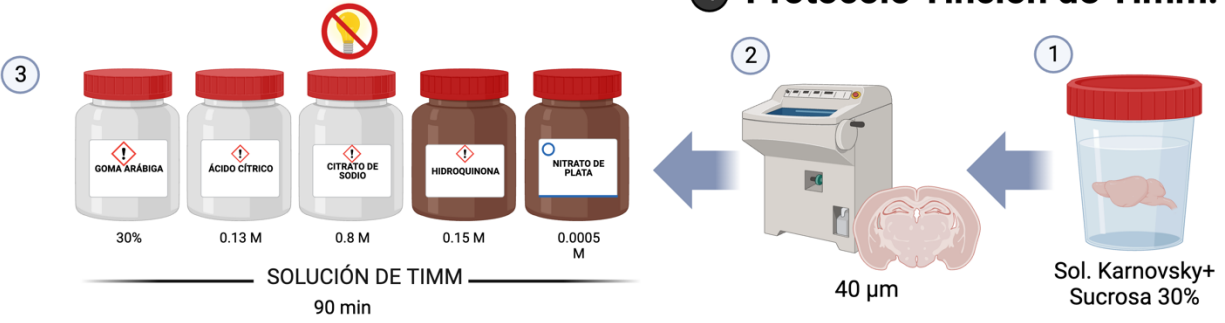
4 Protocolo Azul de Toluidina:



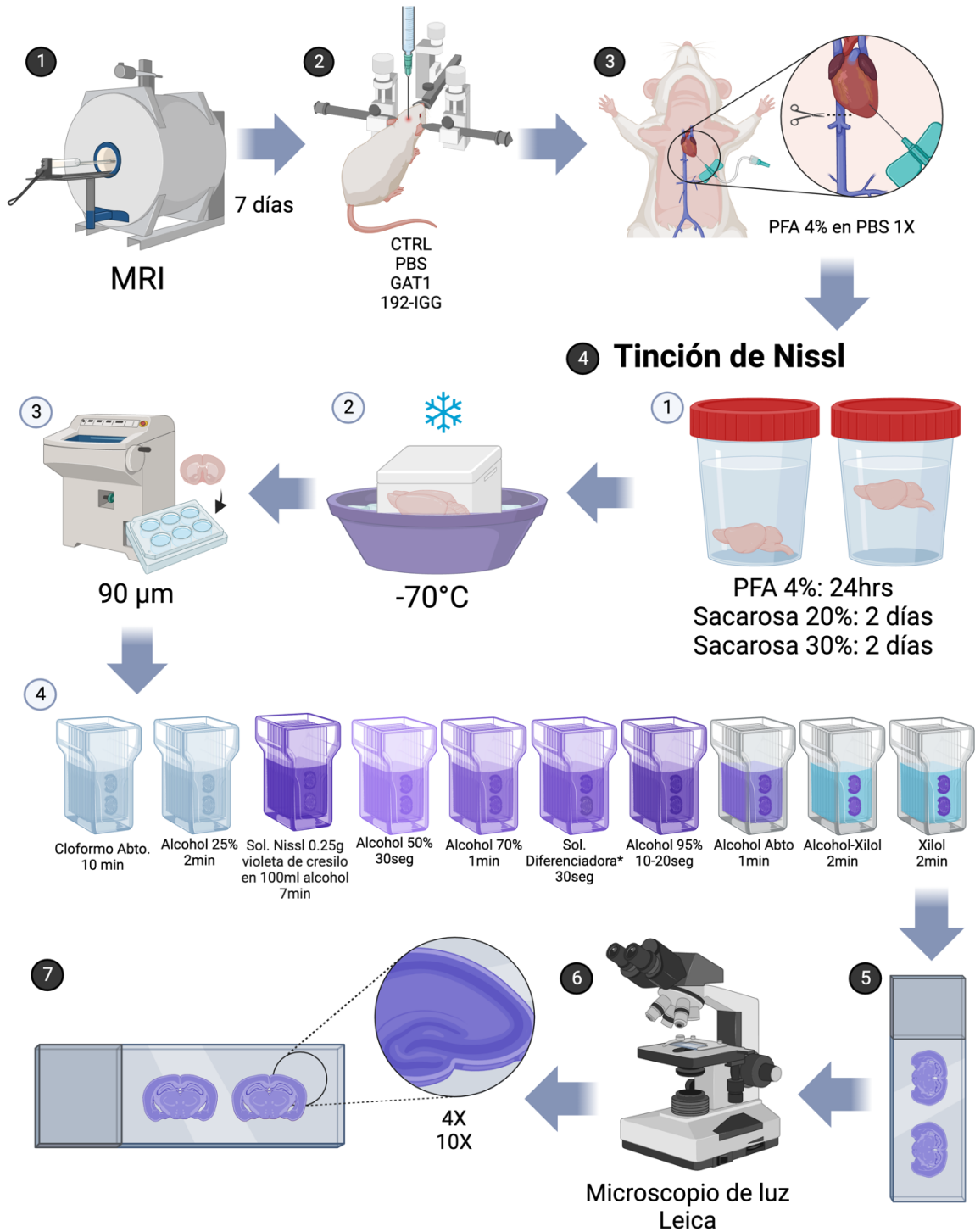
Apéndice 2. Diagrama de flujo del protocolo Azul de toluidina. Las ratas fueron sometidas a una resonancia magnética estructural T1 (1). Después se realizaron cirugías estereotáxicas que dividió la n total en los 4 grupos experimentales: control, PBS, saporina GAT1 y saporina 192-IgG (2). Posteriormente se realizó una perfusión intracardiaca con PFA al 4% y glutaraldehído al 50% en buffer de fosfatos 0.1 M (3). Al inicio del protocolo de tinción se extrajeron los cerebros y se incluyeron en solución PFA-glutaraldehído durante 24hrs a 4°C (4.1). Al día siguiente se cambió la solución a PFA 4% fresco en buffer de fosfatos (4.2). Los tejidos fueron seccionados en cubos de aproximadamente 2mm² (4.3) y se incluyeron en solución de buffer de cacodilatos sódico y solución de glutaraldehído al 3% durante 1 hora (4.4). Después se cambió la solución a tetraóxido de osmio al 0.1% en buffer de cacodilatos (4.5) y se hicieron 2 lavados de 10min cada uno en buffer de cacodilatos (4.6). Para deshidratar tejidos se utilizó un tren de concentraciones de cambio de 10% cada una, hasta llegar a la concentración de alcohol etílico absoluto, todo sobre hielo frapeado (4.7) y los tejidos se incluyeron 2 veces en óxido de propileno durante 30min (4.8). Posteriormente se cambió la solución a mezcla óxido de propileno y resina epóxica y dejar durante 42hrs en el agitador (4.9). Las muestras deben ser embebidas en cápsulas BEEM con resina epóxica fresca (4.10) meterlas al horno a 60°C durante 36hrs (4.11). Se cortaron los bloques de resina para obtener rebanadas de 600nm (4.12), que fueron montadas por flotación sobre un portaobjetos (5) y secadas en una parilla a $\pm 55^{\circ}\text{C}$ (5) para después Tenirse con Azul de Toluidina en tetraborado de sodio al 5% (6) y lavadas con agua desionizada (7), para después montarlas con medio de entellan (8) y visualizarse en el microscopio de luz leica (9) con objetivos 4x y 10x para las regiones de interés (10).



4 **Protocolo Tinción de Timm:**



Apéndice 3. Diagrama de flujo del protocolo de tinción de Timm. Las ratas fueron sometidas a una resonancia magnética estructural T1 (1). Después se realizaron cirugías estereotáxicas que dividió la n total en los 4 grupos experimentales: control, PBS, saporina GAT1 y saporina 192-IgG (2). Posteriormente se realizó una perfusión intracardiaca con solución de NaCl al 0.9% seguida de solución de sulfuro de sodio nanohidratado a 0.1M y solución de Karnosky [(1% PFA, 1.25% glutaraldehído en buffer fosfatado] al 0.1 M (3). Para el inicio del protocolo de tinción de Timm [30% goma arábica, 0.13M de ácido cítrico (Golden Bell), 0.8M buffer de citrato de sodio, 0.15M de hidroquinona, 0.0005M de nitrato de plata (4)], se extraen los cerebros e incluyen en solución de Karnovsky con sucrosa al 30% para su crioprotección (4.1), posteriormente se realizan cortes de 40micras en el criostato (4.2) y se montaron en portaobjetos precargados sumergidos en la solución de Timm (4.3) durante 90 min en un cuarto oscuro a temperatura ambiente. Finalmente los tejidos se contratiñen utilizando solución de violeta de cresilo al 0.1% (5.4). Para su visualización (5), se utiliza un microscopio de luz (6) conectado a software AM Scope (7). Este protocolo está basado en el de Cintra et. Al de 1997.



Apéndice 4. Diagrama de flujo del protocolo de tinción de Nissl. Las ratas fueron sometidas a una resonancia magnética estructural T1 (1). Después se realizaron cirugías estereotáxicas que dividió la n total en los 4 grupos experimentales: control, PBS, saporina GAT1 y saporina 192-IgG (2). Los cerebros fueron aislados y post-fijados 24hrs (3). Para dar inicio al protocolo de Nissl (4), los cerebros fueron crio-protejidos gradualmente por sacarosa al 20%, 30% en PBS 1X (4.1 y 4.2). Los cerebros fueron seccionados en un criostato Leica (CM2050) a 90 micras de grosor (4.3). Las secciones cerebrales se sumergieron en cloroformo absoluto por 10min, alcohol al 25% durante 2min, y en una solución de Nissl 0.25g de violeta de cresilo en 100ml de alcohol al 25% por 7min, lavados con alcohol etílico 50% por 30seg, alcohol etílico al 70% por 1min. Posteriormente fueron sumergidos en una solución diferenciadora (300ml de alcohol etílico al 70% con 10 gotas de ácido acético) por 30seg (asterisco), inmediatamente sumergidos en alcohol al 90% entre 10-20seg y alcohol absoluto por 1min. Una vez deshidratados se aclararon en xileno-alcohol por 1min, xileno absoluto 2min (4.4) . Finalmente los cortes se cubrieron con entellan (5). Las imágenes se tomaron a través de una cámara conectada al microscopio de luz AmScope MU1803 (6) a través de los objetivos 4X y 10X (7).