



TESINA DE GRADO

**“Estudio de la respuesta de los astrocitos al
Status Epilepticus en un modelo *in vitro*”**

Tesinista: Silva, Gabriela Vanina

Directora: Cragolini, Andrea Beatriz

Centro de Biología Celular y Molecular, (CEBICEM),
IIByT-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales,
Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Febrero de 2020

**“Estudio de la respuesta de los
astrocitos al *Status Epilepticus* en un
modelo *in vitro*”**

Tribunal examinador

Dra. Vivas, Laura

Firma.....

Dra. Figueras López, Maria Julia

Firma.....

Dra. Rivarola, Maria Angelica

Firma.....

Calificación.....

Fecha.....

AGRADECIMIENTOS

A mamá y papá, Isabel y Federico, gracias por darme la oportunidad de una educación superior y por soportarme económicamente todos estos años.

A mis hermanas, Nadia, María Eugenia y Melani, gracias por el apoyo.

A Cleo, gracias por la compañía incondicional en las largas jornadas de estudio.

A mi directora, Dra. Andrea Cragolini, por los conocimientos impartidos y la paciencia durante la realización de la tesina.

A todo el personal del CEBICEM, por su ayuda y buena predisposición durante el desarrollo de esta tesina.

A la FCEFYN- UNC, universidad pública y gratuita, porque de lo contrario no hubiera sido posible la continuación de mis estudios.

INDICE.

Abreviaturas	5
Resumen	6
Introducción	7
Astrocitos	7
Neurotrofinas y sus receptores.....	7
Neurotrofinas en astrocitos	8
Astrogliosis	10
<i>Status epilepticus</i>	11
Astrogliosis, Status Ep Astrogliosis, <i>Status Epilepticus</i> y neuroprotección	14
Hipótesis	17
Objetivos	17
Materiales y métodos	
Cultivo celular.....	18
Modelo SE <i>in vitro</i>	18
Ensayo de supervivencia	19
Evaluación de la expresión de GFAP	19
Proliferación	20
Expresión de BDNF y TrkB.t.....	21
Análisis Estadístico	21
Resultados	22
Sobrevida/muerte	22
GFAP	23
Proliferación	24
BDNF y TrkB.....	26
Discusión	29
Referencias	33

ABREVIATURAS

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

BrdU: bromodesoxiuridina

CX: corteza

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: medio esencial mínimo

GABA: ácido γ -aminobutírico

GFAP: proteína acídica fibrilar glial

GTPasa: guanosina trifosfatasa

HIPO: hipocampo

Ki-67: factor de proliferación celular

NMDAr: receptor N-metil-D-aspartato

NT: neurotrofina

PBS: buffer fosfato salino

RIPA: buffer de radioinmunoprecipitación

SE: *status epilepticus*

SNC: sistema nervioso central

ST: cuerpo estriado

TBS.T: tris buffered saline with tween

Trk: receptor tirosin quinasa

WB: western blot

RESUMEN

Los astrocitos constituyen una población abundante y heterogénea de células gliales, que participan en una gran variedad de funciones complejas y esenciales. Cuando los astrocitos reaccionan ante una lesión o patología se producen cambios, entre los cuales se destacan el aumento en la expresión de la proteína GFAP, la proliferación y la liberación de numerosos mediadores entre los cuales se incluye a neurotrofina BDNF. La astrogliosis es una característica distintiva de la epilepsia y del *status epilepticus* (SE) y los cambios que ocurren en estas células pueden predisponer y/o facilitar la muerte neuronal. Si bien, esto sugiere que los astrocitos reactivos promueven la excitotoxicidad existen numerosas evidencias que demuestran que estas células tienen un rol neuroprotector luego del SE. El objetivo de este trabajo es evaluar los parámetros principales que caracterizan a la gliosis reactiva y la viabilidad celular luego de someter a astrocitos obtenidos de diferentes áreas cerebrales a un SE *in vitro*. Por ello se evaluó la supervivencia, expresión de GFAP, proliferación y expresión de BDNF de astrocitos en cultivo obtenidos de corteza cerebral (CX), cuerpo estriado (ST) e hipocampo (Hipo) luego de someterlos a SE.

Nuestros resultados demuestran que la sobrevivencia de los astrocitos se ve afectada de igual manera en todas las áreas, mientras que la expresión de GFAP se vio incrementada en CX y ST, pero no en HIPO. En cuanto a la proliferación, se observó que la tasa de proliferación varía entre astrocitos de diferentes áreas del cerebro pero no cambia luego del SE y tampoco se altera la expresión de BDNF y su receptor TrkB.t

En suma, nuestros resultados junto con estudios previos de nuestro laboratorio indican que el SE *in vitro* inducido con el buffer libre de Mg²⁺ tiene un impacto moderado sobre los astrocitos, y que la activación de estas células dependería de la presencia de neuronas hiperactivadas.

PALABRAS CLAVE: Sistema nervioso central, astrocitos, *status epilepticus*, neuroprotección, astrogliosis, neurotrofinas

INTRODUCCION

Astroцитos

Los astroцитos representan una poblaci3n abundante y heterog3nea de c3lulas gliales del sistema nervioso central (SNC). Participan en diversas funciones complejas y esenciales en el cerebro tales como: la regulaci3n de la concentraci3n de iones en el espacio extracelular, la homeostasis del glutamato, el suministro de precursores de neurotransmisores para su reutilizaci3n en las sinapsis excitatorias e inhibitorias, etc (Sofroniew & Vinters, 2010; Scuderi *et al.*, 2013). La amplia gama de funciones de los astroцитos se refleja en su compleja estructura morfol3gica (Haim & Rowitch, 2017; Schiweck *et al.*, 2018), contienen varias prolongaciones primarias y secundarias que se dividen en miles m3s finas que interact3an directamente con sinapsis, dendritas, axones, vasos sangu3neos y otras c3lulas gliales. La morfol3gia de los astroцитos var3a seg3n las diferentes regiones del cerebro, lo que puede indicar su capacidad para realizar sus funciones de manera diferencial en los circuitos neuronales (Chai *et al.*, 2017). Adem3s, se sabe que los astroцитos alteran su morfol3gia durante el desarrollo, durante condiciones fisiol3gicas y en m3ltiples estados patol3gicos (Sun & Jakobs, 2012; Naskar & Chattarji, 2019).

Neurotrofinas y sus receptores

Los astroцитos liberan una gran variedad de mediadores qu3micos entre los cuales se incluye a las neurotrofinas (Rubio, 1997; Fulmer *et al.*, 2014). Las neurotrofinas constituyen un grupo de factores tr3ficos que juegan un rol cr3tico en el control de las funciones normales del sistema nervioso as3 como tambi3n en el desarrollo de condiciones neurodegenerativas. Esta familia de prote3nas incluye al factor de crecimiento neural, al factor derivado de cerebro, neurotrofina 3, la neurotrofina-4/5 y a las pro-neurotrofinas que tambi3n tienen efectos biol3gicos. Cada neurotrofina interact3a con 2 clases de receptores, los miembros de la familia de receptores asociados a tirosina quinasa (Trks) y el p75NTR, el cual pertenece a la familia de receptores de TNF o receptores de muerte (Gibon & Barker, 2017). Las funciones que ejercen las neurotrofinas las

hace particularmente atractivas para intervenir sobre los procesos que subyacen a diferentes condiciones patológicas.

Los receptores Trks son críticos para la supervivencia y diferenciación de neuronas. Cada neurotrofina se une a uno o más receptores Trk con distintas afinidades: TrkA une a NGF, TrkB une a BDNF y NT-4/5 y con baja afinidad de unión a NT-3 y TrkC une a NT-3 (Figura 1). La unión de ligandos a los receptores Trk lleva a su dimerización y a la autofosforilación de residuos tirosinas. Para los receptores TrkB y C se han descrito isoformas truncadas (Trk.t) que carecen del dominio quinasa intracelular y surgen como resultado del empalme alternativo del ARN de los receptores Trk (Fenner, 2012) o del procesamiento enzimático del TrkB (TrkB-tc) (Danelon *et al.*, 2016; Vidaurre *et al.*, 2012; Jerónimo-Santos *et al.*, 2015). Entre las funciones que se asocian a TrkB.t se pueden mencionar:

- a) *dominancia negativa*, dado que la heterodimerización de las formas truncadas con las completas inhibe la trans-autofosforilación de Trks, se piensa que las formas truncadas servirían para reducir la señalización inducida por neurotrofinas (Deinhardt & Chao, 2014).

- b) *incrementos en la concentración de Ca^{2+} intracelular en astrocitos* (Rose *et al.*, 2003) y,

- c) *modificaciones en la morfología de filopodios en neuronas y astrocitos* (Ohira *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012).

Contrariamente a los receptores Trk, p75^{NTR} une a todas las formas maduras de neurotrofinas con afinidades similares (Meeker & Williams, 2014) y a las proneurotrofinas con afinidad superior a la de las formas maduras. Este receptor carece de actividad enzimática intrínseca y señala a través de la interacción con otros receptores de membrana como los Trk y sortilina o a través del reclutamiento y unión a proteínas intracelulares (Volosin *et al.*, 2008).

Neurotrofinas en astrocitos. Los astrocitos expresan los receptores de neurotrofinas durante el desarrollo, en algunas poblaciones restringidas en el cerebro adulto o luego de una lesión, por lo cual se convierten en un blanco potencial para las acciones de las neurotrofinas (Schachtrup *et al.*, 2015; Cragolini *et al.*, 2018). El receptor p75^{NTR} se expresa en astrocitos embrionarios de ratas, en algunas subpoblaciones del SNC e incrementa marcadamente en

astrocitos reactivos luego de diversos tipos de procesos neurodegenerativos (Cragolini *et al.*, 2009; Oderfeld-Nowak *et al.*, 2009; Cragolini *et al.*, 2018). El p75^{NTR} en astrocitos está asociado a la modulación de algunos aspectos de la astrocitosis, como la proliferación celular y la migración (Cragolini *et al.*, 2012; Cragolini *et al.*, 2018). Además, p75^{NTR} media la internalización de pro-BDNF para que sea procesado intracelularmente por los astrocitos y posteriormente se libere BDNF maduro (Bergami *et al.*, 2008). De esta forma, p75^{NTR} en astrocitos cumpliría un rol importante en la modulación del balance y disponibilidad de pro-BDNF y BDNF.

A diferencia de las neuronas que expresan las isoformas completa y truncada de TrkB, los astrocitos solo expresan TrkB.t (Rose *et al.*, 2003; Bergami *et al.*, 2008). El TrkB.T de astrocitos activa cascadas de señalización que involucran la liberación de Ca²⁺ intracelular (Rose *et al.*, 2003), óxido nítrico (Colombo *et al.*, 2012) y la regulación de la actividad de la GTPasa Rho (Ohira, 2005). Las funciones de TrkB.t en astrocitos incluyen la regulación de la maduración morfológica de los astrocitos, inducida por BDNF (Holt *et al.*, 2019), la migración (Cragolini *et al.*, 2018) y el mantenimiento de la sobrevivencia (Saba *et al.*, 2018), entre otras.

Varios trabajos han asociado la expresión y liberación de BDNF de astrocitos a los efectos neuroprotectores que ejercen estas células en distintos modelos de daño neuronal (Zamanian *et al.*, 2012; Grangeiro *et al.*, 2019; Ishihara *et al.*, 2019). De esta forma, la liberación de BDNF por parte de astrocitos, podría ser uno de los mecanismos por los cuales mediarían la neuroprotección que se observa en neuronas sometidas a *status epilepticus* y que describimos más adelante.

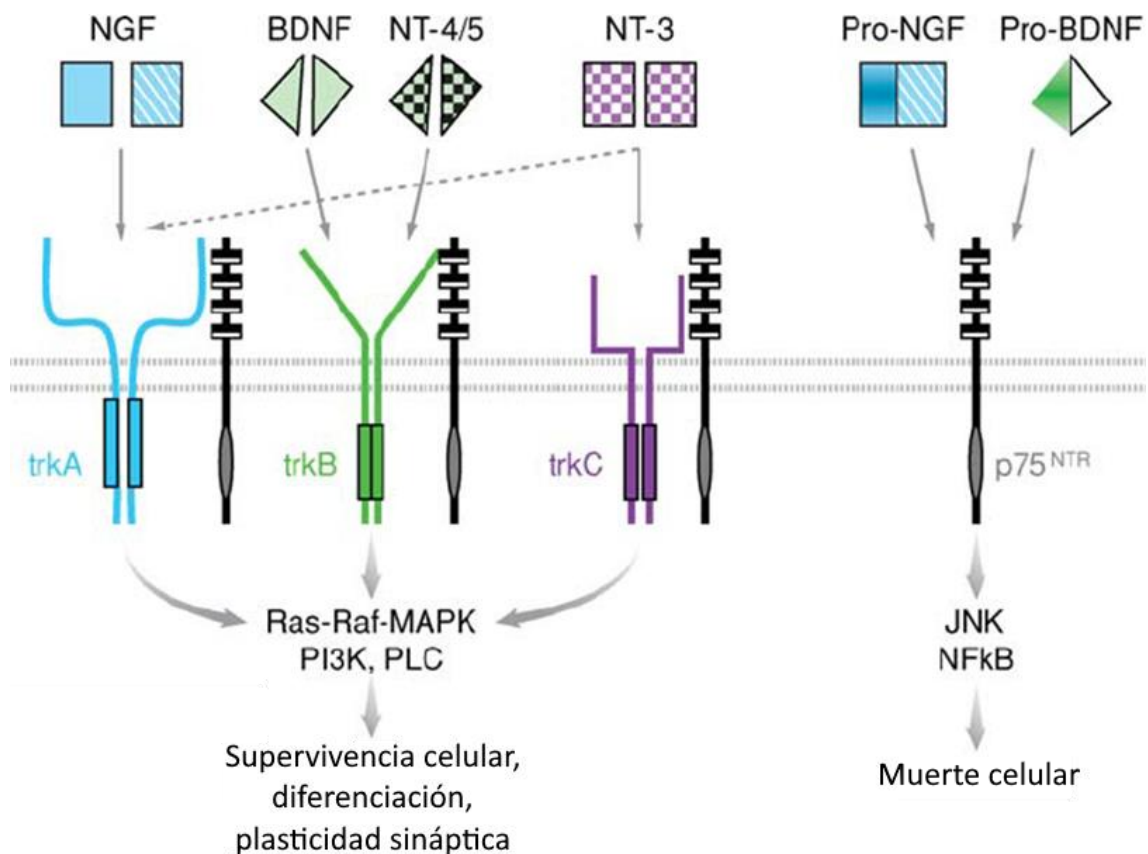


Figura 1. Neurotrofinas y sus receptores. Las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-4/5 y NT-3 se unen específicamente a alguno de los miembros de la familia de receptores Trk para formar homodímeros o heterodímeros Trk-p75^{NTR}. Además, todas las neurotrofinas maduras e inmaduras pueden unirse al receptor p75^{NTR}. El tipo de receptor al que se unen las neurotrofinas determina la activación de diferentes cascadas de señalización y respuestas biológicas. Tomado y modificado de: Pezet & McMahon (2006). *Neurotrophins: mediators and modulators of pain. Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 507-538.

Astrogliosis

Las lesiones, las enfermedades neurodegenerativas, el envejecimiento o un contexto ambiental empobrecido desencadenan una respuesta denominada astrogliosis reactiva (Diniz *et al.*, 2016). Este fenómeno se encuentra altamente regulado por factores liberados por neuronas, otras células gliales y los mismos astrocitos y se caracteriza por el aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la proliferación y la liberación de numerosos compuestos químicos (Pekny & Pekna, 2014). La astrogliosis tiene el potencial de alterar las

actividades de los astrocitos ya sea por una ganancia o pérdida de funciones y consecuentemente producir un impacto benéfico o perjudicial sobre las células neuronales y no neuronales de su entorno (Sofroniew, 2015). Debido a este rol dual que tendrían los astrocitos se ha discutido la conveniencia de mantener o prevenir la reactividad glial con el fin de promover la recuperación del tejido circundante a una lesión. La Figura 2, muestra diversos grados de astrogliosis en comparación con un tejido sano y se pueden observar los cambios en la morfología, cantidad de células y expresión de GFAP en astrocitos reactivos.

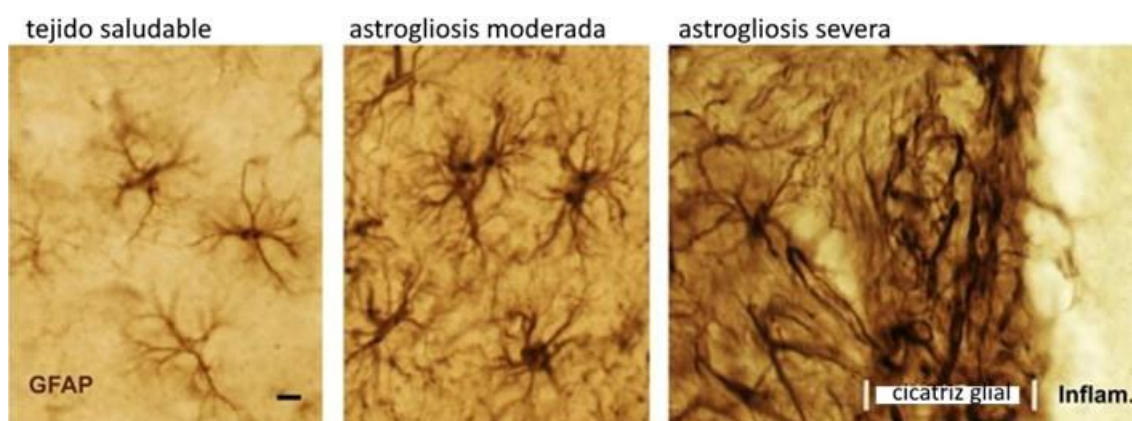


Figura 2. Fotomicrografías de astrocitos en tejido sano y diferentes grados de astrogliosis reactiva, marcados con anticuerpo contra GFAP. Marcación de GFAP por inmunohistoquímica de tejido de cerebro normal y con diferentes grados de astrogliosis. La astrogliosis moderada fue provocada por la inyección de un antígeno bacteriano, LPS (panel del centro). La astrogliosis severa (panel de la derecha) se observa en la región adyacente (cicatriz glial) a una lesión traumática e inflamación (inflam.) en la corteza cerebral. A medida que incrementa la severidad de la gliosis se observa una mayor expresión de GFAP, incremento en la cantidad de astrocitos y solapamiento de los procesos. Tomado y modificado de Sofroniew, M. V. (2009). *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Trends in neurosciences*, 32(12), 638-647.

Status epilepticus

La astrogliosis es una característica distintiva de la epilepsia y del *status epilepticus* (SE) y los cambios que ocurren en estas células pueden afectar la supervivencia neuronal (Vargas-Sánchez *et al.*, 2018).

El término “*Status epilepticus*” hace referencia a una actividad convulsiva continua o, a múltiples convulsiones entre las cuales no se recupera la conciencia (Cavalheiro, 1995; Curia *et al.*, 2008). Estas convulsiones frecuentes y prolongadas causan un exceso en la liberación de glutamato, sobreactivando el receptor ionotrópico de tipo NMDA (NMDAr) en el hipocampo entre otras regiones (Hardingham *et al.*, 2010) lo cual provoca hiperexcitabilidad neuronal (Figura 3). Estudios recientes han demostrado que el receptor NMDA se encuentra también en astrocitos y estaría involucrado en la transmisión de señales neurona-glía (Lalo *et al.*, 2006; Palygin *et al.*, 2011), aunque no se ha descrito si está vinculado a la gliosis pos-*status epilepticus*.

El estado epileptogénico puede ser reproducido utilizando diferentes modelos experimentales *in vivo* o *in vitro*, cada uno de ellos con sus ventajas y desventajas. Entre los modelos *in vivo* más utilizados para inducir SE, se pueden mencionar la utilización de bloqueantes de receptores GABA, la hiperactivación eléctrica intracerebral (*kindling*), la administración de ácido kaínico, pilocarpina o pentilenotetrazol (Avoli & Jefferys, 2016; Campos *et al.*, 2018). Una vez inducido el SE, su desarrollo es monitoreado mediante la observación de patrones comportamentales y clasificándolos en distintas escalas. El cultivo neuronal es una herramienta útil para estudiar el SE *in vitro*. La pérdida de conectividad inherente al procedimiento para llevar a cabo un cultivo celular es uno de los principales problemas para desarrollar un modelo de epilepsia inducido por drogas. Sin embargo, las neuronas pueden formar conexiones *de novo* que pueden resultar en actividad eléctrica e incluso se pueden inducir descargas epileptiformes (Avoli & Jefferys, 2016). Los cultivos neuronales son susceptibles a tratamientos convulsivantes (Giachello *et al.*, 2013) o a la aplicación de medio sin Mg^{2+} lo cual activa a los receptores glutamatérgicos NMDA provocando la hiperexcitabilidad característica del SE (Sombati & Delorenzo, 1995).

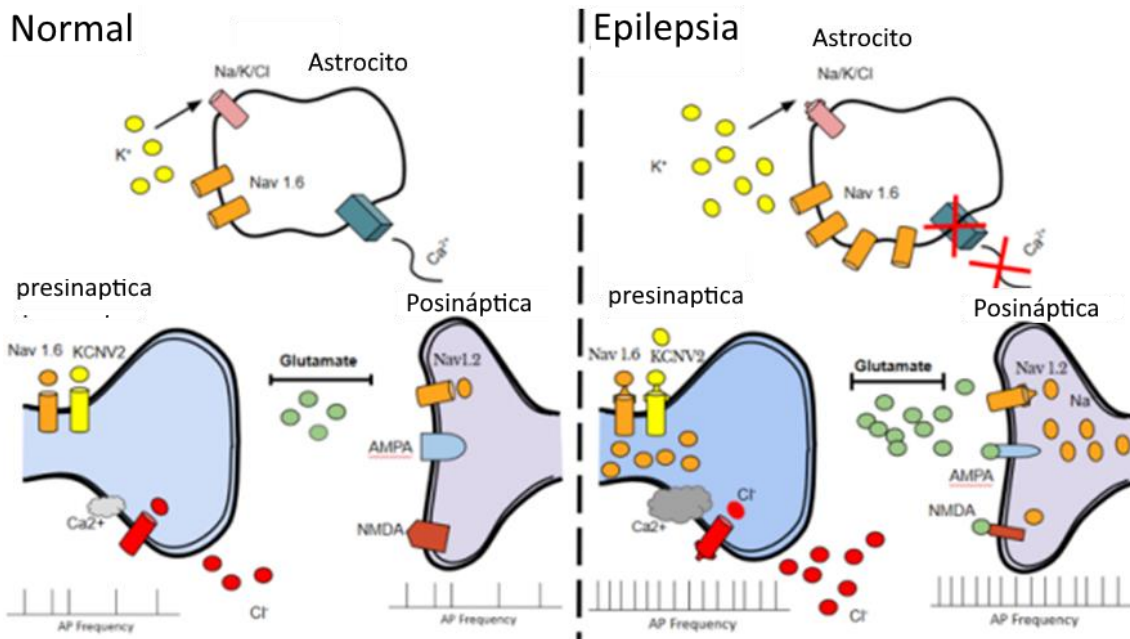


Figura 3. Disfunciones ionotrópicas en el estado epiléptico que explican la despolarización y la hiperexcitabilidad. Durante la epilepsia, se hiperactivan los canales Cav3.2 [Ca^{2+}], Nav1.6 [Na^+], CIC-2 [Cl^-] y Kv7.2 [K^+] en las neuronas presinápticas. En la neurona posináptica, aumenta la despolarización como resultado de la hiperactivación de canales iónicos tales como AMPA, NMDA y Nav1.2. Luego de la epilepsia, aumenta la expresión de los canales de Na^+ , Nav1.6 en astrocitos. El cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ se desactiva y cesan las corrientes de Ca^{2+} . Tomado y modificado de *Ganev et al. (2018). Epileptic Channels: Dysfunctional Trio of Excitable Cells. Eukaryon, Vol. 14.*

Los receptores NMDA son de tipo ionotrópicos, activados por glutamato y desempeñan un papel clave en la transmisión sináptica excitatoria, participando en diversas funciones cerebrales, como la memoria y cognición. Estudios han demostrado que los astrocitos expresan receptores funcionales de NMDA, que median las corrientes transmembrana en los astrocitos corticales que se activan tras la transmisión sináptica fisiológica, y que exhiben un bloqueo débil de Mg^{2+} a concentración fisiológica, por lo tanto, pueden ser activos incluso a un potencial de membrana en reposo (Lalo *et al.*, 2006).

Astrogliosis, Status Epilepticus y neuroprotección

Los astrocitos reactivos muestran una disminución en la expresión del transportador de aminoácidos excitatorios (EAAT), que transporta glutamato al interior de los astrocitos, lo cual exacerba la muerte neuronal inducida por glutamato (Sarac *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2012). Además, la activación de astrocitos lleva a un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular lo cual resulta en la intensificación de la liberación de glutamato como gliotransmisor (Aguado *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2007). Si bien, estos resultados sugieren que los astrocitos reactivos promoverían la excitotoxicidad existen numerosas evidencias que demuestran que estas células tienen un rol neuroprotector. En modelos de isquemia y de SE se ha observado que la ausencia o la inhibición metabólica de astrocitos potencia la muerte neuronal observada luego del evento nocivo (Hayakawa *et al.*, 2010). En nuestro laboratorio utilizamos el modelo de SE *in vitro* inducido por medio del buffer libre de Mg^{2+} , observamos que el SE aplicado en un cultivo puro de neuronas hipocampales, induce muerte neuronal 12 h después del evento excitotóxico¹ (Danelon, 2016) y reactividad glial (Figura 3). Sin embargo, utilizando el mismo protocolo de SE pero aplicado a un co-cultivo de neuronas-astrocitos, no se observó muerte neuronal significativa 12 hs posteriores al SE y una neuroprotección parcial a las 24 horas posteriores al evento (Figura 4).

Nuestros resultados y los obtenidos por otros grupos de investigación demuestran que los astrocitos cumple un rol en la neuroprotección luego de un evento excitotóxico (Figura 3) (Hayakawa *et al.*, 2010; Danelon, 2016; Montroull *et al.*, 2019). Se postulan diferentes mecanismos por los cuales los astrocitos podrían mediar la neuroprotección, por ejemplo a través de alteraciones en la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} (Tanaka *et al.*, 2006) o mediante la activación del factor transcripción HIF-1a (Hirayama *et al.*, 2015). Sin embargo, es probable que existan múltiples mecanismos y factores liberados por los

¹ La excitotoxicidad se refiere a un proceso por el cual las neuronas sufren un daño y/o la muerte por hiperactivación de los receptores para neurotransmisor excitatorio glutamato, tales como los receptores NMDA y AMPA.

astrocitos para sostener la viabilidad neuronal en condiciones patológicas o traumáticas.

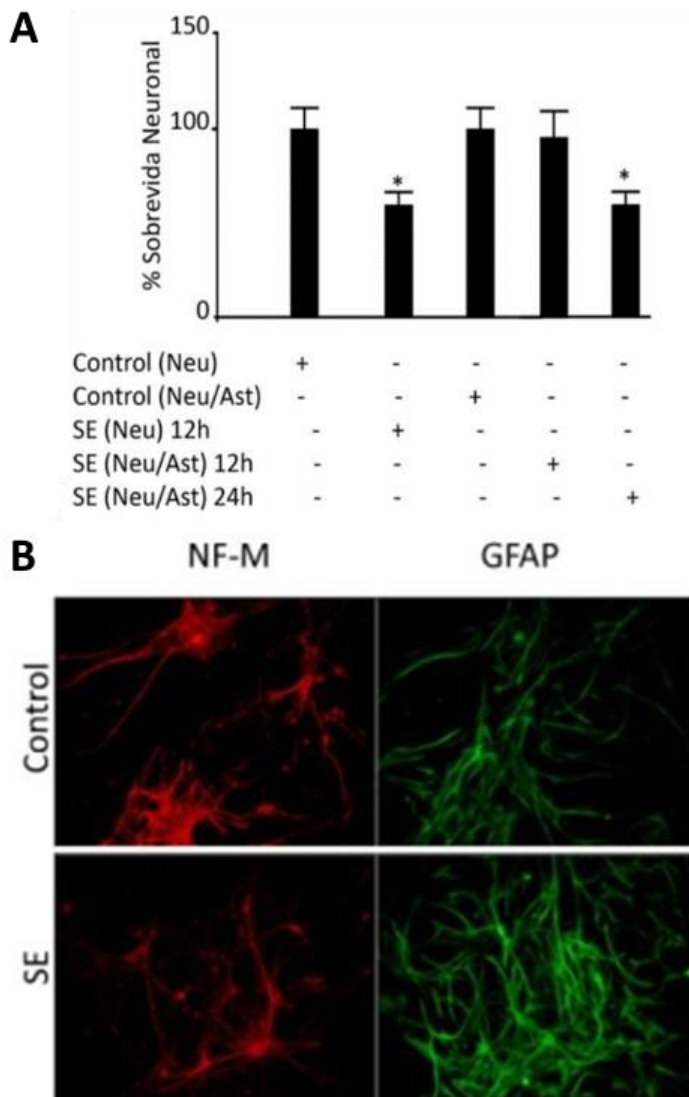


Figura 4. Efectos del SE sobre la sobrevida y reactividad glial en cocultivos de neuronas/ astrocitos.

A). Cuantificación de la sobrevida neuronal. B). Inmunomarcación de NF-M (proteína de neuronas, rojo) y GFAP (proteína de astrocitos, verde). Tomado de Danelon V. (2016). Tesis doctoral, Participación de la neurotrofina BDNF y proBDNF en los mecanismos de muerte neuronal en un modelo *in vitro* de *Status Epilepticus*.

Las neurotrofinas son factores tróficos fundamentales para el mantenimiento de la supervivencia neuronal durante el SE. El SE induce un desbalance en la expresión de las neurotrofinas y sus receptores en neuronas afectando a la sobrevida de estas células (Unsain *et al.*, 2008; Danelon, 2016; Montroull *et al.*, 2019). En nuestro laboratorio observamos que el SE produce una disminución en la expresión de TrkB y un incremento en la isoforma truncada de TrkB (TrkB-t), de p75NTR y proBDNF previamente al inicio de la muerte neuronal. Por otra parte se produce un incremento en la unión de p75NTR a BDNF y proBDNF (Danelon, 2016; Montroull *et al.*, 2019). Estas alteración en los niveles de

neurotrofinas y sus receptores llevarían a la neurodegeneración que se observa luego del SE.

Por otra parte, se sabe que la sensibilidad de las neuronas al daño inducido por el SE *in vivo* varía según el área del cerebro (Fujikawa, 1996; Montroull *et al.*, 2019). Con respecto a los astrocitos, se sabe que el SE induce astrogliosis en hipocampo y corteza pero no se ha estudiado si esta respuesta es un denominador común en otras áreas del SNC. Tampoco sabemos si los astrocitos de otras áreas del cerebro también tienen un rol neuroprotector ante un evento excitotóxico. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que los astrocitos de corteza, cuerpo estriado e hipocampo responden de diferente manera a un daño mecánico y a las neurotrofinas (Cragolini *et al.*, 2018). Esto sugiere que los astrocitos constituyen una población heterogénea de células y que muestran diferencias determinadas por las áreas del cerebro a la que pertenecen, esto podría impactar en su capacidad de proteger a las neuronas y reparar un daño.

HIPÓTESIS

Nuestros resultados preliminares demuestran que las neuronas de hipocampo tienen mayor capacidad de tolerar un SE si se encuentran en presencia de astrocitos obtenidos de la misma área cerebral. Si bien conocemos bastante acerca de los cambios que ocurren en neuronas luego de un SE poco sabemos sobre cómo reaccionan los astrocitos al SE y si la respuesta varía entre células de distintas áreas del cerebro. En base a los antecedentes expuestos, planteamos la hipótesis general que postula que *el SE no afecta la viabilidad de los astrocitos pero induce reactividad glial en astrocitos obtenidos de diferentes áreas cerebrales siendo más marcada en aquellas zonas más vulnerables a la neurodegeneración.*

OBJETIVOS

Para corroborar la hipótesis planteada nos proponemos evaluar los parámetros principales que caracterizan a la gliosis reactiva y la viabilidad celular luego de someter a astrocitos obtenidos de diferentes áreas cerebrales un SE in vitro.

Objetivos específicos

- 1- Evaluar la supervivencia de astrocitos en cultivo obtenidos de corteza cerebral (CX), cuerpo estriado (ST) e hipocampo (Hipo) luego de someterlos a *Status epilepticus*.
- 2- Analizar la expresión de GFAP en astrocitos en cultivo obtenidos de CX, ST e Hipo luego de someterlos a un SE.
- 3- Evaluar la proliferación de los astrocitos obtenidos de CX, ST e Hipo luego del SE.
- 4- Determinar la expresión de neurotrofinas BDNF y el receptor TrkB.t en astrocitos obtenidos de CX, ST e Hipo luego del SE.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo celular

Los astrocitos se obtuvieron de ratas Wistar_postnatal día 0-2, de acuerdo al protocolo descrito en Cragolini *et al.*, (2018). Las ratas fueron sacrificadas por decapitación y, en condiciones de esterilidad se disecaron la corteza, el hipocampo y cuerpo estriado. Luego se disgregaron mecánicamente y las células se sembraron en botellas de cultivo, previamente tratadas con poli-D-lisina (14,2 µg/ml). El medio de cultivo de mantenimiento se compone de DMEM (Gibco), 10% serum fetal bovino (Internegocios), 50 IU/ml penicilina y 50 IU/ml estreptomycin (Gibco). Una vez alcanzada la confluencia, los astrocitos fueron purificados por agitación utilizando un agitador orbital. Luego, se agregó tripsina (0,25%) para obtener una suspensión celular y los astrocitos se sembraron en cubreobjetos de vidrio cubiertos con poli-D-lisina colocados en placas de 24 pocillos para ensayos de supervivencia o inmunocitoquímica o se sembraron en placas Petri de 35 mm (Corning) para Western blot. La pureza de los astrocitos se evaluó por medio de la inmunomarcación con anticuerpos contra GFAP (proteína expresada por astrocitos), MAG (proteína expresada por oligodendrocitos) y CD11 (proteína expresada por microglía), donde más del 95% de las células fueron positivas para GFAP y negativas para MAG y CD11. El protocolo de uso de animales fue aprobado por el CICUAL del Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT), acta 3/2015.

Modelo SE *in vitro*

Luego de alcanzar un 90% de confluencia, los cultivos de astrocitos fueron sometidos al SE que consistía en exponer al cultivo a una solución buffer libre de Mg⁺² (Sombati *et al.*, 1995) y pH 7,4. Las células se lavaron 2 veces con PBS para eliminar todos los restos de medio de mantenimiento y se incubaron durante 3h en la solución buffer apropiada, control o tratamiento, que contiene en mM: 145 NaCl, 2,5 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 10 glucosa, 0,002 glicina, ± 1 MgCl₂. Después de este tiempo, los astrocitos fueron incubados en un medio libre de suero durante 12h y 24h según corresponda.

Ensayo de supervivencia

El ensayo de supervivencia se realizó marcando a las células vivas con calceína AM y a las muertas con etidio homodímero-1 (Molecular probes Cat #03224) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. De forma resumida, cada cubreobjeto (con astrocitos de cada área cerebral) se lavó 2 veces con PBS y luego se incubó durante 25min con una mezcla de calceína/etidio. Finalizado el período de incubación se lavó con PBS, se tiñeron los núcleos con Hoescht y fueron inmediatamente observadas en un microscopio de fluorescencia. Se tomó una foto del centro de cada cubreobjetos con células a un aumento de 10X para abarcar, en una sola imagen, la mayor superficie del cubreobjetos. Se calculó el porcentaje de células positivas para etidio o calceína AM sobre el total de células (total de Hoescht).

Evaluación de la expresión de GFAP

Inmunocitoquímica

Una vez finalizado el tratamiento con las soluciones control o SE las células crecidas en cubreobjetos se fijaron con metanol, se bloquearon y permeabilizar con una solución de PBS tritón 0,3%+ suero de cabra 10% e incubaron durante toda la noche con un anticuerpo contra GFAP hecho en conejo (ImmunoStar, dilución 1:5) a 4°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario contra conejo unido a un fluoróforo (Alexa 555, Thermofisher) durante 1,5h. Luego se realizaron 3 lavados con PBS, y se incubaron durante 5 minutos con una solución de DAPI en PBS para marcar los núcleos, posteriormente se lavaron los vidrios con agua destilada y se montaron en portaobjetos con FluorSave. Se tomaron fotos de los cubreobjetos inmunomarcados y se analizó el *mean gray value* de 3 áreas por cada vidrio con el programa ImageJ.

SDS-PAGE y Western blot

Luego del tratamiento con SE las células crecidas en placas de Petri de 35mm de diámetro, fueron lisadas con buffer RIPA en presencia de inhibidores de fosfatasa y proteasas. Luego se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min, se descartó el precipitado conteniendo restos celulares no lisados y las proteínas presentes en el sobrenadante se cuantificaron utilizando un kit comercial (Bio-

Rad DC Protein Assay). Una vez cuantificadas, se igualaron las concentraciones y se desnaturalizaron con buffer Laemmli seguido por calentamiento a 95°C durante 5 min. y se utilizaron 30µg de proteínas totales de cada condición experimental para el Western blot. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE, en geles de poliacrilamida, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se realizó una tinción con Ponceau para corroborar la correcta transferencia. Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con leche (5% en TBS.T) para bloquear uniones inespecíficas y luego con anti-GFAP (mouse, Millipore, MAB 360, dilución 1:5000) durante la noche a 4°C. Se lavaron con buffer TBS-T 0,05% y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con HRP. Luego las membranas se lavaron y revelaron mediante el método ECL (enhanced chemio luminiscence). Las imágenes de las placas fotográficas reveladas se digitalizaron y se cuantificaron por medio del programa de análisis de imágenes, ImageJ.

Proliferación

La proliferación de astrocitos pos-SE se evaluó cuantificando el número de células marcadas con DAPI tal como se indica en la sección inmunocitoquímica. Además, se probaron diferentes protocolos para evaluar indicadores de proliferación como la incorporación de BrDU y la expresión de Ki-67. El protocolo que mejor funcionó fue la marcación de Ki-67 de la siguiente manera. Las células crecidas en cubreobjetos, fueron fijadas con PFA 4%, 12h pos-SE, se lavaron 3 veces con PBS y se sometieron a un tratamiento con buffer citrato para exponer al antígeno y permitir el acceso del anticuerpo. Para ello, los cubreobjetos se sumergieron en buffer citrato (0,1M, pH 6) a 95°C y se incubaron en esas condiciones durante 15 min. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS y se procedió a la permeabilización, bloqueo e incubación con anti-Ki67 (hecho en conejo, Abcam, dilución 1:100 en PBS) y anti-conejo ligado a fluoróforo, de la forma descrita en la sección inmunocitoquímica. Finalmente, los núcleos se marcaron con DAPI y se montaron en portaobjetos.

Se tomaron fotos de los cubreobjetos inmunomarcados y se analizó el *mean gray value* de 2 áreas por cada vidrio con el programa ImageJ.

Expresión de BDNF y TrkB.t

Luego del tratamiento con SE las células fueron lisadas y procesadas para SDS-PAGE y Western blot como se describe anteriormente. Las membranas conteniendo las proteínas transferidas se bloquearon y posteriormente se incubaron con anti-TrkB (hecho en conejo, Santa Cruz, sc-8316, dilución 1:1000) durante la noche a 4°C. Este anticuerpo reconoce a todas las isoformas de TrkB, incluyendo a TrkB.t que sería la única presente en astrocitos.

Las imágenes de las placas fotográficas reveladas se digitalizaron y se cuantificaron por medio del programa de análisis de imágenes, ImageJ.

Para detectar BDNF se probaron varios protocolos con el fin de medir los niveles por Western blot en medio condicionado concentrado por precipitación de proteínas con tricloroacético o en homogenatos celulares totales. Dado que los niveles de esta neurotrofina en astrocitos estarían por debajo de los niveles detectables por Western blot no se logró cuantificar BDNF por este método. En cambio, detectamos BDNF por inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo contra BDNF (hecho en conejo, sc-546, dilución 1:100) y el procedimiento descrito para la inmunomarcación de GFAP.

Se tomaron fotos de los cubreobjetos inmunomarcados y se analizó el *mean gray value* de 3 áreas por cada vidrio con el programa ImageJ.

Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como porcentaje del control (media \pm SEM) a menos que se indique lo contrario en la descripción de cada resultado. El ANAVA fue seguido por comparaciones post hoc de Tukey, tomando como valor de significancia $p < 0,05$.

Los niveles de proteína se cuantificaron en un mínimo de 3 cultivos diferentes por grupo. Los análisis se realizaron con la ayuda del programa Infostat (Estadística y Diseño, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTADOS

1. Sobrevida/muerte

Para comprender los efectos del *Status epilepticus* sobre la fisiología de los astrocitos, se utilizó el modelo *in vitro* de SE desarrollado por Sombati y DeLorenzo (1955). Estudios anteriores realizados en el laboratorio han demostrado que el SE induce la muerte en un cultivo puro de neuronas 12 horas después de la finalización del SE (Danelon, 2016) pero en presencia de astrocitos, la muerte neuronal provocada por el SE reduce significativamente. Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluaron diferentes aspectos de la viabilidad y reactividad de astrocitos con el fin de caracterizar la respuesta de estas células al SE. Se evaluó la viabilidad en cultivos puros de astrocitos luego de 12h ocurrido el SE, con el kit de citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD.

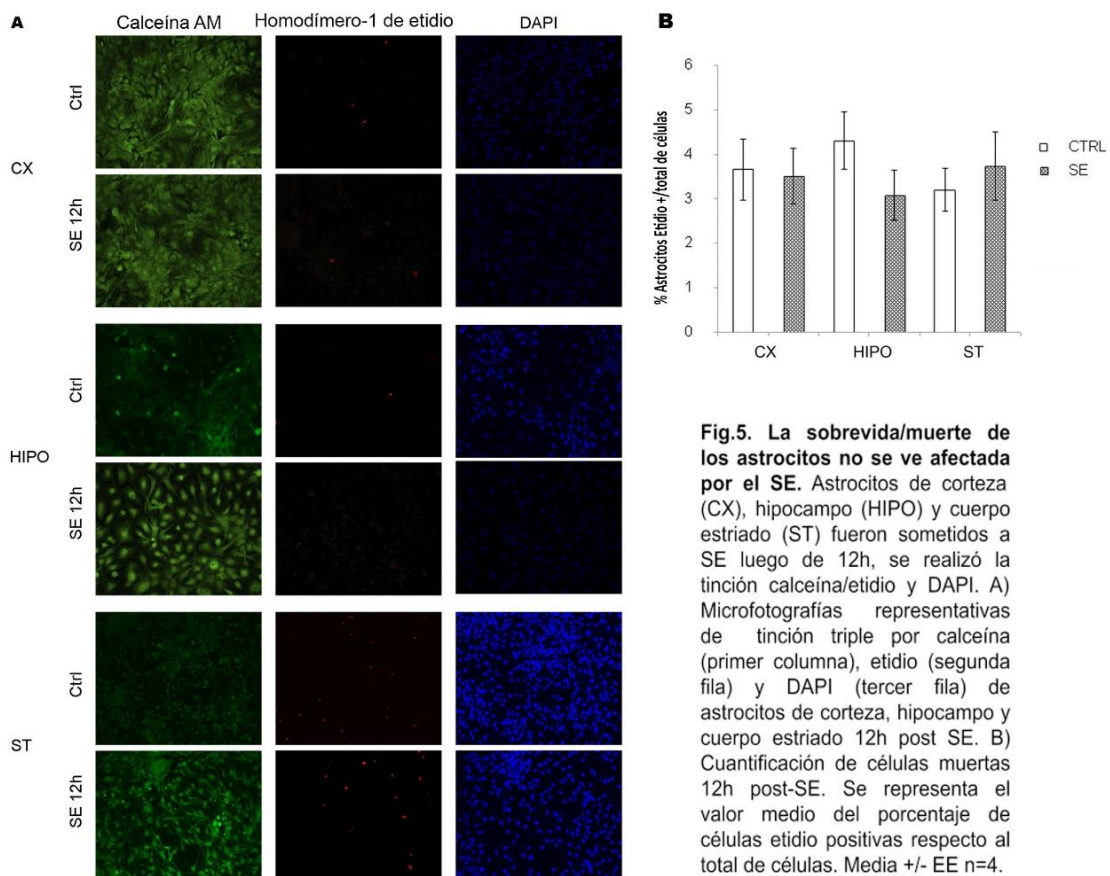


Fig.5. La sobrevida/muerte de los astrocitos no se ve afectada por el SE. Astrocitos de corteza (CX), hipocampo (HIPO) y cuerpo estriado (ST) fueron sometidos a SE luego de 12h, se realizó la tinción calceína/etidio y DAPI. A) Microfotografías representativas de tinción triple por calceína (primer columna), etidio (segunda fila) y DAPI (tercer fila) de astrocitos de corteza, hipocampo y cuerpo estriado 12h post SE. B) Cuantificación de células muertas 12h post-SE. Se representa el valor medio del porcentaje de células etidio positivas respecto al total de células. Media +/- EE n=4.

Como se muestra en la Fig. 5 A-B, la proporción de astrocitos positivos para etidio con respecto a aquellos que incorporaron calceína AM, no presentan

diferencias significativas entre las áreas bajo estudio (corteza, hipocampo y cuerpo estriado), así como tampoco entre los grupos control y los sometidos al SE de cada área respectiva (ANOVA univariado $*p=0,8528$). Lo que supone que la sobrevivencia de los astrocitos se ve afectada de igual manera en todas las áreas por las condiciones experimentales utilizadas en este estudio.

2. GFAP

Diversos autores han definido a la astrogliosis como una característica distintiva del SE, que va acompañado de un aumento en los niveles de GFAP (proteína ácida fibrilar glial). Para verificar si estos cambios ocurren en este modelo *in vitro* de SE, determinamos los niveles de GFAP luego del SE.

Para determinar los cambios en la expresión de GFAP pos-SE en los astrocitos provenientes de distintas áreas del cerebro, realizamos un análisis de inmunocitoquímica y su posterior cuantificación. No observamos diferencias significativas en la expresión de GFAP entre las áreas ni entre los tratamientos (ANOVA univariado $*p=0,8906$) (Fig. 6 A-B).

Para confirmar estos resultados, se evaluó la expresión de GFAP por Western blot (WB) donde se tuvo en cuenta un tiempo intermedio pos-SE de 6h. Se observó que los niveles de GFAP incrementaron significativamente a partir de las 6h pos-SE en ST y a partir de las 12h en CX, sin embargo permanecieron sin alteraciones en astrocitos provenientes de HIPO (ANOVA univariado $*p=0,0496$). Estos resultados sugieren una respuesta dependiente del área cerebral de la cual provienen los astrocitos.

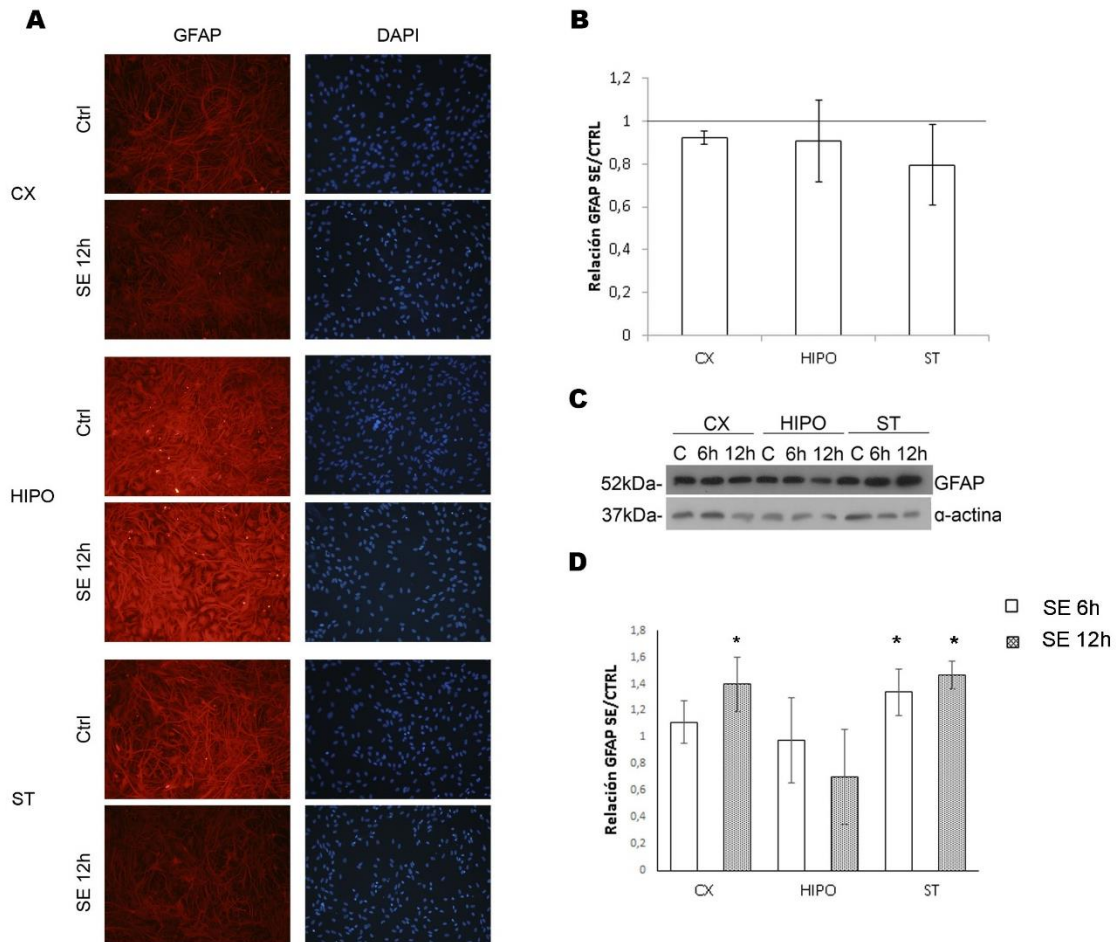


Fig.6. Expresión de GFAP luego del SE. Cultivos de astrocitos de corteza (CX), hipocampo (HIPO) y cuerpo estriado (ST) fueron marcados para GFAP Y DAPI 12h luego del SE. A) Microfotografías mostrando la doble tinción para GFAP (primera columna) y DAPI (segunda columna) en cultivos controles (ctrl) y *status epilepticus* (SE) 12h. B) Cuantificación de la inmunofluorescencia de GFAP, representada como intensidad en cultivos sometidos a SE con respecto al control. Media +/- EE, n=3. C) Western blot representativo de la expresión de GFAP en homogenatos de proteínas totales obtenidas a partir de cultivos de astrocitos CX, HIPO y ST 6h y 12h luego del SE, se utilizó el anticuerpo contra actina como control de carga. D) Cuantificación del WB, representado como intensidad de las bandas de 6 o 12h pos-SE respecto al correspondiente control de astrocitos de cada área.

3. Proliferación

Una de las respuestas de los astrocitos ante una lesión, es la proliferación de los mismos. Por ello se evaluó este parámetro en las tres áreas cerebrales, realizando un recuento total de células identificadas con DAPI para cada condición experimental. No se observaron diferencias significativas en el

recuento de células DAPI entre las áreas ni entre los tratamientos (Fig. 7 A, columna izquierda y B, ANOVA univariado * $p=0,39$).

Si bien el recuento total de células puede ser un buen indicador de los cambios en la proliferación, existen diversos marcadores que nos permiten hacer una estimación más precisa de este parámetro. Uno de ellos es la expresión de la proteína Ki-67, que se expresa durante todas las fases del ciclo celular y está ausente en la fase G0. En este trabajo se evaluó la expresión de Ki-67 por inmunofluorescencia lo cual requirió del ensayo de varios protocolos para lograr exponer el antígeno (*antigen retrieval*) previo al agregado del anticuerpo contra esa proteína. Luego de realizar varias pruebas, el protocolo que mejores resultados nos ha proporcionado es el tratamiento de los cultivos (previamente fijados con PFA 4%) con citrato de sodio (0,1M, pH 6) a 95°C durante 15min, tal como se detalla en la sección de materiales y métodos. Debido a las dificultades técnicas y al tiempo destinado a la puesta a punto del protocolo de marcación, solo presentamos los resultados preliminares de un experimento realizado por cuadruplicado. Observamos que la proliferación de astrocitos de CX e HIPO no varió luego de 12h pos-SE, sin embargo, en astrocitos de ST se observa una tendencia a incrementar luego del SE (Fig.7C). Por otra parte, los astrocitos obtenidos de ST en condiciones controles y SE mostraron una mayor tasa de proliferación con respecto a los astrocitos provenientes de CX e HIPO. Este resultado está en consonancia con estudios previos obtenidos en nuestro laboratorio que demuestran que las células de ST proliferan con mayor velocidad (Cragolini *et al.*, 2018).

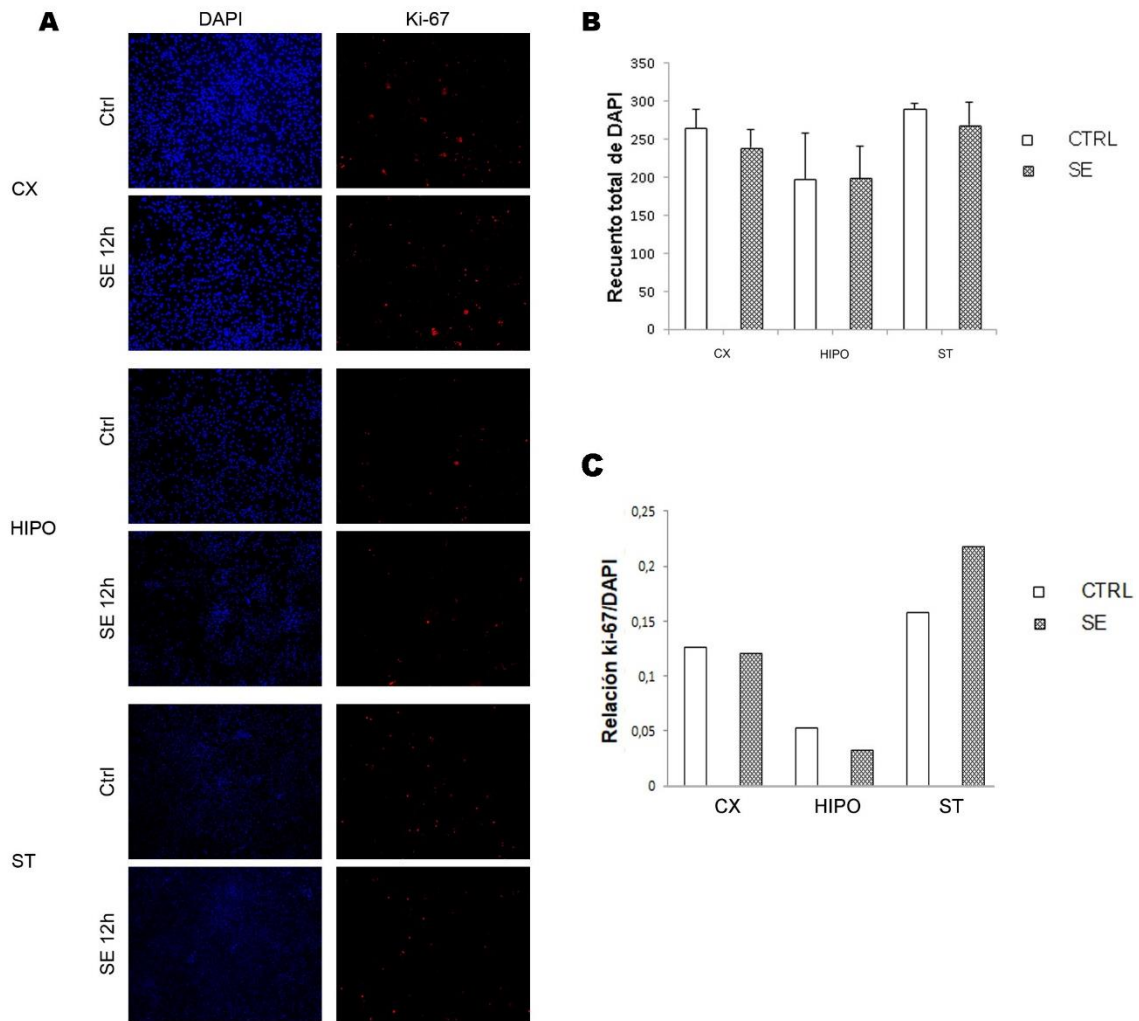


Fig.7. La proliferación de astrocitos varía entre las áreas del cerebro. Cultivos de astrocitos de corteza (CX), hipocampo (HIPO) y cuerpo estriado (ST) fueron marcados para Ki-67 y DAPI 12h luego del SE o del buffer control. A) Microfotografías mostrando la doble tinción para DAPI (primera columna) y Ki-67 (segunda columna), en cultivos controles (Ctrl) y SE 12h. B) Cuantificación del número total de células realizando el conteo de los núcleos marcados con DAPI. Media +/- EE, n=3. C) Cuantificación de las células Ki-67+ en relación al total de núcleos marcados con DAPI. Promedio de los valores por cuadruplicado de un único experimento.

4. BDNF y TrkB

Distintos tipos de lesiones provocadas en el SNC, incluido el SE inducen modificaciones en los niveles de expresión de neurotrofinas y sus receptores en astrocitos (Cragolini *et al*, 2008; 2012; 2018) y en neuronas (Montroull *et al*, 2019, Danelon *et al.*, artículo en preparación). Cuando se analizan los niveles de TrkB en cultivos puros de neuronas se observa una caída en los niveles pos-SE,

este efecto se revierte cuando el SE es inducido en co-cultivos de neuronas-astrocitos (Danelon *et al.*, 2016; Danelon *et al.*, artículo en preparación). Estos antecedentes llevaron a preguntarnos qué ocurre con la expresión de neurotrofinas en astrocitos sometidos a SE *in vitro* ya que cambios en la expresión y/o liberación de estos factores tróficos podrían, eventualmente, impactar sobre la fisiología neuronal.

Para evaluar si ocurren cambios en los niveles de neurotrofinas luego del SE, se evaluó la expresión de BDNF por inmunohistoquímica (Fig.8 A-B). No se observaron diferencias en la expresión de BDNF entre los astrocitos de diferentes regiones del cerebro ni tampoco luego del tratamiento con el buffer SE (ANOVA univariado $*p=0,0601$), aunque existe una tendencia a la disminución de la inmunomarca para BDNF en astrocitos de CX y ST.

Para evaluar la expresión de TrkB.t por WB los astrocitos provenientes de las áreas cerebrales mencionadas anteriormente recibieron las soluciones control o SE durante 6h y 12h después de finalizada la estimulación se lisaron las células para proceder con la electroforesis y WB. El análisis por WB reveló que no había diferencias significativas entre ninguna de las áreas estudiadas, ni con respecto al tiempo post SE (Fig.8 C-D), sugiriendo que los niveles de TrkB.t no se ven afectados por el SE en astrocitos.

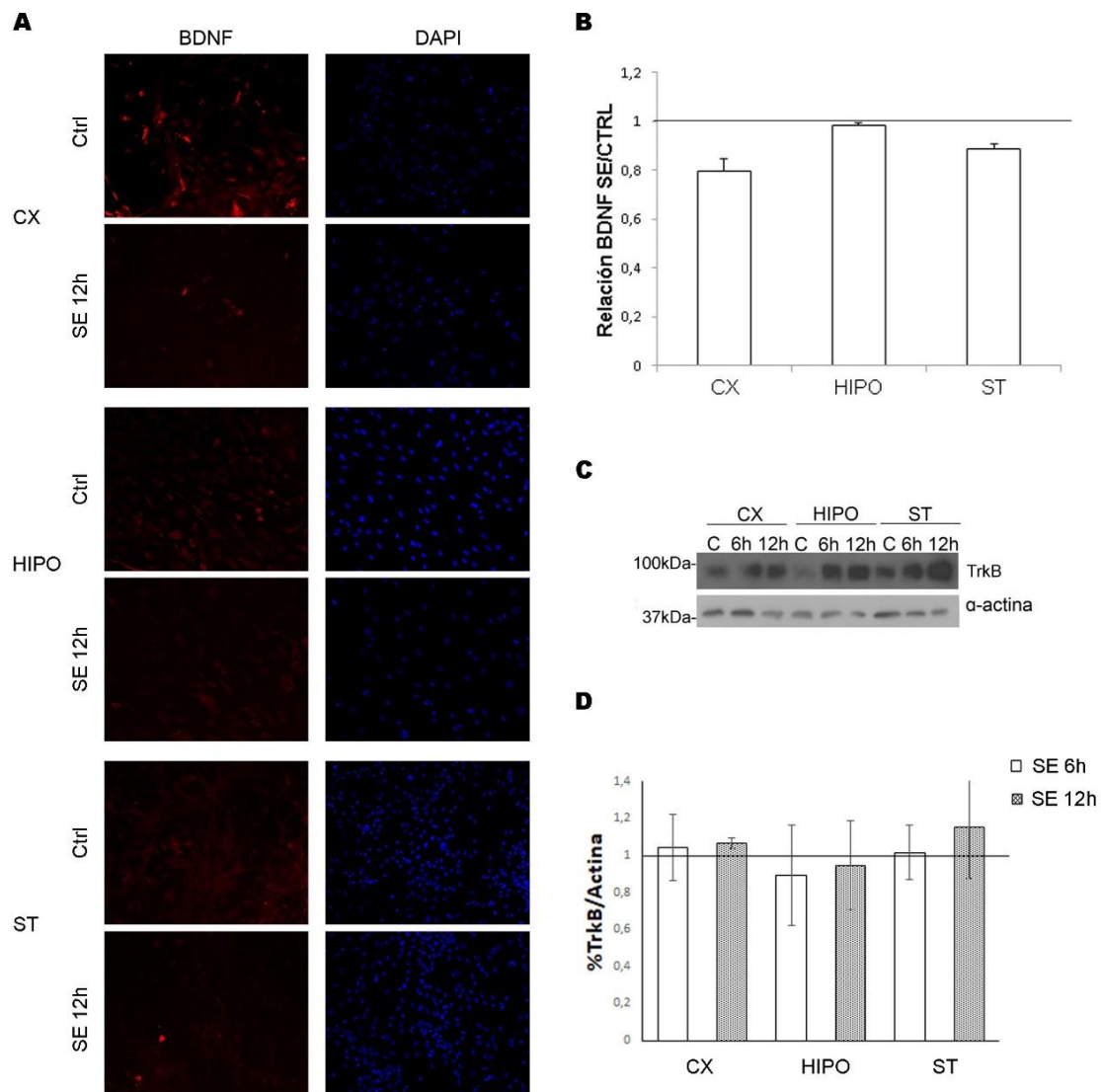


Fig.8. La expresión de BDNF y el receptor TrkB no se ve afectada por el SE. Cultivos de astrocitos de corteza (CX), hipocampo (HIPO) y cuerpo estriado (ST) fueron marcados para BDNF, TrkB y DAPI 12h luego del SE o del buffer control. A) Microfotografías mostrando la doble tinción para BDNF (primera columna) y DAPI (segunda columna), en cultivos controles (Ctrl) y SE 12h. B) Cuantificación de la inmunofluorescencia de BDNF, representada como intensidad en cultivos sometidos a SE con respecto al control. C) Western blot representativo de la expresión de TrkB en homogenatos de proteínas totales obtenidas a partir de cultivos de astrocitos CX, HIPO y ST 6h y 12h luego del SE, se utilizó el anticuerpo contra actina como control de carga. D) Cuantificación del WB, representado como intensidad de las bandas de 6 o 12h pos-SE respecto al correspondiente control de cada área.

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron varios aspectos de la reactividad de los astrocitos provenientes de distintas áreas del cerebro en respuesta al *Status Epilepticus in vitro*. El principal hallazgo fue que el SE afecta la expresión de GFAP pero no de otros parámetros de viabilidad o reactividad glial y esta respuesta dependió del área del cerebro de la cual provenían los astrocitos.

El modelo de SE que se utilizó en este proyecto se basa en el uso de un buffer que carece de Mg^{2+} con el fin de activar los receptores NMDA (Sombati & DeLorenzo, 1995) y ha sido validado por varios trabajos que estudian los efectos de las descargas epileptiformes en neuronas (Danelon, 2016; Avoli & Jefferys, 2016; Mikroulis *et al.*, 2018). La simplicidad de un modelo *in vitro* para inducir hiperactividad neuronal lo hace muy atractivo para el estudiar de forma rápida drogas o estrategias con potenciales efectos antiepiléptico y/o neuroprotector. Sin embargo, hasta ahora se desconocen los efectos que tiene la aplicación del buffer libre de Mg^{2+} sobre los astrocitos. Esto es sumamente importante ya que el efecto neuroprotector de un agente terapéutico podría ser ejercido por acción directa sobre las neuronas o indirectamente por acción sobre células gliales (Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017; Danelon *et al.*, 2017). Es por ello que en este trabajo caracterizamos el impacto que tiene la aplicación del buffer libre de Mg^{2+} como modelo de SE sobre diferentes aspectos de la astrogliosis.

En primera instancia evaluamos si el SE altera la supervivencia de los astrocitos y observamos que este parámetro no se vio afectado, al menos a las 12h pos-SE. Los astrocitos presentan diferentes mecanismos de defensa a la citotoxicidad y antioxidantes que le confieren resistencia a la apoptosis para sí mismos y también para las neuronas que los rodean (Bylicky *et al.*, 2018). Sin embargo, existen trabajos en los que se demuestra que el SE *in vivo* altera la función mitocondrial (Hyun *et al.*, 2017; Park & Kang, 2018) y compromete la viabilidad de subpoblaciones de astrocitos (Park & Kang, 2018; Vargas-Sánchez *et al.*, 2018). Este efecto parece ser dependiente de la región del cerebro ya que el SE induce apoptosis junto con una disminución del largo de las mitocondrias en el giro dentado, mientras que se alargan las mitocondrias en la región CA1 del hipocampo (Park & Kang, 2018).

Varios trabajos demostraron que las respuestas a un mismo tipo de lesión varían de acuerdo al área del cerebro de la cual provienen los astrocitos (Sun & Jakobs, 2012; Chai *et al.*, 2017; Cragolini *et al.*, 2018; Naskar & Chattarji, 2019). Nuestros resultados mostraron que la expresión de GFAP, uno de los parámetros indicadores de astrogliosis, presentó diferencias regionales luego del SE *in vitro*. Así, en los astrocitos obtenidos de CX y ST se incrementó la expresión de GFAP, mientras que en los de HIPO no se produjeron alteraciones. Sin embargo, cuando el SE es aplicado a co-cultivos de neuronas y astrocitos obtenidos de hipocampo induce la expresión de GFAP (Danelon, 2016; Danelon *et al.*, manuscrito en preparación). Esta discrepancia entre los resultados obtenidos en cultivos puros de astrocitos y co-cultivos neuronas-astrocitos podría indicar que, al menos las células obtenidas de hipocampo, no serían sensibles al buffer libre de Mg^{2+} por si solo sino que, para activarse, dependerían de señales provenientes de las neuronas estimuladas por el SE.

La proliferación es otra de las respuestas que forman parte de la astrogliosis inducida por las lesiones infringidas a los astrocitos (Pekny & Pekna, 2014; Sofroniew, 2015; Diniz *et al.*, 2016). En este trabajo analizamos la proliferación de astrocitos 12h pos-SE y no se observaron cambios en este parámetro en células obtenidas en ninguna de las áreas cerebrales estudiadas. Trabajos previos han demostrado que el SE *in vivo* produce incremento en la proliferación de astrocitos a partir de las 24h pos-SE en diferentes áreas del hipocampo (Cragolini *et al.*, 2009 y 2012). Si bien los resultados con los modelos *in vitro* e *in vivo* parecen ser contradictorios se sabe que el comportamiento de los astrocitos varía a lo largo del tiempo pos-SE y también depende del modelo experimental de SE utilizado (Vargas-Sánchez *et al.*, 2018). Se ha observado que en las etapas tempranas del SE no hay un incremento marcado en la proliferación de astrocitos, mientras que en etapas posteriores incrementa rápidamente (Niquet *et al.*, 1994; Gibbons *et al.*, 2013). Para el propósito planteado en esta tesina, decidimos limitar la evaluación de los parámetros de reactividad astrocítica a las 12h pos-SE que es el tiempo en el cual se produce el efecto neuroprotector. Sin embargo, no descartamos que a otros tiempos posteriores al SE se produzca un incremento en la proliferación, estos estudios forman parte de trabajos que se están llevando a cabo en nuestro laboratorio.

Los astrocitos proveen factores tróficos como el BDNF a las neuronas, el cual a través de la unión a TrkB, participa en funciones tan importantes como el aprendizaje, la memoria, sinaptogénesis, neurogénesis y la supervivencia neuronal (Budni *et al.*, 2015; Vignoli *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2018). La disponibilidad de BDNF y la expresión de TrkB son indispensables para el mantenimiento de la viabilidad neuronal pos-SE (Danelon *et al.*, 2016; Montroull *et al.*, 2019) y los astrocitos podrían ser una fuente de BDNF luego del SE. Contrariamente a lo esperado, no observamos cambios en los niveles de BDNF y TrkB.t pos-SE en astrocitos provenientes de CX, HIPO o ST. Este resultado podría deberse a que evaluamos los niveles de BDNF y TrkB.t solo a las 12h pos-SE y los cambios en la expresión pueden haber ocurrido antes, por lo que sería necesario analizar otros tiempos para corroborar si realmente en astrocitos se altera la expresión de neurotrofinas en respuesta al SE.

En resumen, los astrocitos sometidos a un buffer libre de Mg^{2+} , utilizado como modelo de SE produjo cambios en la expresión de GFAP en astrocitos de CX y ST pero no de HIPO y no afectó otros parámetros que se alteran por un SE *in vivo* como la supervivencia, la proliferación y la expresión de neurotrofinas BDNF y su receptor TrkB.t. De acuerdo a estos resultados, los astrocitos parecerían ser poco vulnerables al SE inducido con el buffer libre de Mg^{2+} , al menos en el tiempo pos-SE analizado. Podríamos considerar a esta respuesta como favorable para un contexto celular donde se presenta excitotoxicidad, ya que si los astrocitos mantienen la viabilidad y la proporción numérica con respecto a las neuronas, serán capaces de continuar brindando el soporte funcional a las neuronas sometidas a SE. Por otra parte, los receptores NMDA están poco caracterizados en astrocitos y no se conoce mucho sobre el rol que tienen en astrocitos en respuesta a la eliminación del Mg^{2+} del medio celular. Estos receptores forman parte de una familia que incluye varios subtipos que exhiben especificidad temporal y regional. Existen evidencias que indican que el canal iónico de los receptores NMDA de astrocitos tiene una susceptibilidad limitada al bloqueo por Mg^{2+} (Skowrońska *et al.*, 2019) por lo que la remoción de este ion activaría poco o moderadamente a este receptor. Esto podría explicar la limitada sensibilidad de los astrocitos al buffer libre de Mg^{2+} que observamos en este trabajo. De todas formas, los co-cultivos de astrocitos-neuronas sometidos a SE

mostraron signos de reactividad astrocítica (Danelon et al., 2016; Danelon *et al.*, manuscrito en preparación) lo cual indicaría que las señales necesarias para activar a los astrocitos provienen de las neuronas hiperactivadas por el SE. Las neuronas y los astrocitos mantienen una comunicación bidireccional en condiciones fisiológicas y patológicas (Durkee & Araque, 2019). Durante el SE y la epilepsia se produce un incremento en los niveles de glutamato, K⁺, ATP, entre otros factores, que afectarían al funcionamiento de los astrocitos (Vargas-Sánchez *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

El mecanismo por el cual los astrocitos ejercen un rol neuroprotector durante el SE está lejos de comprenderse por completo. Por ello, es necesario contar con un modelo experimental que nos permita desentrañar el rol que juegan cada uno de los tipos celulares involucrados durante y luego del SE con el fin de entender este fenómeno y encontrar posibles terapias.

Los datos obtenidos en este trabajo nos muestran que *el modelo experimental de SE inducido por el buffer libre de Mg²⁺ tiene un efecto directo moderado sobre la reactividad glial*, al menos en los parámetros evaluados en este trabajo. Sin embargo, el modelo sería de gran utilidad para evaluar el impacto indirecto del SE sobre los astrocitos ya que estos recibirían las señales provenientes de las neuronas hiperactivadas por el desbloqueo de los receptores NMDA.

REFERENCIAS

- Aguado, F., Espinosa-Parrilla, J. F., Carmona, M. A., & Soriano, E. (2002). Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes *in situ*. *Journal of Neuroscience*, 22(21), 9430-9444.
- Avoli, M., & Jefferys, J. G. (2016). Models of drug-induced epileptiform synchronization *in vitro*. *Journal of neuroscience methods*, 260, 26-32.
- Becerra-Calixto, A., & Cardona-Gómez, G. P. (2017). The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: potential in cell therapy. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 88.
- Bergami, M., Santi, S., Formaggio, E., Cagnoli, C., Verderio, C., Blum, R., ... & Canossa, M. (2008). Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *The Journal of cell biology*, 183(2), 213-221.
- Budni, J., Bellettini-Santos, T., Mina, F., Garcez, M. L., & Zugno, A. I. (2015). The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging and disease*, 6(5), 331.
- Bylicky, M. A., Mueller, G. P., & Day, R. M. (2018). Mechanisms of endogenous neuroprotective effects of astrocytes in brain injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
- Campos, G., Fortuna, A., Falcão, A., & Alves, G. (2018). *In vitro* and *in vivo* experimental models employed in the discovery and development of antiepileptic drugs for pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsy research*, 146, 63-86.
- Cavalheiro, E. A. (1995). The pilocarpine model of epilepsy. *The Italian Journal of Neurological Sciences*, 16(1-2), 33-37.
- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., O'Carroll, J. C., Yu, X., ... & Coppola, G. (2017). Neural circuit-specialized astrocytes: transcriptomic, proteomic, morphological, and functional evidence. *Neuron*, 95(3), 531-549.
- Cragolini, AB y Friedman, WJ (2008). La función de p75NTR en glia. *Tendencias en neurociencias*, 31 (2), 99-104.
- Cragolini, A. B., Huang, Y., Gokina, P., & Friedman, W. J. (2009). Nerve growth factor attenuates proliferation of astrocytes via the p75 neurotrophin receptor. *Glia*, 57(13), 1386-1392.
- Cragolini, A. B., Volosin, M., Huang, Y., & Friedman, W. J. (2012). Nerve growth factor induces cell cycle arrest of astrocytes. *Developmental neurobiology*, 72(6), 766-776.
- Cragolini, A. B., Montenegro, G., Friedman, W. J., & Mascó, D. H. (2018). Brain-region specific responses of astrocytes to an *in vitro* injury and neurotrophins. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 88, 240-248.
- Colombo, E., Cordiglieri, C., Melli, G., Newcombe, J., Krumbholz, M., Parada, L. F., ... & Farina, C. (2012). Stimulation of the neurotrophin receptor TrkB on astrocytes drives nitric oxide production and neurodegeneration. *Journal of Experimental Medicine*, 209(3), 521-535.
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S., & Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of neuroscience methods*, 172(2), 143-157.
- Danelon, V. (2016). Participación de la neurotrofina BDNF y proBDNF en los mecanismos de muerte neuronal en un modelo *in vitro* de *Status Epilepticus*. *Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas*
- Danelon, V., Montroull, L. E., Unsain, N., Barker, P. A., & Mascó, D. H. (2016). Calpain-dependent truncated form of TrkB-FL increases in neurodegenerative processes. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 75, 81-92.

Danelon, V., Montroull, L., Vallejo, M., Cabrera, J., Agnese, A., Ortega, M. G., & Mascó, D. (2017). An alkaloid extract obtained from *Phlegmarius Saururus* induces neuroprotection after *status epilepticus*. *Phytomedicine*, *34*, 212-218.

Danelon *et al.*, manuscrito en preparación

Deinhardt, K., & Chao, M. V. (2014). Trk receptors. In *Neurotrophic Factors* (pp. 103-119). Springer, Berlin, Heidelberg.

Ding, S., Fellin, T., Zhu, Y., Lee, S. Y., Auberson, Y. P., Meaney, D. F., ... & Haydon, P. G. (2007). Enhanced astrocytic Ca²⁺ signals contribute to neuronal excitotoxicity after *status epilepticus*. *Journal of Neuroscience*, *27*(40), 10674-10684.

Diniz, D. G., de Oliveira, M. A., de Lima, C. M., Fôro, C. A. R., Sosthenes, M. C. K., Bento-Torres, J., ... & Diniz, C. W. P. (2016). Age, environment, object recognition and morphological diversity of GFAP-immunolabeled astrocytes. *Behavioral and Brain Functions*, *12*(1), 28.

Durkee, C. A., & Araque, A. (2019). Diversity and specificity of astrocyte–neuron communication. *Neuroscience*, *396*, 73-78.

Fang, J., Han, D., Hong, J., Tan, Q., & Tian, Y. (2012). The chemokine, macrophage inflammatory protein-2 γ , reduces the expression of glutamate transporter-1 on astrocytes and increases neuronal sensitivity to glutamate excitotoxicity. *Journal of neuroinflammation*, *9*(1), 267.

Fenner, B. M. (2012). Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine & growth factor reviews*, *23*(1-2), 15-24.

Friedman, W. J. (2000). Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *Journal of Neuroscience*, *20*(17), 6340-6346.

Fujikawa, D. G. (1996). The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced *status epilepticus*. *Brain research*, *725*(1), 11-22.

Fulmer, C. G., VonDran, M. W., Stillman, A. A., Huang, Y., Hempstead, B. L., & Dreyfus, C. F. (2014). Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. *Journal of Neuroscience*, *34*(24), 8186-8196.

Ganev, Y., Plutchak, S., & Tank, P. Epileptic Channels: Dysfunctional Trio of Excitable Cells. *Eukaryon*, 14.

Giachello, C. N. G., Premoselli, F., Montarolo, P. G., & Ghirardi, M. (2013). Pentylentetrazol-induced epileptiform activity affects basal synaptic transmission and short-term plasticity in monosynaptic connections. *PLoS one*, *8*(2).

Gibbons, M. B., Smeal, R. M., Takahashi, D. K., Vargas, J. R., & Wilcox, K. S. (2013). Contributions of astrocytes to epileptogenesis following *status epilepticus*: opportunities for preventive therapy?. *Neurochemistry international*, *63*(7), 660-669.

Gibon, J., & Barker, P. A. (2017). Neurotrophins and proneurotrophins: focus on synaptic activity and plasticity in the brain. *The Neuroscientist*, *23*(6), 587-604.

Grangeiro, M. S., dos Santos, C. C., Borges, J. M. P., dos Santos Sousa, C., Freitas, S., Argolo, D., ... & Costa, S. L. (2019). Neuroprotection during *Neospora caninum* Infection is Related to the Release of Neurotrophic Factors BDNF and NGF. *Journal of Parasitology*, *105*(2), 313-320.

Haim, L. B., & Rowitch, D. H. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(1), 31.

Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(10), 682-696.

- Hayakawa, K., Nakano, T., Irie, K., Higuchi, S., Fujioka, M., Orito, K., ... & Fujiwara, M. (2010). Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30(4), 871-882.
- Hirayama, Y., Ikeda-Matsuo, Y., Notomi, S., Enaida, H., Kinouchi, H., & Koizumi, S. (2015). Astrocyte-mediated ischemic tolerance. *Journal of Neuroscience*, 35(9), 3794-3805.
- Holt, L. M., Hernandez, R. D., Pacheco, N. L., Ceja, B. T., Hossain, M., & Olsen, M. L. (2019). Astrocyte morphogenesis is dependent on BDNF signaling via astrocytic TrkB. T1. *eLife*, 8.
- Hyun, H. W., Min, S. J., & Kim, J. E. (2017). CDK5 inhibitors prevent astroglial apoptosis and reactive astrogliosis by regulating PKA and DRP1 phosphorylations in the rat hippocampus. *Neuroscience research*, 119, 24-37.
- Ishihara, Y., Itoh, K., Oguro, A., Chiba, Y., Ueno, M., Tsuji, M., ... & Yamazaki, T. (2019). Neuroprotective activation of astrocytes by methylmercury exposure in the inferior colliculus. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Jerónimo-Santos, A., Vaz, S. H., Parreira, S., Rapaz-Lérias, S., Caetano, A. P., Buée-Scherrer, V., ... & Diógenes, M. J. (2015). Dysregulation of TrkB receptors and BDNF function by amyloid- β peptide is mediated by calpain. *Cerebral Cortex*, 25(9), 3107-3121.
- Kenchappa, R. S., Tep, C., Korade, Z., Urra, S., Bronfman, F. C., Yoon, S. O., & Carter, B. D. (2010). p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor- α -converting enzyme/ADAM17. *Journal of Biological Chemistry*, 285(26), 20358-20368.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R. A., & Verkhratsky, A. (2006). NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 26(10), 2673-2683.
- Luo, G., Huang, Y., Jia, B., Zhang, X., Mo, D., Ma, N., ... & Miao, Z. (2018). Quetiapine prevents A β 25–35-induced cell death in cultured neuron by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from astrocyte. *Neuroreport*, 29(2), 92-98.
- Meeker, R., & Williams, K. (2014). Dynamic nature of the p75 neurotrophin receptor in response to injury and disease. *Journal of neuroimmune pharmacology*, 9(5), 615-628.
- Mikroulis, A., Lisgaras, C. P., & Psarropoulou, C. (2018). Immature *Status Epilepticus*: *In Vitro* Models Reveal Differences in Cholinergic Control and HFO Properties of Adult CA3 Interictal Discharges in Temporal vs Septal Hippocampus. *Neuroscience*, 369, 386-398.
- Montroull, L. E., Danelon, V., Cragolini, A. B., & Mascó, D. H. (2019). Loss of TrkB Signaling Due to *Status Epilepticus* Induces a proBDNF-Dependent Cell Death. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 4.
- Naskar, S., & Chattarji, S. (2019). Stress elicits contrasting effects on the structure and number of astrocytes in the amygdala versus hippocampus. *eNeuro*, 6(1).
- Niquet, J., Ben-Ari, Y., & Represa, A. (1994). Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells. *Journal of neurocytology*, 23(10), 641-656.
- Oderfeld-Nowak, B., Zaremba, M., Kwiatkowska-Patzer, B., Lipkowski, A. W., Kurkowska-Jastrzebska, I., Triaca, V., & Aloe, L. (2009). NG2 positive cells of rat spinal cord activated during experimental autoimmune encephalomyelitis are spatially associated with radially oriented astroglia and express p75 receptor: a role for nerve growth factor in oligodendrocyte progenitor migration. *Arch Ital Biol*, 147(4), 105-115.

- Ohira, K., Kumanogoh, H., Sahara, Y., Homma, K. J., Hirai, H., Nakamura, S., & Hayashi, M. (2005). A truncated tropo-myosine-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *Journal of Neuroscience*, *25*(6), 1343-1353.
- Ohira, K., Funatsu, N., Homma, K. J., Sahara, Y., Hayashi, M., Kaneko, T., & Nakamura, S. (2007). Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. *European Journal of Neuroscience*, *25*(2), 406-416.
- Palygin, O., Lalo, U., & Pankratov, Y. (2011). Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *British journal of pharmacology*, *163*(8), 1755-1766.
- Park, J. Y., & Kang, T. C. (2018). The differential roles of PEA15 phosphorylations in reactive astrogliosis and astroglial apoptosis following *status epilepticus*. *Neuroscience research*, *137*, 11-22.
- Pekny, M., & Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological reviews*, *94*(4), 1077-1098.
- Pezet, S., & McMahon, S. B. (2006). Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu. Rev. Neurosci.*, *29*, 507-538.
- Rose, C. R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K. W., & Konnerth, A. (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature*, *426*(6962), 74-78.
- Rubio, N. (1997). Mouse astrocytes store and deliver brain-derived neurotrophic factor using the non-catalytic gp95trkB receptor. *European Journal of Neuroscience*, *9*(9), 1847-1853.
- Saba, J., Turati, J., Ramírez, D., Carniglia, L., Durand, D., Lasaga, M., & Caruso, C. (2018). Astrocyte truncated tropomyosin receptor kinase B mediates brain-derived neurotrophic factor anti-apoptotic effect leading to neuroprotection. *Journal of neurochemistry*, *146*(6), 686-702.
- Sarac, S., Afzal, S., Broholm, H., Madsen, F. F., Ploug, T., & Laursen, H. (2009). Excitatory amino acid transporters EAAT-1 and EAAT-2 in temporal lobe and hippocampus in intractable temporal lobe epilepsy. *Apmis*, *117*(4), 291-301.
- Schachtrup, C., Ryu, J. K., Mammadzada, K., Khan, A. S., Carlton, P. M., Perez, A., ... & Rafalski, V. (2015). Nuclear pore complex remodeling by p75 NTR cleavage controls TGF- β signaling and astrocyte functions. *Nature neuroscience*, *18*(8), 1077-1080.
- Schiweck, J., Eickholt, B. J., & Murk, K. (2018). Important shapeshifter: mechanisms allowing astrocytes to respond to the changing nervous system during development, injury and disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, *12*, 261.
- Scuderi, C., Stecca, C., Iacomino, A., & Steardo, L. (2013). Role of astrocytes in major neurological disorders: the evidence and implications. *IUBMB life*, *65*(12), 957-961.
- Skowrońska, K., Obara-Michlewska, M., Zielińska, M., & Albrecht, J. (2019). NMDA receptors in astrocytes: In search for roles in neurotransmission and astrocytic homeostasis. *International journal of molecular sciences*, *20*(2), 309.
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences*, *32*(12), 638-647.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, *119*(1), 7-35.
- Sofroniew, M. V. (2015). Astrogliosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *7*(2), a020420.
- Sombati, S. O. M. P. O. N. G., & Delorenzo, R. J. (1995). Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture. *Journal of neurophysiology*, *73*(4), 1706-1711.

- Sun, D., & Jakobs, T. C. (2012). Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *The Neuroscientist*, 18(6), 567-588.
- Tanaka, K. I., Sato, T., Ohnishi, Y., & Nishikawa, T. (2006). Hydrogen peroxide-induced thymidine incorporation into cultured rat astrocytes. *Journal of pharmacological sciences*, 102(3), 296-304.
- Unsain, N., Nuñez, N., Anastasía, A., & Mascó, D. H. (2008). *Status epilepticus* induces a TrkB to p75 neurotrophin receptor switch and increases brain-derived neurotrophic factor interaction with p75 neurotrophin receptor: an initial event in neuronal injury induction. *Neuroscience*, 154(3), 978-993.
- Vargas-Sánchez, K., Mogilevskaya, M., Rodríguez-Pérez, J., Rubiano, M. G., Javela, J. J., & González-Reyes, R. E. (2018). Astroglial role in the pathophysiology of *status epilepticus*: an overview. *Oncotarget*, 9(42), 26954.
- Vidaurre, Ó. G., Gascón, S., Deogracias, R., Sobrado, M., Cuadrado, E., Montaner, J., ... & Díaz-Guerra, M. (2012). Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity. *Cell death & disease*, 3(1), e256-e256.
- Vignoli, B., Battistini, G., Melani, R., Blum, R., Santi, S., Berardi, N., & Canossa, M. (2016). Peri-synaptic glia recycles brain-derived neurotrophic factor for LTP stabilization and memory retention. *Neuron*, 92(4), 873-887.
- Volosin, M., Song, W., Almeida, R. D., Kaplan, D. R., Hempstead, B. L., & Friedman, W. J. (2006). Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *Journal of Neuroscience*, 26(29), 7756-7766.
- Volosin, M., Trotter, C., Cragolini, A., Kenchappa, R. S., Light, M., Hempstead, B. L., ... & Friedman, W. J. (2008). Induction of proneurotrophins and activation of p75NTR-mediated apoptosis via neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures. *Journal of neuroscience*, 28(39), 9870-9879.
- Yang, H., Feng, G. D., Olivera, C., Jiao, X. Y., Vitale, A., Gong, J., & You, S. W. (2012). Sonic hedgehog released from scratch-injured astrocytes is a key signal necessary but not sufficient for the astrocyte de-differentiation. *Stem cell research*, 9(2), 156-166.
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *Journal of neuroscience*, 32(18), 6391-6410.