



**Universidad Nacional de Córdoba**  
**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**

Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga

**Comunicación entre astrocitos y neuronas en un modelo  
de *Status epilepticus in vitro***

**Tesinista:** Bonevardi Revol Camila Antonella

Firma:

**Directora:** Dra. Cagnolini Andrea Beatriz

Firma:

**Co-directora:** Dra. Franchi Nilda Anahí

Firma:

AÑO 2022

Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado durante mi camino de formación para obtener mi Título de Grado.

En primer lugar a mi familia, Gladys, mi mamá, Agustina, mi hermana y Juan, por ser el pilar durante toda mi educación desde pequeña, por la contención y la motivación cuando fue necesario, así como las alegrías que se fueron dando.

A mis compañeros de la Facultad, Mica, Lucas, Franquito, Lourdes, Cande y Pachu, por todas las clases compartidas, los trabajos en grupo, las juntadas y su amistad.

A mi novio, Francisco, por acompañarme en este proceso de finalización y su amor.

A mi profesora de Biología de la secundaria, Alicia Córdoba, quién me inspiró a estudiar la carrera.

A mi directora Andrea, por la paciencia para enseñarme todo lo que hoy sé sobre el manejo en un laboratorio y por estar siempre que necesité su ayuda. Así como también a mi co-directora, Anahí quien también me impartió sus conocimientos y calidez.

A Franco Mir, por ser un profesor que te inspira y motiva a continuar en esta hermosa carrera.

A Emanuel y Nora, quienes también estuvieron presentes.

A Terry, Samantha, Tiger, Berliz, Homero, Mandioca y Luli, mis mascotas, no menos importante, acompañándome en cada jornada de estudio.

Al CEBICEM, por el espacio para estar presente y aprender durante más de tres años.

A Marcelo Ceballos, por darme lugar a formar parte de su equipo y el tiempo, para finalizar mis estudios.

A la FCEFyN- UNC, universidad pública y gratuita, institución que permitió mi formación, de lo contrario no fuera posible.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
Palabras clave: .....	1
SUMMARY .....	2
Keywords: .....	2
ABREVIATURAS .....	3
INTRODUCCIÓN .....	5
Astrocitos y reactividad astrocitaria .....	5
Epilepsia y <i>Status epilepticus</i> .....	7
Modelos de <i>Status epiléptico</i> .....	8
Neurotrofinas y sus receptores .....	9
Rol de las neurotrofinas en la comunicación astrocitos-neuronas en el cerebro sometido a <i>Status epilepticus</i> . .....	12
Vesículas extracelulares como mediadoras de la comunicación intercelular .....	14
Composición de las vesículas extracelulares .....	15
Comunicación intercelular mediada por vesículas extracelulares.....	16
OBJETIVOS .....	19
Objetivos específicos.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Revisión bibliográfica .....	21
Cultivos primarios .....	22
Cultivo y diferenciación de células PC12 .....	23
Liberación y aislamiento de vesículas extracelulares astrocíticas .....	23
Obtención de homogenatos celulares .....	24
Caracterización de vesículas extracelulares .....	24
· Western blot y dot blot .....	24
· Ensayo de unión de VEA a neuronas hipocampales y células PC12 e inmunocitoquímica .....	26
Análisis Estadístico .....	27
RESULTADOS.....	28
Revisión de mecanismos de comunicación astrocitos-neuronas en el contexto del <i>Status Epilepticus</i> .....	28

¿Cuáles son las ventajas y las limitaciones de los modelos experimentales disponibles para estudiar la comunicación astrocitos-neuronas en la neurodegeneración inducida por SE?....	28
¿El desbalance en la expresión de receptores de neurotrofinas puede explicar la muerte neuronal inducida por SE? .....	37
¿Qué rol cumplen las neurotrofinas en la comunicación astrocitos-neuronas en en la neurodegeneración inducida por SE? .....	41
¿Qué rol cumplen las VE en la comunicación astrocitos-neuronas en condiciones patológicas? .....	43
¿De qué forma las VE liberadas por astrocitos podrían regular la expresión de neurotrofinas en neuronas? .....	45
Caracterización de vesículas extracelulares de astrocitos .....	48
1. Los astrocitos liberan VE que exhiben características de exosomas .....	48
2. Los astrocitos y las VEA expresan marcadores de VE .....	50
3. Interacción de VEA con células neuronales .....	52
4. Las vesículas de astrocitos interactúan con neuronas hipocampales .....	53
DISCUSIÓN.....	55
Perspectivas sobre mecanismos de neuroprotección pos-SE y estrategias de diagnóstico .....	61
Conclusión .....	64
ANEXO .....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	72

## RESUMEN

Los astrocitos cumplen un rol fundamental en situaciones de daño en el sistema nervioso central. Particularmente, el *Status epilepticus* (SE) provoca reactividad astrocitaria induciendo la liberación de una gran variedad de sustancias. Estas afectan la comunicación entre neuronas y astrocitos resultando en señales neuroprotectoras o perjudiciales para el entorno. En esta tesina propusimos realizar una revisión exhaustiva de las publicaciones existentes sobre la comunicación entre astrocitos y neuronas luego del SE y los modelos experimentales que permiten estudiarlo. En especial, describimos el rol de las neurotrofinas y sus receptores ya que son moléculas señalizadoras que sufren alteraciones en los niveles de expresión pos-SE y pueden tener un rol dual en la neuroprotección y la epileptogénesis dependiendo del contexto celular.

Otros mediadores de la comunicación entre astrocitos y neuronas en condiciones fisiológicas y patológicas incluyen a las vesículas extracelulares (VE). Estas contienen y transportan diversos componentes incluidos ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, constituyendo un novedoso mecanismo de comunicación intercelular mediante la transferencia de moléculas y con un gran potencial terapéutico. En esta tesina se pudo demostrar experimentalmente que los astrocitos en cultivo liberan VE y estas expresan proteínas que permiten identificar su origen celular. Estos resultados nos permitirán en el futuro caracterizar las VE provenientes específicamente de estas células gliales a partir de cultivos mixtos o de modelos *in vivo* de neurodegeneración.

**Palabras clave:** Sistema nervioso, astrocitos, neuronas, *status epilepticus*, epilepsia, neuroprotección, neurodegeneración, astrogliosis, neurotrofinas, vesículas extracelulares, comunicación, modelos epilépticos.

## SUMMARY

Astrocytes play a fundamental role after central nervous system damage. Particularly, Status epilepticus (SE) causes astrocyte reactivity inducing the release of a variety of molecules. These affect the communication between neurons and astrocytes resulting in neuroprotective or detrimental signals for the surrounding cells. In this work we performed a comprehensive review of the existing publications on the communication between astrocytes and neurons after SE and the experimental models that allow us to study it. In particular, we describe the role of neurotrophins and their receptors as signaling molecules that undergo changes in the expression levels post-SE and may have a dual role in neuroprotection and epileptogenesis depending on the cellular context.

Other mediators of communication between astrocytes and neurons under physiological and pathological conditions include extracellular vesicles (EVs). These contain and transport diverse components including nucleic acids, lipids and proteins, constituting a novel mechanism of intercellular communication through the transfer of molecules and with great therapeutic potential. In this work we were also able to demonstrate experimentally that astrocytes in culture release EVs and express proteins that allow us to identify their cellular origin. These results will allow us to characterize astrocytic EVs obtained from mixed cultures or *in vivo* models of neurodegeneration.

**Keywords:** Nervous system, astrocytes, neurons, *status epilepticus*, epilepsy, neuroprotection, neurodegeneration, astrogliosis, neurotrophins, extracellular vesicles, communication, epileptic models.

## ABREVIATURAS

**BDNF**, Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro

**CX**, Corteza

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

**DMEM**, Medio de dulbecco modificado del de Eagle

**FBS**, Suero fetal bovino

**FGF**, Factor de crecimiento de fibroblastos

**GABA**, Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GDNF**, Factor neurotrófico derivado de la glía

**GFAP**, Proteína ácida fibrilar glial

**Hipo**, Hipocampo

**HS**, Suero de caballo

**NGF**, Factor de Crecimiento Nervioso

**NMDA**, N-Metil-D-Aspartato

**NMDAr**, Receptor ionotrópico de N-Metil-D-Aspartato

**p75NTR**, Receptor de Neurotrofinas p75

**PBS (buffer)**, Solución buffer fosfato salino

**PC**, Precondicionamiento

**proNT**, pro-Neurotrofina

**RIPA (Buffer)**, Solución de radio inmunoprecipitación,

**SE**, *Status epilepticus*

**SNC**, Sistema Nervioso Central

**ST**, Cuerpo estriado

**TBS-T**, de las siglas en inglés “tris buffered saline with tween”



**TEM**, Microscopía electrónica de transmisión

**TGF- $\beta$** , factor de crecimiento transformante beta

**TLE**, Epilepsia en el lóbulo temporal

**TNFRS**, Super familia de receptores de factores de necrosis tumoral,

**Trk**, Receptores de membrana de tipo tropomiosina relacionados a quinasas o también, receptor tirosin quinasa

**TrkB-FL**, Receptores de membrana de tipo tropomiosina relacionados a quinasas Trk “full length” tipo B

**TrkB-TC**, Truncado de TrkB producto del procesamiento enzimático del TrkB

**TrkB-T1**, Receptores de membrana de tipo tropomiosina relacionados a quinasas truncados

**VE**, Vesículas extracelulares

**VEA**, Vesículas extracelulares derivadas de astrocitos

**VEGF**, Factor de crecimiento endotelial vascular

**WB**, Western blot

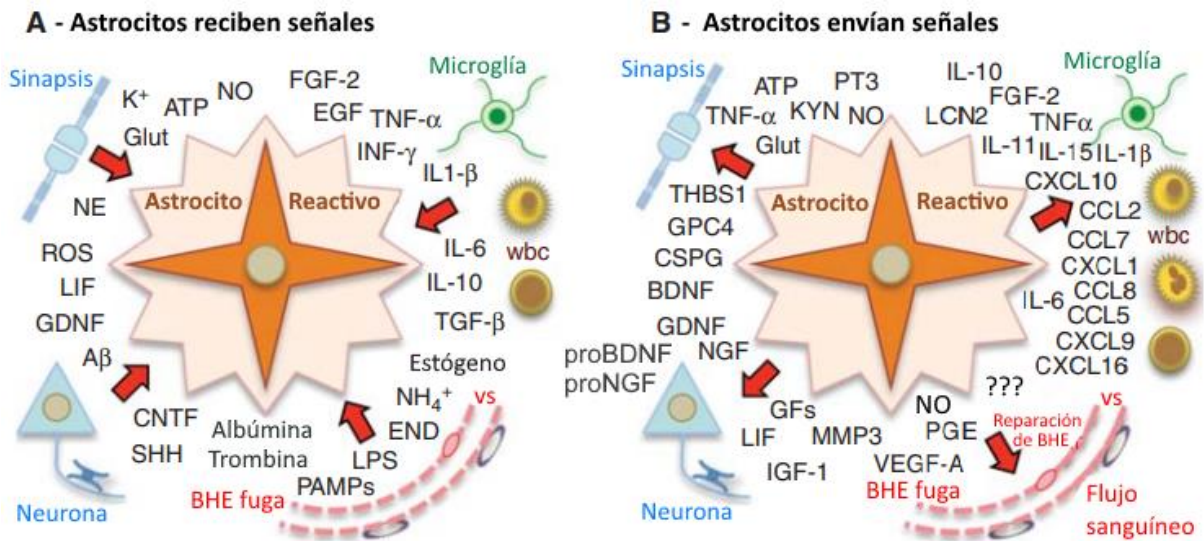
# INTRODUCCIÓN

## **Astroцитos y reactividad astrocitaria**

Los astrocitos constituyen una población heterogénea de células gliales que se encuentran en todo el **sistema nervioso central (SNC)** y llevan a cabo numerosas funciones para mantener la homeostasis. Las neuronas, difícilmente podrían cumplir con sus funciones sin el sustento provisto por los astrocitos ya que estas células participan en el desarrollo del SNC, la formación de las sinapsis, la propagación de los potenciales de acción, la recaptación de neurotransmisores, aportan sustratos energéticos, entre otros roles. Los astrocitos liberan diversos gliotransmisores, tales como ATP, glutamato, D-serina, citoquinas y ácido gamma-aminobutírico (GABA) en las proximidades de las sinapsis los cuales tienen importantes repercusiones en la neurotransmisión<sup>1</sup>. Además, modulan las concentraciones extracelulares de  $K^+$  y  $Ca^{+2}$ , siendo este último uno de los factores clave que regula la señalización intracelular en los astrocitos<sup>2</sup>. Otro aspecto característico de las membranas astrocíticas es su enriquecimiento con **transportadores de glutamato y GABA** que captan a estos neurotransmisores del espacio extracelular después de la actividad neuronal<sup>2,3</sup>. De esta manera, los astrocitos pueden **modular la actividad neuronal** y, a su vez, las neuronas ejercen cambios funcionales en los astrocitos, como modificaciones en la expresión génica, liberación de gliotransmisores y señales de calcio intracelular<sup>4</sup>.

Además, los astrocitos responden a todas las formas de daño y a las patologías que afectan al SNC con cambios morfo-funcionales que comúnmente se denominan **astrogliosis reactiva**. Este proceso involucra un programa de cambios a nivel transcripcional, bioquímicos, morfológicos, metabólicos y fisiológicos los cuales resultan en una ganancia o pérdida de funciones, altera la homeostasis celular<sup>1</sup> y consecuentemente, puede producir un impacto benéfico o perjudicial sobre las células de su entorno<sup>2</sup>. Estos cambios pueden inducir, hipertrofia celular, proliferación, migración y alteraciones en la expresión de gran cantidad de genes<sup>3</sup>. Los astrocitos reactivos presentan un aumento de la expresión de la **proteína ácida fibrilar glial (GFAP)** y liberan diversas moléculas, incluidas citoquinas inflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y neurotróficos, péptidos, hormonas, etc (**Figura 1**). Además, se observa una reducción en la expresión de los transportadores de glutamato gliales, un deterioro de la defensa antioxidante y puede afectarse la maquinaria sináptica, la homeostasis de los neurotransmisores

y las funciones neuroprotectoras<sup>5-7</sup>. Estas respuestas no se manifiestan todas al mismo tiempo ni en un mismo astrocito sino que se activan en distintos subtipos de astrocitos reactivos en respuesta a condiciones patológicas específicas. Hasta el momento, se han descrito al menos dos fenotipos principales de astrocitos reactivos, **A1** y **A2**. Si bien se acepta que existe una serie de estados de activación intermedios, se ha asociado al fenotipo A1 con las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento, mientras que el tipo A2 con un fenotipo con características neuroprotectoras<sup>1,8,9</sup>. Debido a su rol en el mantenimiento de la homeostasis en contextos fisiológicos y patológicos, los astrocitos representan un blanco ideal para el estudio de muchas condiciones patológicas, entre ellas, el *Status epilepticus*.



**Fig 1. Los astrocitos reactivos reciben y envían señales moleculares.** El gráfico muestra diversas señales moleculares que reciben los astrocitos reactivos (A), o aquellas que los astrocitos reactivos liberan y afectan a otras células (B). Abreviaciones: Adenosín trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), glutamato (Glut), noradrenalina (NE), especies reactivas del oxígeno (ROS), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), amiloide-β (Aβ), factor neurotrófico ciliar (CNTF), Sonic Hedgehog (SHH), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), lipopolisacáridos (LPS), endotelina (END), amonio (NH<sup>4+</sup>), factor de crecimiento transformante (TGF), interleucina (IL), interferón (INF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), ácido cinúrico (KYN), pentraxina (PT), trombospondina (THBS), factor de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento (GFs), metaloproteína de matriz 3 (MMP3), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A), prostaglandina E (PGE), quimiocina (CXCL-CCL), lipocalina (LCN), glóbulos blancos (wbc), vaso sanguíneo (vs), barrera hematoencefálica (BHE). *Imagen modificada de Sofroniew, 2015*<sup>10</sup>.

## **Epilepsia y *Status epilepticus***

La **epilepsia** es una neuropatología que afecta a más de 70 millones de personas en todo el mundo y tiene numerosas consecuencias sociales, conductuales y sanitarias. Esta enfermedad se caracteriza por la ocurrencia de dos o más convulsiones espontáneas con más de 24 horas de diferencia, o una convulsión espontánea en un individuo que tiene un 60% de riesgo de tener otra crisis en los próximos 10 años. En tanto que la convulsión se define como una actividad neuronal sincronizada anormal (**o hiperactivación**) en el cerebro que causa signos y síntomas transitorios en el cerebro<sup>11</sup>. Cuando los mecanismos de iniciación o terminación fallan y las convulsiones se prolongan anormalmente, estamos en presencia de un ***Status Epilepticus* (SE)**.

La génesis y el mantenimiento del **SE** se correlacionan con una reducción en la inhibición sináptica mediada por el receptor GABA-érgico **GABA<sub>A</sub>**<sup>12,13</sup>. La neurotransmisión excitatoria mediada por los receptores glutamatérgicos **NMDA** (N-metil-D-aspartato) y **AMPA** ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolepropionico) también tienen un rol protagónico en el **SE**<sup>14</sup>, al igual que la participación de los neurotransmisores aspartato y acetilcolina<sup>15</sup>.

El **SE** puede tener consecuencias a largo plazo que incluyen el daño o la muerte neuronal y la alteración de las redes neuronales lo cual depende del tipo y duración de las convulsiones<sup>16</sup>. El **daño neuronal** ocurre por la activación de los receptores glutamatérgicos NMDA y no-NMDA que abren canales permeables al  $Ca^{+2}$ . Este ion juega un rol fundamental en el daño neuronal causado por el **SE**, ya que activa enzimas que degradan proteínas, membranas y ácidos nucleicos<sup>17</sup>. El daño producido por los aminoácidos excitatorios se denomina **excitotoxicidad**. Debido a que el **glutamato** es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC de mamíferos, usualmente el término excitotoxicidad se refiere a la muerte de neuronas que surge de la exposición prolongada al glutamato y el influjo excesivo de iones al interior celular<sup>18</sup>.

Al igual que la mayoría de las neuropatologías, el **SE** causa una marcada activación de astrocitos y modificaciones en la expresión de **neurotrofinas** y sus receptores, tal como desarrollaremos más adelante. Por estas características, el **SE** también es usado en neurociencias como un modelo para investigar procesos degenerativos e inflamatorios en el SNC. Si bien el **SE** causa neurodegeneración en diferentes áreas del SNC, ocurre de manera más notable en

subpoblaciones del hipocampo y la corteza entorrinal<sup>19-21</sup>, por esto la mayor parte de los trabajos que se revisan en esta tesina se refieren a estas áreas del cerebro.

## **Modelos de *Status epilepticus***

La multiplicidad de causas que desencadenan las convulsiones, el SE y la epilepsia en humanos, dificulta el análisis de los mecanismos que subyacen a estas condiciones, por ello es necesario desarrollar modelos adecuados que permitan estudiarlas<sup>22</sup> **¿A qué nos referimos cuando hablamos de modelo?** Este término se emplea en el lenguaje cotidiano con diversos significados, a veces nos referimos a un objeto o un evento, y otras veces a la representación simbólica de una entidad real. Sin embargo, esta representación simbólica sólo captura algunos elementos centrales a fin de un entendimiento y manipulación más sencilla de aquello que se está modelando<sup>23</sup>. Debido a esta limitación, se puede afirmar que todos los modelos son erróneos pero algunos son útiles<sup>24</sup>.

Los **modelos experimentales de una patología** sirven para investigar un proceso implicado en enfermedades humanas o en especies de interés humano y para evaluar y seleccionar fármacos que afectan ese proceso. En neurociencias, gran parte de los modelos involucran el uso de animales en los cuales una patología es lo suficientemente similar a la que ocurre en humanos y sucede de manera natural o inducida<sup>25</sup>.

Se han desarrollado numerosos modelos para estudiar al SE y la comunicación astrocitos-neuronas en este contexto y varían principalmente en la forma en que se induce el SE. En esta tesina y para un mayor entendimiento clasificaremos los distintos modelos en dos grandes grupos:

1) **Modelos *in vitro***, incluyen ensayos que se realizan bajo condiciones controladas pero fuera del cuerpo de un organismo vivo (ej: órganos, tejidos, células) y que permiten reproducir características principales del SE, como por ejemplo, la hiperactivación neuronal.

2) **Modelos *in vivo* de *Status Epilepticus***, ensayos que tienen lugar dentro del organismo vivo. A su vez, podemos subdividirlos en tres subcategorías:

- a) **Inducción farmacológica del *Status Epilepticus***: animales sometidos al tratamiento con fármacos inductores de SE.
- b) **Inducción no farmacológica del *Status Epilepticus***, incluye a todos aquellos métodos que utilizan estrategias no farmacológicas, tales como electroestimulación, fiebre, traumas, etc.
- c) **Organismos genéticamente modificados (OGM)**, animales cuyo contenido genético ha sido modificado aplicando técnicas de ingeniería genética para inducir SE de manera espontánea o no.

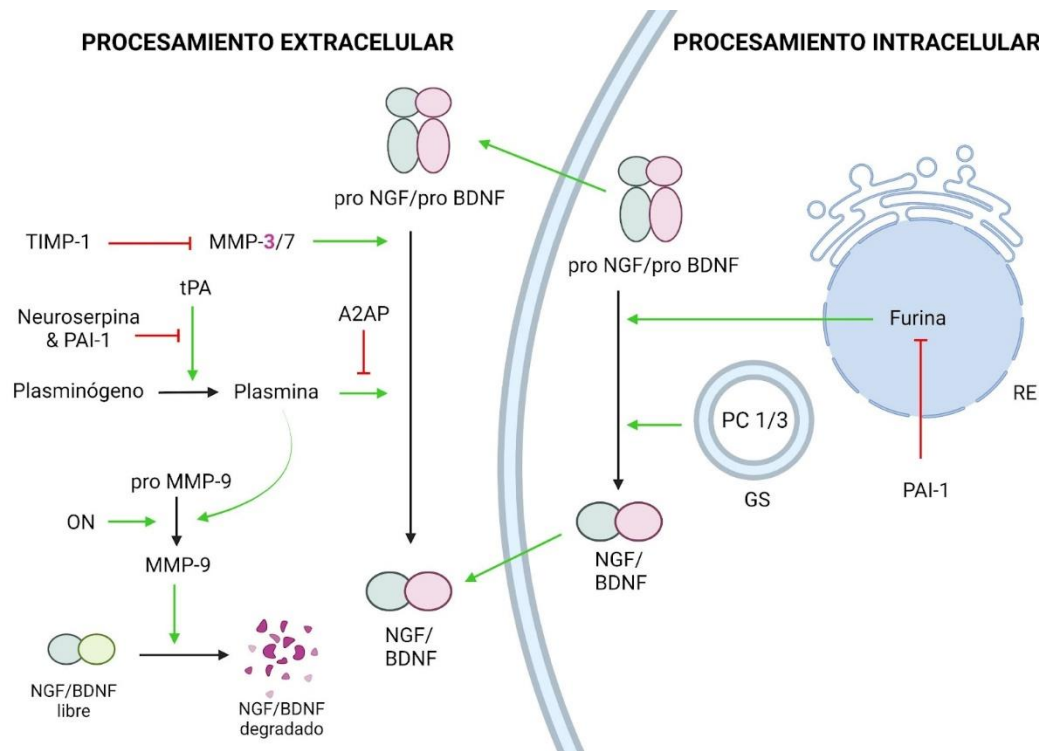
No obstante, el avance de diferentes técnicas y herramientas, entre ellas la bioinformática, ha permitido el desarrollo de otros modelos. Entre ellos, los **Modelos computacionales** o también conocidos como **Modelos *in silico***, en los cuales las interacciones entre los componentes de un sistema biológico se describen a través de modelos matemáticos y computarizados. De esta manera se codifican y prueban hipótesis sobre los mecanismos que subyacen a la función de las células, la patogénesis, la fisiopatología de las enfermedades y contribuyen al estudio de fármacos<sup>26</sup>.

## **Neurotrofinas y sus receptores**

Debido al fuerte impacto que las neurotrofinas tienen sobre la supervivencia celular y la función de las sinapsis, han sido postuladas como responsables de diferentes aspectos del **SE** y de sus consecuencias. Las **neurotrofinas** son polipéptidos responsables de numerosas funciones en el SNC: afectan el crecimiento y la supervivencia celular, guían a los axones y dendritas, modifican conexiones sinápticas, participan en la potenciación a largo plazo (LTP) en la plasticidad sináptica, entre otras funciones.

Dentro de la familia de las neurotrofinas, las cuatro neurotrofinas mejor estudiadas en mamíferos son el factor de crecimiento nervioso (**NGF**), el factor neurotrófico derivado de cerebro (**BDNF**), neurotrofina-3 (**NT-3**) y neurotrofina-4/5 (**NT-4/5**). Se sintetizan como proteínas precursoras (**pre-pro-neurotrofina**) en el retículo endoplásmico y se transportan al aparato de Golgi como **pro-Neurotrofina**. Las neurotrofinas maduras se pueden producir

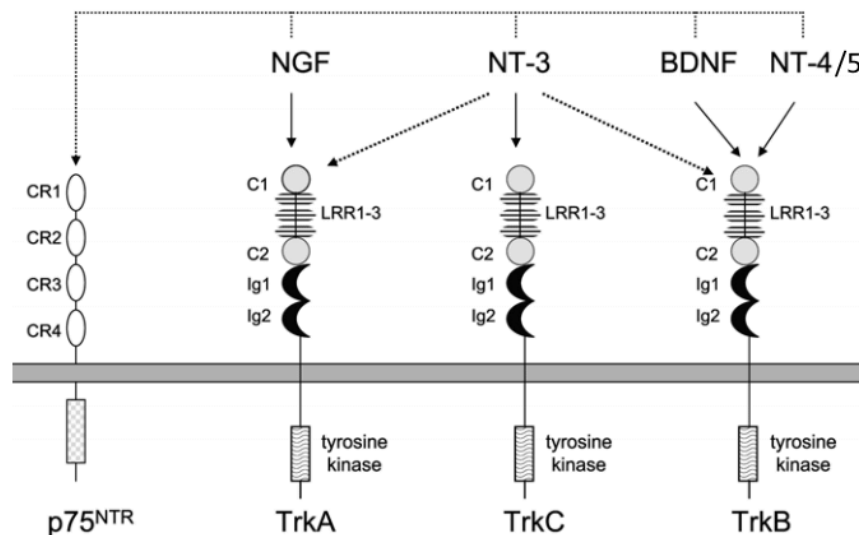
intracelularmente por escisión de la región “pro” de las pro-neurotrofinas lo cual es mediado por las enzimas **furina** o por la **convertasa** que se encuentra en gránulos secretores inmaduros. Las pro-Neurotrofinas también pueden ser procesadas extracelularmente mediante **metaloproteinasas** de la matriz o mediante componentes de la cascada proteolítica que involucran al **activador tisular del plasminógeno/plasmina (tPA/plasmina)** (Figura 2)<sup>27-32</sup>.



**Fig. 2. Representación esquemática de las diferentes proteínas involucradas en la escisión de NGF y BDNF a través de mecanismos extracelulares e intracelulares.** Tanto el proNGF como el proBDNF se puede escindir intracelularmente dentro del retículo endoplásmico (RE) por furina y en gránulos secretores (GS) derivados del aparato de Golgi por enzimas proconvertasa (PC1/3). A su vez, las pro-neurotrofinas pueden escindirse extracelularmente por mediante metaloproteinasas (MMP). proNGF es escindido por MMP-7, mientras que BDNF también es escindido por MMP-3 (violeta) adicionalmente. Por otro lado, las proNT son metabolizadas mediante componentes de la cascada proteolítica de tPA/plasmina. La actividad de estas proteasas está estrictamente regulada por varios inhibidores, incluido PAI-1, que inhibe la escisión tanto extracelular como intracelular; inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1), que inhibe las MMP; y neuroserpina y  $\alpha$ 2-antiplasmin (A2AP), que inhiben la cascada proteolítica de tPA/plasmina. Las proNT se unen con alta afinidad al receptor p75<sup>NTR</sup> que media principalmente la vía de muerte celular mientras que las NT maduras se unen con baja afinidad. NGF también puede unirse a TrkA y BDNF a TrkB, ambos complejos ligando receptor median respuestas como la supervivencia, diferenciación celular y plasticidad sináptica. ProMMP-9 es escindido por plasmina u óxido nítrico (ON) a MMP-9, que degrada rápidamente el NGF o BDNF libre y no unido. Las barras rojas indican inhibición y las barras verdes indican activación<sup>33-35</sup>.

Las neurotrofinas actúan a través de dos tipos de receptores: un receptor tirosina quinasa llamado Trk de alta afinidad y selectividad por alguna neurotrofina y un receptor de baja

afinidad y selectividad llamado  $p75^{NTR}$ <sup>36,37</sup>. Dentro de los **receptores Trk** existen tres tipos con gran homología entre sí, los cuales presentan especificidad de unión a las diferentes neurotrofinas: NGF se une preferentemente a **TrkA**, BDNF y NT-4/5 muestran mayor afinidad por **TrkB** y NT-3 activa predominantemente a **TrkC**, aunque también puede unirse a TrkB y TrkA pero con una menor afinidad (**Figura 3**). En cuanto a sus funciones, podemos afirmar que las neurotrofinas regulan el desarrollo y el trofismo general del SN de los vertebrados, las cuales están mediadas principalmente por los receptores Trk. Estos receptores median sus funciones luego de formar homodímeros de Trk o heterodímeros con  $p75^{NTR}$ . En células que expresan ambos receptores se establecen interacciones físicas y funcionales entre ellos que alteran la señalización de cada uno de estos receptores y pueden mediar respuestas muy diferentes, incluso opuestas<sup>38</sup>.



**Fig 3. Neurotrofinas y sus receptores.** Las neurotrofinas presentan interacciones específicas con los tres receptores Trk: El NGF se une a TrkA, el BDNF y el NT-4 se unen a TrkB, y el NT-3 se une a TrkC. En algunos contextos celulares, la NT-3 también puede activar TrkA y TrkB, aunque con menor eficacia. Todas las pro-neurotrofinas y neurotrofinas se unen a  $p75^{NTR}$  y lo activan. *Imagen tomada y modificada de Skaper, 2018*<sup>39</sup>.

Adicionalmente, para los receptores TrkB y TrkC se han identificado **varias isoformas** que carecen de actividad tirosina quinasa y se generan por *splicing* alternativo. La estructura proteica de estas isoformas son conservadas entre las especies y se expresan en niveles altos en el SNC<sup>40</sup>. Para el receptor **TrkB** se conocen al menos 4 isoformas: la forma completa o “*full length*” (**TrkB-FL**), que contiene el dominio tirosina quinasa y dos truncadas (**TrkB-T1 y T2**),



carentes del dominio tirosin quinasa. Recientemente, además se ha descrito otra isoforma truncada, **TrkB-TC**, que es producto del procesamiento enzimático del TrkB-FL, sin embargo, poco se conoce sobre sus funciones fisiológicas<sup>41-44</sup>. Entre las funciones que se asocian a las isoformas truncadas, están: a) la dominancia negativa (con respecto al TrkB-FL), ya que “secuestraría” a **BDNF** limitando la activación de TrkB-FL y la señalización activada por la tirosina quinasa, b) incrementos en la **[Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>** en astrocitos y, c) modificaciones en la morfología de filopodios<sup>40</sup>.

El receptor **p75<sup>NTR</sup>** integra la familia de receptores del factor de necrosis tumoral. Es considerado un receptor promiscuo que presenta igual afinidad para todas las neurotrofinas maduras y mayor afinidad por las pro-neurotrofinas. **P75<sup>NTR</sup>** forma complejos con otros co-receptores, incluyendo a los Trks. El tipo de co-receptor y las proteínas que se asocian a su dominio intracelular luego de la unión del ligando va a determinar las funciones que media **p75<sup>NTR</sup>**, las cuales incluyen supervivencia, apoptosis, crecimiento axonal, etc. La función más reportada para **p75<sup>NTR</sup>** es la **apoptosis neuronal**, particularmente en respuesta a pro-neurotrofinas e involucra la interacción con **sortilina** que actúa como co-receptor<sup>38</sup>. Un ejemplo es el **proBDNF** que provoca efectos opuestos a los del BDNF a través de la unión del **p75<sup>NTR</sup>** y del co-receptor sortilina. La vía de señalización **BDNF/TrkB** media la supervivencia y el crecimiento neuronal, mientras que la vía de señalización **proBDNF/p75<sup>NTR</sup>/sortilina** puede inducir la apoptosis neuronal, el colapso de las neuritas y la inhibición de la neurogénesis<sup>22,45-47</sup>.

### **Rol de las neurotrofinas en la comunicación astrocitos-neuronas en el cerebro sometido a *Status epilepticus*.**

Tanto en **condiciones fisiológicas** como **patológicas**, los **astrocitos** mantienen una comunicación bidireccional con las neuronas y con otros tipos de células gliales a través de la liberación y recepción de diversas señales que se representan en la **Figura 1**. Entre los mensajeros químicos que liberan los astrocitos se encuentran algunos miembros de la familia de neurotrofinas, los cuales tendrían la potencialidad de promover la supervivencia neuronal en un contexto patológico o de daño<sup>6</sup>. El diseño de estrategias para lograr la neuroprotección es uno de los principales desafíos de las neurociencias para el tratamiento clínico de diversas patologías

que afectan el sistema nervioso. Desde hace una década, en nuestro laboratorio llevamos a cabo proyectos en los que intentamos comprender las respuestas de los astrocitos a un daño y los mecanismos por los cuales se pueden modular las respuestas neuroprotectoras, particularmente las mediadas por neurotrofinas.

Nuestros resultados y los obtenidos por otros investigadores, han demostrado que la aplicación de diferentes **protocolos para inducir SE *in vitro***, provocan un incremento en la expresión de neurotrofinas maduras, principalmente BDNF, y pro-Neurotrofinas. Concomitantemente con el incremento en la expresión de neurotrofinas, ocurre un desbalance en la expresión de receptores de neurotrofinas, **incrementando** la expresión del receptor **p75<sup>NTR</sup>** y **disminuyendo TrkB-FL**<sup>46-48</sup>. Si bien, algunas evidencias asocian a la señalización activada por **BDNF/TrkB-FL** con la epileptogénesis<sup>4,49</sup>, otros trabajos demuestran que sería fundamental para mantener la sobrevivencia neuronal<sup>46-48</sup>.

La expresión de neurotrofinas y sus receptores no se limita a las neuronas ya que en los astrocitos se observan alteraciones similares en **modelos patológicos como el SE**, pero a diferencia de las neuronas no sufren muerte celular<sup>50</sup>. El rol de los **astrocitos reactivos** luego del SE no está totalmente esclarecido y las publicaciones hacen referencia a respuestas tan variadas que van desde la epileptogénesis hasta la neuroprotección. Numerosos estudios demuestran que los astrocitos tendrían un rol protector frente a diferentes patologías o traumas que se desarrollan en el **SNC**<sup>51</sup> y este efecto también podría extenderse a la neurodegeneración **post-SE**. En esta tesina, analizaremos diferentes estudios que apoyan o que se contraponen a esta idea.

Si bien nuestros antecedentes indican que el **balance de neurotrofinas** disponibles juega un rol fundamental en el mantenimiento de la vida de las neuronas, se sabe que los astrocitos son células secretoras de una gran cantidad de mediadores que podrían ser responsables de la comunicación glía-neuronas en condiciones de daño o neurodegeneración. En este sentido, existen evidencias que indican que las **vesículas extracelulares** liberadas por los **astrocitos** podrían tener un papel importante en la neuroprotección y en la modulación de los niveles de neurotrofinas<sup>52,53</sup>.

## Vesículas extracelulares como mediadoras de la comunicación intercelular

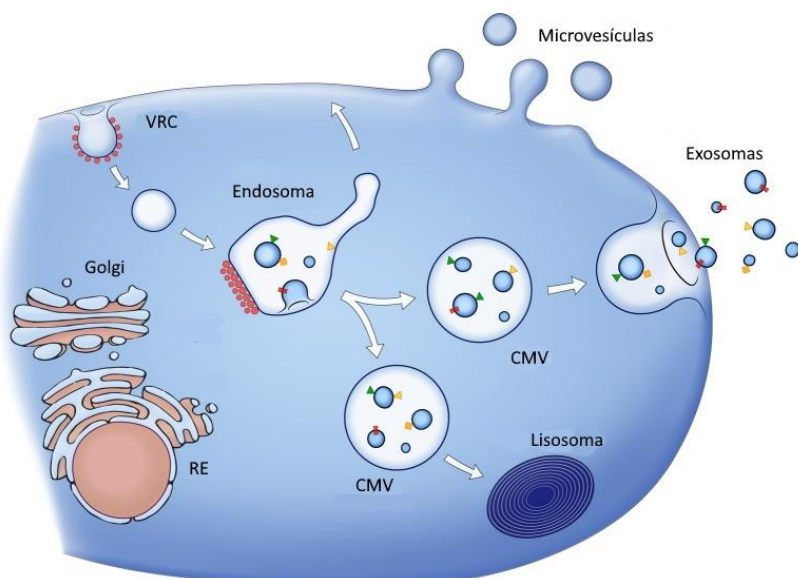
Las **vesículas extracelulares (VE)** son pequeñas estructuras esféricas limitadas por una bicapa lipídica, liberadas de manera evolutivamente conservada por células que van desde organismos procariota a eucariota superiores y plantas. Pueden clasificarse de acuerdo a su biogénesis en tres tipos: exosomas, microvesículas (MV) y cuerpos apoptóticos<sup>54</sup>. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en los exosomas y las microvesículas (**Figura 4**).

Estas cápsulas altamente heterogéneas pueden contener y transportar una amplia gama de componentes celulares incluidos ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, constituyendo un novedoso mecanismo de comunicación intercelular mediante la transferencia de moléculas<sup>7</sup>.

- Los **exosomas**, con diámetros en el rango de 30 a 100 nm, se originan a partir de la gemación interna de los cuerpos multivesiculares (CMV), lo que lleva a la formación de vesículas intraluminales (VIL). Las VIL que se liberan en los espacios extracelulares por la fusión de los CMV con la membrana plasmática se denominan exosomas<sup>55</sup>. Sin embargo, el término exosoma también se utiliza en la literatura para las VE de pequeño tamaño (menos de 200 nm de diámetro), que sólo pueden ser aisladas por ultracentrifugación de alta velocidad, independientemente de que su origen sea endosomal<sup>56</sup>.
- Las **microvesículas**, también llamadas ectosomas, presentan diámetros de entre 50 y 1.000 nm y a diferencia de los exosomas, se ensamblan a partir de pequeños dominios de membrana y se liberan por gemación directa hacia el exterior de la membrana plasmática<sup>57</sup>.

La clasificación como exosomas o microvesículas requiere una caracterización minuciosa de las propiedades de las VE debido a la superposición en su rango de tamaño. Por esta última razón la obtención de poblaciones de VE puras de un determinado tipo no es posible, aunque sí el enriquecimiento con alguna de ellas. Esto requiere de procedimientos que no sólo son más complejos sino que conllevan a una importante reducción en la cantidad de material que se obtiene. Como consecuencia, la mayor parte de los estudios se han realizado con muestras de VE que contienen tanto exosomas como CMV. En esta misma línea fue desarrollado el

presente trabajo, por lo cual en adelante la denominación VE da cuenta del conjunto de vesículas que incluye ambas poblaciones.



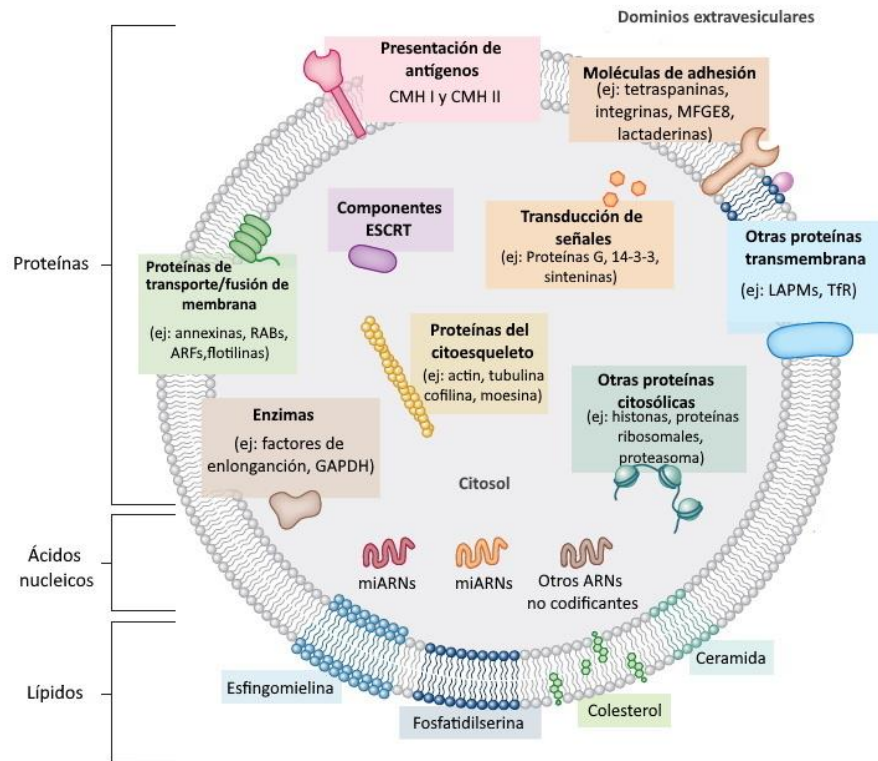
**Fig. 4. Liberación de microvesículas (MV) y exosomas.** Las MV brotan de la membrana plasmática mientras que los exosomas se forman como vesículas intraluminales brotando en endosomas y cuerpos multivesiculares (CMV) y se liberan por fusión de CMV con la membrana plasmática. Además, los CMV pueden fusionarse con lisosomas. Los círculos rojos simbolizan la clatrina asociada con vesículas la membrana plasmática (vesículas recubiertas de clatrina [VRC]) o bicapa de clatrina en los endosomas. Proteínas asociadas a la membrana y transmembrana en las vesículas se representan como triángulos y rectángulos. RE: Retículo endoplásmico. *Imagen tomada y modificada de Raposo and Stoorvogel, 2013*<sup>57</sup>.

## Composición de las vesículas extracelulares

En cuanto a su composición, las VE transportan diversas moléculas (**Figura 5**), entre ellas proteínas de membrana y citosólicas, lípidos que comúnmente incluyen colesterol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y altos niveles de esfingomiélin. También ADN y una variedad de especies de ARN, incluyendo miRNAs y fragmentos de ARNm<sup>55-58</sup>. El contenido de las VE está determinado por el origen, el fenotipo y el estado fisiológico o patológico de las células de las que derivan<sup>59</sup>.

Evidencias crecientes sugieren que la **carga de las VE** podría verse alterada dinámicamente por el fenotipo de las células de origen. Sin embargo, a nivel general, existen proteínas marcadoras específicas de VE identificadas a partir de análisis Western Blot y perfiles

proteómicos tales como las **tetraspaninas CD9, CD81 y CD63**, la proteína expresada por el gen 101 de susceptibilidad a tumores de proteína endosomal (**TSG101**), moléculas **ESCRT** (complejos de clasificación endosomal necesarios para el transporte) y la proteína X que interactúa con ALG-2 (**ALIX**), **flotillina-1** y **HSP70**<sup>55,57,58,60–62</sup>.

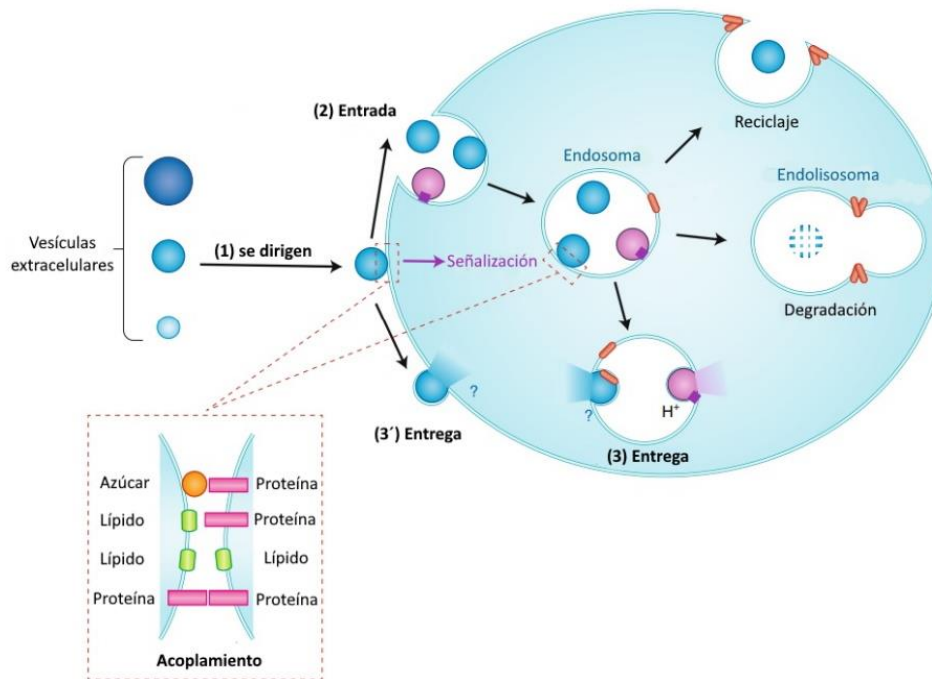


**Fig. 5. Composición global de las vesículas extracelulares (VE).** Representación esquemática de la composición (familias de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y la orientación de la membrana de las VE. Ejemplos de tetraspaninas que se encuentran habitualmente en las VE son CD63, CD81 y CD9. También se encuentran enzimas, proteínas de transporte en membrana, proteínas del citoesqueleto, miRNA, etc. Abreviaturas: ARF, factor de ribosilación ADP; ESCRT, complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte; LAMPs, proteínas de membrana asociadas al lisosoma; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; MFGE8, factor de crecimiento epidérmico de glóbulos de leche VIII; RAB, proteínas relacionadas con Ras en el cerebro; TfR, receptor de transferrina, GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. *Imagen tomada y modificada de Colombo et al, 2014*<sup>63</sup>.

## Comunicación intercelular mediada por vesículas extracelulares

Inicialmente las vesículas extracelulares se describieron como un medio para eliminar compuestos innecesarios de la célula. Sin embargo, ahora se conoce que son algo más que simples portadoras de residuos, y el principal interés en este campo se centra actualmente en su capacidad de intercambiar componentes entre las células, y de actuar como **vehículos de**

**señalización** en los procesos homeostáticos en condiciones fisiológicas o como consecuencia de desarrollos patológicos<sup>63,64</sup>. La captación de VE (**Figura 6**) requiere la interacción con receptores de superficie en la membrana plasmática, seguida de su fusión con las células blanco o endocitosis<sup>65</sup>. Se sabe que varias moléculas, incluidas las integrinas, las tetraspaninas, los lípidos, las lectinas, los proteoglicanos y los componentes de la matriz extracelular median estas interacciones. El modo de interacción entre las VE y las células receptoras está probablemente determinado por la especificidad de las proteínas de la superficie de las VE y de la membrana celular, lo que podría explicar la especificidad de la célula diana, sin embargo los mecanismos moleculares subyacentes que especifican el blanco de las VE no han sido determinados por completo<sup>66</sup>.



**Fig. 6. Tres vías de captación de vesículas extracelulares (VE) por las células receptoras.** (1) Las VE se dirigen a la célula receptora. El acoplamiento puede producirse a través de interacciones moleculares específicas en las que intervienen proteínas, azúcares o lípidos expuestos a la membrana (recuadro), o a través de diferentes vías de entrada. (2) Las VE que entran en la célula receptora pueden dirigirse a los endosomas. (3) Las VE internalizadas liberan su contenido por la vía indirecta del escape endosomal. Esto podría implicar la fusión de membranas a través de mecanismos moleculares desconocidos. Una vez internalizadas, las VE pueden reciclarse y volver a liberarse o dirigirse al lisosoma para su degradación. (3') Una ruta alternativa y directa de entrega del contenido a la célula receptora podría implicar la fusión de la VE con la membrana plasmática y la liberación de la carga directamente al citosol. *Figura tomada y modificada de Mathieu et al, 2019*<sup>67</sup>.

En el sistema SNC, las VE liberadas por las neuronas y la glía contribuyen a la red compleja de mensajes interconectados que subyacen tanto a la fisiología como a la patología de

este sistema. Evidencias de los últimos años indican que la señalización mediada por las **VE** puede contribuir a la regulación de la activación neuronal, la plasticidad sináptica y la formación de mielina. Recientemente se ha descubierto que las VE atraviesan la barrera hematoencefálica (**BHE**), señalando la propagación de la neuroinflamación con consecuencias sistémicas<sup>68</sup>. Así, la comunicación intercelular a través de las VE actualmente se acepta como un tipo de **comunicación no sináptica en el SNC**, que contribuye al papel del espacio extracelular en la difusión y codificación de la señalización en el cerebro<sup>69</sup>. Sin embargo, la comunicación por medio de esta vía a partir de los astrocitos en funciones biológicas tan diversas está poco investigada.

Los **astrocitos**, reconocidos como células secretoras, liberan diversas sustancias que contribuyen a la regulación del desarrollo y la homeostasis del SNC, la sinaptogénesis y la función cognitiva. Nuevas evidencias indican que los astrocitos pueden lograr sus funciones a través de la liberación de **VE**<sup>56</sup>, y que en este sistema de comunicación, no sólo responden a los estímulos y condiciones secretando VE con cargas seleccionadas, sino que también están influenciados por VE secretadas por otras células<sup>70</sup>. Como células secretoras, los astrocitos en reposo liberan un gran número de VE que pueden regular la neurogénesis, la angiogénesis y la neuroprotección *in vitro*. Además, bajo estimulación en condiciones patológicas o de envejecimiento, los astrocitos reactivos secretan más VE con contenidos alterados de proteínas<sup>60,71</sup>. Se conoce que las VE derivadas de astrocitos en condiciones normales están enriquecidas en elementos neuroprotectores y neurotróficos, tales como proteínas que promueven el crecimiento de neuritas, la transmisión sináptica y la supervivencia neuronal<sup>71</sup>.

Finalmente, cabe mencionar que son múltiples los fluidos que **contienen vesículas derivadas de astrocitos (VEA)**, tales como el **plasma**, el **líquido cefalorraquídeo**, la **sangre** y la **leche materna**. Por lo cual las VE constituyen una herramienta con potencial para la identificación de biomarcadores en los trastornos neurodegenerativos, otros trastornos patológicos e incluso en condiciones fisiológicas<sup>56,72,73</sup>. Esta última cuestión, aunque no será profundizada durante el desarrollo del presente trabajo, recibirá un breve abordaje en la sección de discusión.

## OBJETIVOS

Debido al contexto que nos impuso la pandemia por el **COVID-19**, al momento de aprobarse el proyecto de esta tesina, nos abocamos inicialmente al trabajo intelectual de revisión bibliográfica y al planteo de nuevos modelos hipotéticos que expliquen la **comunicación astrocitos-neuronas en un contexto de SE**. Este trabajo, nos permitirá analizar críticamente los modelos experimentales que utilizamos en nuestros estudios, plantear nuevas hipótesis, las cuales esperamos continuar probando en el futuro.

Es por ello que el **objetivo general** de esta tesina fue estudiar los distintos mecanismos de comunicación mediados por neurotrofinas y VE entre neuronas y astrocitos, durante un *Status Epilepticus* con el fin de *plantear un modelo hipotético de interacción entre ambos tipos celulares en ese contexto patológico y discutir el abordaje metodológico necesario para comprobar esta hipótesis*.

Con la **revisión de literatura científica**, intentamos resolver los siguientes interrogantes:

- 1- ¿Cuáles son las ventajas y limitaciones de los modelos experimentales disponibles para estudiar la comunicación astrocitos-neuronas mediada por VE?
- 2- ¿El desbalance en la expresión de receptores de neurotrofinas puede explicar la muerte neuronal inducida por SE?
- 3- ¿Qué rol cumplen las neurotrofinas en la comunicación astrocitos-neuronas en la neurodegeneración inducida por SE?
- 4- ¿Qué rol cumplen las VE en la comunicación astrocitos-neuronas en condiciones patológicas?
- 5- ¿De qué forma las VE liberadas por astrocitos podrían regular la expresión de neurotrofinas en neuronas?

Además, para comenzar a poner a prueba la hipótesis planteada, nos propusimos **poner a punto la obtención de vesículas extracelulares de astrocitos y caracterizarlas**.



## **Objetivos específicos**

### **1- Realizar un trabajo de revisión bibliográfica acerca de los mecanismos de comunicación astrocitos-neuronas en el contexto del *Status Epilepticus*.**

**a.** Conocer los mediadores de la comunicación astrocitos-neuronas, en modelos *in vitro* e *in vivo* de *Status epilepticus*.

**b.** Discutir críticamente las conclusiones procedentes de diferentes estudios relacionados con los mediadores de la comunicación astrocitos-neuronas.

**c.** Elaborar un modelo de comunicación entre astrocitos y neuronas en el *Status epilepticus* basado en la bibliografía y los resultados de nuestro laboratorio.

**d.** Discutir el abordaje experimental necesario para comprobar el modelo propuesto en el objetivo 1c analizando las ventajas y desventajas de los modelos experimentales disponibles.

### **2- Caracterizar a las VE liberadas al medio por astrocitos *in vitro*.**

**a-** Analizar parámetros morfológicos de las VE aisladas de medio condicionado de astrocitos.

**b-** Identificar la presencia de marcadores específicos de astrocitos en VE liberadas por estas células, como GFAP o transportadores de glutamato.

### **3- Comprobar la interacción física entre VEA y células neuronales por medio de microscopía.**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Revisión bibliográfica

La búsqueda bibliográfica se realizó con el propósito de responder a las preguntas planteadas en los objetivos de este manuscrito, obteniendo la información a partir de artículos científicos originales y tesis desarrolladas en el laboratorio que aportan resultados directamente vinculados a nuestros interrogantes. Además, se tomó información de revisiones científicas, las cuales nos brindaron un pantallazo actualizado de cada una de las temáticas a pesar de que no presentan nuevos resultados experimentales.

La **búsqueda bibliográfica** se llevó a cabo principalmente a través de la plataforma PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) que permite detectar una gran variedad de publicaciones del área de las neurociencias. Además, se seleccionaron los artículos en relación a su novedad y al impacto que poseen los mismos en base a sus citas. Esta información fue indagada en las plataformas Scimago (<https://www.scimagojr.com/>) y Scopus (<https://www.scopus.com>). Para que los distintos artículos fueran incluidos en la revisión debieron cumplir con los siguientes criterios:

- Que el artículo responda a alguna de las preguntas planteadas.
- Que las conclusiones del artículo se basen predominantemente en un enfoque experimental y no teórico.
- Que los resultados hayan sido analizados estadísticamente (fueron excluidos los artículos en los que se presenten análisis de casos únicos o clínicos).

Una vez finalizada la búsqueda bibliográfica, la información de relevancia obtenida a partir de ella fue resumida en **tablas e imágenes** para su representación de manera gráfica, organizada y de fácil entendimiento. Luego, se realizó un **modelo esquemático** de comunicación entre astrocitos y neuronas durante el *Status epilepticus*. Para la realización de los mismos se usaron los programas Paint.net y las plantillas de <https://biorender.com/>.

## Cultivos primarios

Los **cultivos de astrocitos** se obtuvieron de acuerdo con lo descrito en Cragolini *et al.* (2018)<sup>74</sup> a partir de **ratas Wistar** de entre 0 y 2 días de edad postnatal (**P0-2**). Brevemente, los neonatos fueron sacrificados por decapitación y se obtuvieron los cerebros de los cuales se aislaron los hipocampos, corteza o cuerpos estriados libres de meninges. A continuación, la suspensión celular se sembró en botellas de cultivo de 75cm<sup>2</sup> o P75 previamente tratadas con una solución de poli-D-lisina (Poly-D-Lysine hydrobromide P1024-50MG, Sigma 14 µg/ml) conteniendo medio de crecimiento compuesto por DEMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Gibco, 11995-065), 10% de suero fetal bovino (FBS, Internegocios, FBI) y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomicina) (PenStrept: Gibco, 15070-063). Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora con humedad controlada y una atmósfera de 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> y el medio se reemplazó dos veces por semana por medio fresco. Una vez alcanzada la confluencia, los cultivos enriquecidos de astrocitos se obtuvieron finalmente a través de la eliminación de otros tipos celulares (microglía, oligodendrocitos y neuronas) utilizando agitación orbital a 250 rpm durante 1h. Posteriormente, el medio de crecimiento fue reemplazado por medio libre de suero para proceder a la obtención de vesículas extracelulares como se detalla más abajo.

El **cultivo de neuronas hipocampales** de rata se realizó a partir de embriones de 18 días (**E18**), tal como se describe en Danelon *et al.*, 2016<sup>75</sup>. Brevemente, las hembras de ratas preñadas se sacrificaron mediante exposición a una atmósfera saturada en CO<sub>2</sub> y posterior dislocación cervical. Los embriones fueron retirados del útero en condiciones estériles y se disecaron las cabezas y posteriormente los hipocampos. El tejido se disgregó mecánicamente y las células disociadas se sembraron una densidad de 50.000 células/cm<sup>2</sup> en cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (0,1 mg/ml, Sigma, Cat N° P-1149) y se mantuvieron en medio de crecimiento (DMEM/F12, PenStrep Gibco 1% y suplemento B27 Gibco) en incubadora a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% durante 7 días, hasta el momento del ensayo de unión con VEA.

El protocolo de uso de animales fue aprobado por el CICUAL del Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT), acta 3/2015.

## **Cultivo y diferenciación de células PC12**

Las células de la **línea PC12** proceden de feocromocitoma de rata y se obtuvieron del Banco de células del Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba CONICET-UNC. Las células se sembraron en cápsulas de Petri (células para mantenimiento del stock) o sobre cubreobjetos estériles (para inmunocitoquímica) previamente tratados con poli-D-lisina (0,1mg/ml, Sigma, Cat N° P-1149) y se las mantuvo en medio de crecimiento (DMEM, FBS inactivado 5%, suero de caballo inactivado (HS) 5% (Gibco), PenStrept 1% y glutamax 1% (GlutaMAX A12860-01) en incubadora a 37°C.

Para que las mismas desarrollen procesos dendríticos y axonales, las células PC12 fueron sembraron en cubreobjetos dentro de placas multiwell y se las mantuvo en medio de crecimiento hasta que alcanzaron una confluencia de ~ 40%. En ese momento se procedió a lavarlas con PBS y se reemplazó el medio de crecimiento por medio de diferenciación compuesto por DMEM, HS 1%, PenStrept 1%, glutamax 1% y NGF recombinante humano 100 ng/ml (Alomone, Cat N245). Cada 48 horas se realizó el cambio de medio por medio de diferenciación fresco a lo largo de 5 días, momento en el cual se observaron procesos similares a axones y dendritas y se procedió a realizar el ensayo de unión de VEA.

## **Liberación y aislamiento de vesículas extracelulares astrocíticas**

La **obtención de VEA** se realizó de acuerdo con la metodología descrita por la Dra. Franchi (Franchi *et al*, 2019)<sup>76</sup>. Para obtener el medio condicionado de astrocitos se aspiró y descartó el medio de crecimiento de los cultivos enriquecidos en astrocitos, posteriormente se realizaron dos lavados con PBS. A continuación, se agregó el nuevo medio de crecimiento sin suero compuesto por medio DMEM/ F12 sin rojo fenol (DMEM/F12: Emeve Medios, 14042-500), N2 supplement (N2: Gibco, 17502-048) y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycin). Luego de 24 se recolectó el medio condicionado y se agregó medio sin suero, a las 24h (48h del cambio de medio inicial) se recolectó nuevamente el medio condicionado y las células se lisaron como se detalla más adelante.

Los medios condicionados fueron sometidos a centrifugación diferencial. Primero se centrifugaron a 3000 xg 20 min a 4°C para eliminar células y restos celulares de gran tamaño.

Se eliminó el pellet y el sobrenadante se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de continuar con las siguientes centrifugaciones. En un segundo paso, el sobrenadante se centrifugó a  $10.000 \text{ xg}$  durante  $60 \text{ min}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  para eliminar la totalidad de restos celulares. El sobrenadante resultante fue filtrado ( $0,22 \mu\text{m}$ ) y a continuación fue sometido a ultracentrifugación a  $100.000 \text{ xg}$  por  $90 \text{ min}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con PBS y se centrifugó a  $100.000 \text{ xg}$  durante  $90 \text{ min}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  para la obtención final de las VE. Una vez que se eliminó todo el exceso de sobrenadante, el sedimento con VE se resuspendió en PBS y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de utilizarlos para su caracterización por ME, dot Blot, Western Blot y para los ensayos de interacción con neuronas por inmunocitoquímica.

### **Obtención de homogenatos celulares**

Luego de la obtención del medio condicionado de astrocitos, se lavaron las células con PBS para eliminar iones divalentes que puedan inhibir la actividad de la tripsina, con la cual se levantaron las células adheridas a las placas de cultivo. Se utilizó tripsina al  $0,25\%$  diluída en PBS y las células se incubaron durante  $5 \text{ min}$  en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , inmediatamente después se detuvo la actividad de la tripsina con la adición de medio de cultivo con  $10\%$  de FBS, las células desprendidas de las botellas de cultivo se aspiraron y traspasaron a un tubo cónico. Las células tripsinizadas se centrifugaron a  $1000 \text{ rpm}$  durante  $5 \text{ minutos}$ , se descartó el sobrenadante y el pellet, conteniendo células fue lisado con buffer de radioinmunoprecipitación (RIPA) en presencia de inhibidores de proteasas durante  $30 \text{ min}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la cuantificación de proteínas y WB.

### **Caracterización de vesículas extracelulares**

- **Western blot y dot blot**

Las proteínas se cuantificaron mediante un kit comercial (Pierce TM BCA protein assay, cat. N° 23252), basado en el ácido bicinconínico (BCA) compatible con detergentes presentes en el buffer RIPA de lisado. La detección colorimétrica y la cuantificación se hicieron siguiendo las instrucciones del proveedor del ensayo y las lecturas de la reacción colorimétrica se realizaron a  $570 \text{ nm}$ . El blanco, los estándares de concentraciones crecientes de albúmina y las

distintas muestras se cuantificaron por duplicado. Para el WB se utilizaron al menos 30ug de proteínas diluías en buffer Laemmli.

Para poner a punto la detección de proteínas específicas de VE se utilizaron proteínas de células de la línea celular de adenocarcinoma endometrial humano Ishikawa provenientes de epitelio luminal endometrial humano que previamente fueron reportadas como células secretoras de vesículas extracelulares, así como también VE derivadas de ámpula<sup>77</sup>.

En el caso del análisis mediante **Western blot**, las proteínas obtenidas de VE y de los homogenatos celulares a partir de los cuales se obtuvieron las VE, se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE, en geles de poliacrilamida al 10%, se transfirieron a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno) o de nitrocelulosa previamente activadas con metanol o agua destilada, respectivamente, luego buffer de transferencia y se realizó una tinción con Ponceau para corroborar la correcta transferencia. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche en polvo descremada (5% en TBS-T) durante 1h a temperatura ambiente con agitación constante y luego incubadas con anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Para el análisis por **dot blot**, se sembraron entre 10-20µl de muestra sobre membranas de nitrocelulosa, se bloquearon y se incubaron con anticuerpos de la forma descrita anteriormente.

Las membranas de nitrocelulosa o PVDF conteniendo las proteínas transferidas se probaron con los siguientes anticuerpos primarios: **anti-GFAP** (Millipore, MAB 360, dilución 1:5000, ratón), **Anexina II** (BD Transduction Laboratories Cat# 610069, 1:5000, ratón), **HSP70** (W27, Santa Cruz sc-24, 1:300, ratón), **CD63** (H-193 Santa Cruz sc-15363, 1:500, conejo), **CD81** (B-11, Santa Cruz sc-166029, 1:200, ratón). Luego de la incubación con anticuerpos primarios, las membranas se lavaron con buffer TBS-T 0,05% y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con **HRP (peroxidasa de rábano)** (anti-conejo HRP 1:2,000; cat# 715-035-150 y anti-ratón cat# 715-035-150 Jackson ImmunoResearch) durante 1h. Luego las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se revelaron por quimioluminiscencia mediante el método ECL (enhanced chemio luminescence). Para finalizar, las imágenes de las placas fotográficas reveladas se digitalizaron para su posterior procesamiento.

- **Ensayo de unión de VEA a neuronas hipocampales y células PC12 e inmunocitoquímica**

Para evaluar la interacción entre las VEA hipocampales y células PC12 o neuronas hipocampales se procedió a incubar VEA obtenidas de corteza cerebral o de hipocampo con la sonda lipofílica fluorescente PKH26 (Sigma MINI26) en una concentración final de 5  $\mu$ M durante 5 min. La reacción de marcación se finalizó mediante la adición de albúmina y se resuspendió la muestra en PBS para luego realizar una ultracentrifugación a 100.000 xg durante 90 min para eliminar el excedente de la sonda.

Para realizar el ensayo de unión de VEA a neuronas o células PC12 se aspiró el medio de cultivo y se le agregó medio de crecimiento (a neuronas hipocampales) o medio de diferenciación depletado de vesículas (a las células PC12). A continuación, se les agregó entre 20-25  $\mu$ l de la muestra de VE astrocíticas derivadas de células corticales o de hipocampo marcadas con la sonda y se incubaron a 37° durante 2 horas. Luego, se procedió a fijar las células con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 20 minutos, se lavaron las células 3 veces durante 5 minutos con PBS y se llevó a cabo el bloqueo para evitar uniones inespecíficas con Suero normal de cabra (NGS, Natocor) 10% y Tritón 0,3% diluído en PBS por una 1 hora. Para marcar las células PC12 y las neuronas hipocampales se incubaron con anticuerpo primario contra **Tuj-1** (Tubulina III T8660, Sigma, 1:50, ratón) a 4°C durante toda la noche. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón (Alexa Fluor® 488 Goat anti-mouse, Cat A1101, Life Technology, 1:200) durante una hora y media. Nuevamente, se repitieron 3 lavados con PBS, y el último lavado se agregó **DAPI** (Roche, Cat 10236276001, 1:10.000) para marcar los núcleos celulares. Finalmente se realizó un lavado con agua destilada y los cubreobjetos conteniendo las células marcadas se montaron sobre un portaobjetos utilizando como solución de montaje FluorSave (Calbiochem 345789).

La interacción entre las células PC12 y las VEA marcadas se evaluó mediante microscopía de **EpiFluorescencia**, utilizando un microscopio Olympus BX50 y un objetivo de 100X con aceite de inmersión. Para visualizar la interacción entre neuronas hipocampales y VEA marcadas se utilizó un **Microscopio Confocal LSM800 ZEISS** Carl Zeiss LSM800 (CEMINCO, CONICET-UNC).

Para confirmar la presencia de vesículas extracelulares en el medio condicionado de astrocitos se analizó la muestra de medio ultracentrifugado por **microscopía electrónica de transmisión (TEM)**. Para ello, se utilizaron grillas de formvar/carbón (Electron Microscopy Sciences, FC 200 Ni) sobre las cuales se depositaron 10µl de la suspensión de VEA durante 45 min. Luego se transfirió la grilla a una gota de 10µl de acetato de uranilo al 4% durante 20 segundos. Por último, se absorbió el líquido remanente con papel de filtro. Al día siguiente las muestras fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión, utilizando un microscopio LEO 906E del Centro de Microscopía Electrónica (CME) dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas en la Universidad Nacional de Córdoba (UNC-FMED) con un aumento de entre 66.500X a 100.0000X.

El procesamiento de imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia, así como la medición del tamaño de las VEA se realizó con el programa de análisis de imágenes, **ImageJ**<sup>78</sup>.

## **Análisis Estadístico**

Debido a que el estudio de las vesículas extracelulares se basó en la evaluación de índole cualitativo y descriptivo con el objetivo de verificar la interacción célula-VEA así como también la presencia o ausencia de distintos marcadores moleculares en vesículas extracelulares astrocíticas en una única condición experimental sin comparación con otro tratamiento, el análisis de los datos no precisó de un tratamiento estadístico.



## RESULTADOS

### Revisión de mecanismos de comunicación astrocitos-neuronas en el contexto del *Status Epilepticus*

**¿Cuáles son las ventajas y las limitaciones de los modelos experimentales disponibles para estudiar la comunicación astrocitos-neuronas en la neurodegeneración inducida por SE?**

En esta sección se presenta el resultado de una **revisión** exhaustiva de publicaciones sobre **modelos experimentales** que frecuentemente se utilizan para estudiar al SE y la **comunicación astrocitos-neuronas en este contexto**. Además, analizaremos nuevos modelos que incluyen a animales modificados genéticamente, así como el uso de drogas y combinaciones que aportan nuevas variantes a modelos tradicionales de SE. Esta revisión nos permitirá ampliar nuestro conocimiento acerca de la utilidad, las limitaciones, las diferencias y puntos en común de estos modelos con la patología humana que intentan representar.

Luego de la revisión de numerosas publicaciones se seleccionaron 31 modelos del SE para ser analizados. Se establecieron criterios de comparación (método de inducción, características relevantes, desventajas, etc) y la información se sistematizó en una tabla que se encuentra en el **ANEXO** de esta tesina y en el siguiente link <https://drive.google.com/drive/folders/1KCzOrieMnkzItqiU4vc10QkayAtmWVMd?usp=sharing>. A continuación se describen algunas características que complementan la información disponible en dicha tabla, por lo cual recomendamos tenerla a mano para una mejor comprensión del texto. A modo de resumen, en la **Figura 7** se muestran los mecanismos de inducción de algunos modelos de SE utilizados con frecuencia para tal fin.

#### **Modelos *in vitro***

Los modelos *in vitro* constituyen los sistemas biológicos más simples de estudio y son especialmente útiles para evaluar mecanismos celulares y moleculares implicados en cualquier fenómeno biológico<sup>79</sup>. Estas preparaciones se pueden obtener de casi cualquier especie, aunque predominan los estudios en roedores y últimamente se ha facilitado el acceso a células humanas.

Para los estudios de **actividad epileptiforme**, se usan frecuentemente **rebanadas de cerebros, cultivos organotípicos, cultivos celulares y organoides cerebrales** (derivados de células madre pluripotentes), entre otros. En estos sistemas la hiperactivación neuronal se puede estudiar realizando manipulaciones iónicas, eléctricas o farmacológicas en preparaciones obtenidas de animales sin tratamiento previo o de animales que han experimentado **SE *in vivo*** o partiendo de tejidos o células de animales genéticamente modificados para generar convulsiones. Cabe aclarar que cuando nos refiramos a modelos ***in vitro***, utilizaremos el término **hiperactivación neuronal** en vez de *Status Epilepticus*, ya que éste último es un fenómeno que ocurre en un organismo vivo.

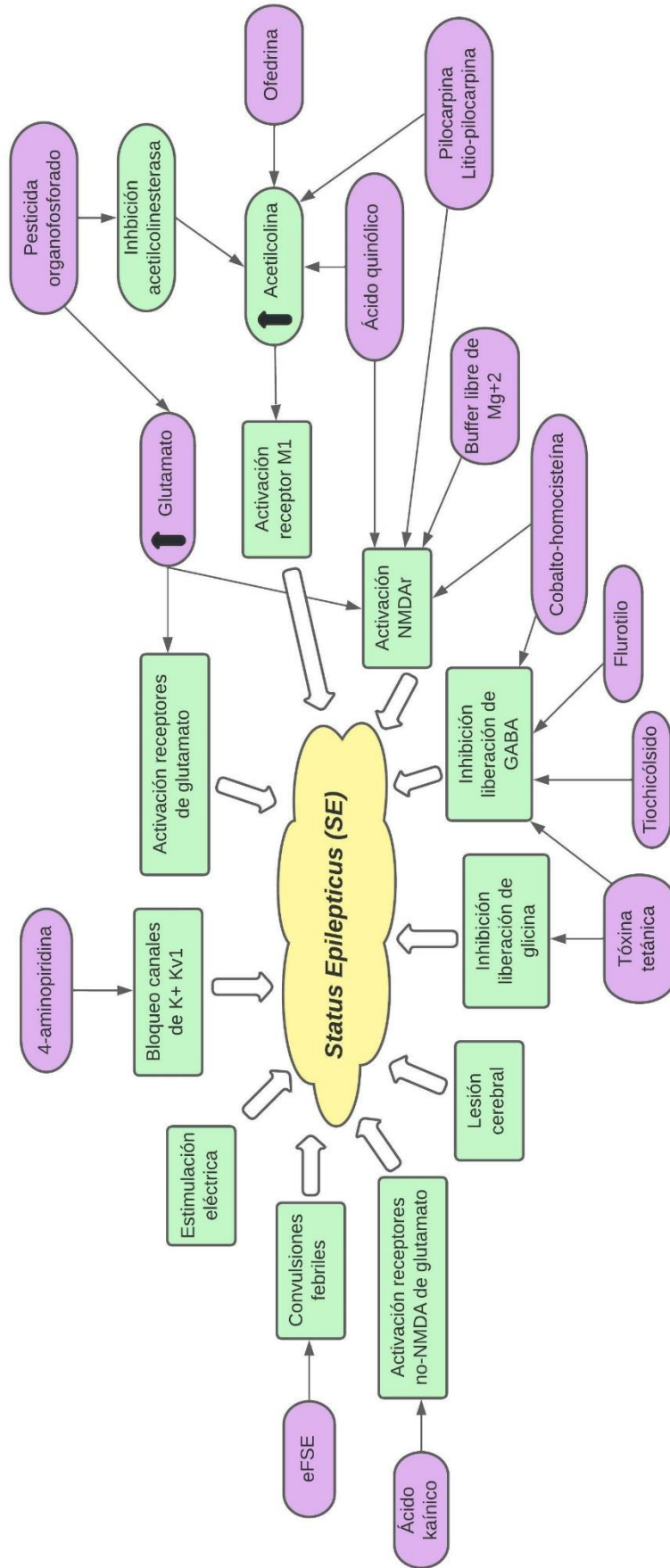
Los sistemas *in vitro* son muy sensibles a las múltiples variaciones en las condiciones de cultivo y al número de días *in vitro*<sup>80,81</sup>. No obstante, este tipo de modelo permite estudiar de forma controlada procesos bioquímicos que ocurren a nivel de una única neurona, de poblaciones de redes neuronales y en combinaciones de células específicas (por ejemplo co-cultivos de neuronas y astrocitos)<sup>80,82</sup>.

Los principales tratamientos para estudiar la **hiperactivación neuronal *in vitro*** son:

- 1) **Buffer libre de Mg<sup>+2</sup>**: Consiste en el reemplazo del medio de cultivo de mantenimiento de neuronas por un buffer sin Mg<sup>+2</sup>, lo cual induce una hiperactivación eléctrica en alrededor del 90% de las neuronas, similar a las generadas durante el “**estado epiléptico**”. Este modelo se basa en la fisiología del **NMDAr**. Este receptor tiene un sitio de unión al Mg<sup>+2</sup> que bloquea el paso de iones Ca<sup>+2</sup> y Na<sup>+</sup> a través de su canal. Por lo tanto, la eliminación del Mg<sup>+2</sup> desbloquea el canal del receptor, induciendo hiperactivación y degeneración neuronal. La actividad eléctrica neuronal exacerbada puede finalizar, a voluntad del experimentador, restableciendo las concentraciones fisiológicas de Mg<sup>+2</sup><sup>82</sup>. Estas consideraciones hacen que este modelo sea idóneo para estudiar los procesos bioquímicos que subyacen a la muerte neuronal inducida por hiperactivación. Por ello, lo hemos utilizado en diversas ocasiones tanto en cultivos puros de neuronas como en co-cultivos con astrocitos<sup>44,46,47,75</sup>.

- 2) **Glutamato:** Se utiliza frecuentemente como tratamiento en diferentes preparaciones *in vitro* de cortes cerebrales y cultivos de tejidos para estudiar la **excitotoxicidad** que resulta de la activación excesiva de receptores de glutamato incluido el subtipo **NMDA**. Esto lleva a la muerte neuronal por excitación prolongada, agotamiento energético y daño asociado al ingreso de  $\text{Ca}^{+2}$  al interior celular<sup>82,83</sup>. Sin embargo, el glutamato juega un papel esencial en el funcionamiento normal del cerebro. Es el neurotransmisor excitatorio más abundante del cerebro, presente en más del 90% de las sinapsis cerebrales y forma parte de múltiples vías metabólicas. Como consecuencia, no resulta ser un modelo específico para estudiar una neuropatología como el SE debido a la complejidad de su metabolismo<sup>83</sup>.
- 3) **4-aminopiridina (4-AP):** Es un bloqueante de los receptores de potasio de la familia Kv1 e impide las corrientes transitorias de este ion y estimula la liberación de neurotransmisores excitatorios e inhibitorios en preparaciones *in vitro*, e *in vivo*<sup>84,85</sup>.
- 4) **Modelo de hiperactividad neuronal inducida por estimulación eléctrica:** Este tipo de estimulación es poco utilizada actualmente, aunque *in vivo* si se utiliza. A diferencia de los modelos anteriores, no utiliza fármacos ni manipulaciones iónicas. Este paradigma tiene lugar en rebanadas de hipocampo que son sometidas a una serie de estimulaciones eléctricas que provocan descargas espontáneas similar a lo que ocurre con el *kindling* eléctrico *in vivo*<sup>86</sup>.

En términos generales los modelos que utilizan **rebanadas de cerebro, cultivos organotípicos y organoides** tienen la ventaja de que mantienen las estructuras tridimensionales más o menos intactas, la conectividad intrínseca del órgano, la integridad celular y son aptos para experimentos electrofisiológicos y de imágenes<sup>80</sup>. Por otra parte, permiten un mejor acceso experimental y control del medio extracelular en relación con modelos *in vivo*, en particular en áreas que son difíciles de alcanzar *in vivo*, como las cortezas olfatoria y límbica<sup>80,87</sup>. Las rebanadas de cerebro presentan la desventaja de que las proyecciones neuronales hacia otras áreas son interrumpidas al cortar el tejido y esto también genera un daño celular considerable. Los **cultivos organotípicos** se obtienen de neonatos y pueden ser mantenidos por más tiempo que las rebanadas, aunque este proceso es complejo y más costoso<sup>88</sup>. A medida que pasamos a estructuras de mayor tamaño, como los organoides cerebrales, se dificulta la penetración de los nutrientes y los fármacos por lo que hay recurrir a sistemas de perfusión de la estructura<sup>80,88</sup>.



**Fig. 7. Algunos modelos de inducción de SE e hiperactivación neuronal y su mecanismo de acción.** La estimulación eléctrica, los quimioconvulsivantes aplicados *in vivo* o *in vitro* y las manipulaciones iónicas se encuentran entre las principales estrategias para inducir SE. Abreviaturas: estado epiléptico febril experimental (eFSE), ácido N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR), ácido gamma-aminobutírico (GABA), receptor muscarínico 1 (receptor M1).

Los **cultivos celulares** primarios de neuronas puras, son muy utilizados para el estudio de los mecanismos que subyacen al SE. Los cultivos celulares permiten obtener una gran cantidad de neuronas y “rinden más” que los otros sistemas *in vitro* pero puede llevar varias semanas hasta lograr la madurez y que se establezcan conexiones entre neuronas<sup>88</sup>. Otra desventaja es la pérdida de la estructura tridimensional y de las conexiones entre áreas cerebrales. Si bien las neuronas son un requisito fundamental para la actividad epiléptica, no son el único tipo celular involucrado, ya que las células gliales son factores importantes para generar, potenciar, modular las descargas o proteger a las neuronas<sup>1,2,5-7</sup>. Por lo tanto, los modelos de SE que omiten otros tipos celulares o que no respetan las proporciones celulares que se encuentran *in vivo* pueden afectar la validez de esos modelos y los resultados que se obtengan con ellos<sup>88</sup>.

A pesar de estas limitaciones los cultivos celulares, son una herramienta muy útil para el estudio de la comunicación entre neuronas y astrocitos. Esto se debe a la versatilidad de los dispositivos de cultivo existentes que permiten establecer co-cultivos de estas células con o sin contacto entre ellas y así recolectar medios condicionados e intercambiarlos, analizar su composición identificando los mensajeros liberados por uno u otro tipo celular, etc. Además, algunos receptores y canales iónicos sensibles a fármacos utilizados para el SE se expresan de forma diferencial en cada una de las células del SNC<sup>89</sup>, permitiendo realizar tratamientos farmacológicos o manipulaciones iónicas que afectan a un tipo celular o a ambos. Tal es el caso los astrocitos que, por ejemplo, expresan una isoforma del receptor NMDA que tiene una susceptibilidad limitada al bloqueo por  $Mg^{+2}$ <sup>90</sup> por lo que la remoción de este ion activaría poco o moderadamente a este receptor.

### **Modelos *in vivo***

Este tipo de ensayos se caracteriza por el uso de animales vivos. Si bien, la duración de los ensayos y el consumo de recursos para este tipo de estudios es mayor, los modelos de epilepsia *in vivo* imitan mejor las características fenotípicas de las convulsiones y la epilepsia humana<sup>79</sup>. Comúnmente, estos modelos tienen la intención de imitar la **epilepsia en el lóbulo temporal (TLE, por las palabras en inglés *Temporal Lobe Epilepsy*)** y, por lo tanto, los

individuos deberían mostrar una "**historia clínica**" similar a la de los humanos, incluida una lesión que afecta al hipocampo o al lóbulo temporal, un período de latencia entre la lesión y la aparición de convulsiones espontáneas y cambios histopatológicos característicos<sup>91,92</sup>.

Los principales modelos de **SE *in vivo*** son:

**a) Inducción farmacológica del *Status epilepticus* o Quimioconvulsivantes:**

Existen numerosos compuestos químicos que dan inicio a convulsiones y pueden utilizarse como tratamientos tanto *in vitro* como *in vivo*. Todos estos compuestos se caracterizan por provocar neuroinflamación, activación de los astrocitos y microglía, incremento de las citoquinas pro-inflamatorias y provocan neurodegeneración con mayor o menor extensión en el cerebro<sup>93</sup>. Entre los compuestos más utilizados *in vivo*, se encuentra el **ácido kaínico**, que es un agonista cíclico de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos de tipo kainato y AMPA. Las manifestaciones comportamentales luego de la administración de ácido kaínico son similares a las que se observan con la inyección sistémica de otra droga usada comúnmente para inducir epilepsia, la **pilocarpina**. En ratas, el SE inducido por estas drogas se observa entre los 5 y 60 min posteriores a la inyección y la epilepsia espontánea ocurre entre los 5 y 30 días posteriores al SE<sup>94</sup>. El **ácido kaínico** causa lesiones habitualmente restringidas al **hipocampo** resultando una limitación o ventaja según el objetivo del estudio. Por el contrario, la **pilocarpina** en roedores afecta al **hipocampo** y áreas **neocorticales**, tal como ocurre en la TLE humano, por lo que representa mejor a la patología<sup>91</sup>. Una limitación del modelo de SE inducido por pilocarpina es la altísima tasa de mortalidad asociada a la administración sistémica de esta droga, la cual puede alcanzar al 50% de los animales dentro de las 12h posteriores a la inyección<sup>95</sup>. Por ello, generalmente, la pilocarpina sistémica se utiliza combinada con antagonistas colinérgicos como la **atropina** y la  **$\alpha$ -metilescopolamina** que atenúan sus efectos secundarios y de esta forma incrementa la supervivencia, sin afectar el desarrollo del SE. Otra alternativa para reducir la letalidad asociada a la pilocarpina, incluye la administración previa de cloruro de litio (LiCl) (**litio-pilocarpina**). El LiCl permite la reducción dosis de pilocarpina capaz de inducir el SE y consecuentemente la letalidad, aunque los mecanismos de este efecto no se conocen. El uso del LiCl es controvertido, numerosos trabajos muestran evidencias a favor y otros en contra sobre

su potencial para provocar la disminución del umbral convulsivo e inducir convulsiones con dosis de pilocarpina bajas<sup>92,96-98</sup>. Por otra parte, se ha visto que el LiCl tiene efectos neuroprotectores por lo que se podría atenuar la neurodegeneración generada por el SE inducido por pilocarpina<sup>99</sup>.

Otros compuestos como el **pentilenetetrazol**, el **flurotilo**, **estricnina**, **N-metil-D, L-aspartato**, **toxina tetánica** y penicilina se utilizan ampliamente como **modelos de convulsiones agudas**<sup>91,92,100</sup>. El furotil no es epileptogénico y no causa una pérdida de neuronas evidente en los animales, lo cual es una limitación si se quiere estudiar la neurodegeneración asociada al SE<sup>91</sup>. También existen otros modelos novedosos tales como la administración de **cobalto-homoscisteína**, **orfenadrina**, **tiocolchicósido** o **ácido quinólico** que inducen epileptogénesis, pero aún no se han descrito claramente los mecanismos de acción ni los cambios conductuales e histológicos que provocan<sup>92,101-105</sup>.

Finalmente, podemos mencionar a los **pesticidas organofosforados**, tales como el paratión y el gas sarín. Provocan convulsiones y SE, seguidos de neurodegeneración en la amígdala, el hipocampo, la corteza piriforme y el tálamo e incluso provoca muerte<sup>92</sup>. Estos compuestos son de interés médico y social debido a que se utilizan en agro cultivos, lo cual puede afectar a poblaciones humanas cercanas a los sitios fumigados.

## b) **Inducción no farmacológica del Status epilepticus:**

1) **Estado epiléptico febril experimental:** Es un modelo de convulsiones febriles, similar al que se registra en bebés y niños pequeños. Sin embargo, en animales no humanos, las convulsiones son inducidas por **hipertermia** y no por fiebre, como en la condición humana, lo que puede implicar mecanismos diferentes. Además, se requieren medidas para evitar quemaduras por hipertermia<sup>91,92,106</sup>.

2) **Estimulación eléctrica:** existen diversos protocolos de estimulación eléctrica pero en general reproducen características epileptogénicas en el cerebro con baja mortalidad y alta reproducibilidad. Sin embargo, los protocolos de estimulación pueden resultar laboriosos ya que requieren de la implantación de electrodos<sup>91,92,107-110</sup>. Uno de los

modelos más utilizados y que se mencionan con frecuencia en esta tesina es el denominado **kindling** que se basa en el postulado de que una convulsión aumenta la posibilidad de que ocurra otra convulsión. Para ello, se utiliza una estimulación eléctrica repetitiva y subconvulsiva de determinadas regiones del cerebro lo cual inicia las descargas epileptogénicas, estas van incrementando en duración tras la repetición diaria de estímulos eléctricos, progresando finalmente a una actividad convulsiva espontánea<sup>111</sup>.

- 3) **Lesiones cerebrales:** Las causas más comunes de epilepsia adquirida en humanos adultos son las lesiones cerebrales traumáticas, los accidentes cerebrovasculares y las infecciones del SNC<sup>112</sup>, por lo tanto estos modelos tienen gran relevancia para el desarrollo de terapias. En animales los traumas se generan por **hipoxia, isquemia neonatal, lesión por percusión** y la epilepsia es una consecuencia asociada a los daños previamente producidos en el cerebro. Dada la alta heterogeneidad de las **lesiones cerebrales traumáticas** en humanos, los modelos animales también son diversos, difíciles de replicar y ninguno de ellos recapitula completamente el síndrome humano<sup>91,92,113</sup>.

### c) Organismos genéticamente modificados (OGM)

Los modelos de SE descritos anteriormente no representan la etiología de aproximadamente dos tercios de las convulsiones de origen genético, por esto es importante generar modelos que contemplen alteraciones en genes vinculados a la epileptogénesis. Los **modelos genéticos de epilepsia** disponibles presentan convulsiones espontáneas, como en los humanos, y su uso puede aumentar el potencial de detección de terapias para las epilepsias resistentes a los fármacos<sup>114</sup>.

Los roedores han sido hasta el momento, las especies más utilizadas, debido a la relativa facilidad de modificar el genoma<sup>80</sup>, pero se han sumado una gran **diversidad de especies** a los modelos genéticos de SE que incluyen: *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y el pez cebra. Sin embargo, los sistemas nerviosos de estos animales son mucho más sencillos y la distancia filogenética que las separa del ser humano limita su uso como modelos traslacionales



a la patología humana<sup>115</sup>. A continuación se hará una breve reseña sobre algunos modelos genéticos de SE, en la **Tabla 1 (ANEXO)** se listan otras cepas utilizadas con este fin:

Dentro de las mutaciones dirigidas, podemos encontrar modelos con mutaciones **knockout (cKO)** homocigotas o heterocigotas del gen **Tsc**. **Tsc1** y **Tsc2** son genes patogénicos del **TSC (complejo de esclerosis tuberosa)**, una de las causas genéticas más comunes de epilepsia<sup>25,116</sup>. Por otro lado, encontramos modelos relevantes para las epilepsias genéticas que han sido inducidas por compuestos químicos, como el **MNU (N-Methyl-N-nitrosourea)** y **ENU (N-Etil-N-nitrosourea)**. El MNU genera una mutación sin sentido en el gen del canal de  $Ca^{+2}$ , ***Cacna1a*** que genera trastornos neurológicos que incluyen convulsiones<sup>117,118</sup>. En tanto que **ENU** induce mutaciones en el gen ***Kcna1***, que codifica para la subunidad  $\alpha$  del canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.1, dando lugar a la ataxia episódica tipo 1, trastorno con epilepsia asociada. ENU también genera mutaciones en el gen ***scn1a*** del canal Nav1.1 de  $Na^{+}$ , que se asocian a un síndrome de epilepsia generalizada con convulsiones febriles<sup>112,114,119</sup>.

Recientemente, se demostró que **pez cebra mutante *scn1Lab*** recapitula las convulsiones asociadas al síndrome de Dravet<sup>117</sup>. Si bien estas mutaciones generan fenotipos similares a los observados en humanos, ninguna está dirigida a un tipo celular específico del SNC<sup>116</sup>. Por otra parte, estas mutaciones presentan la desventaja de tener baja penetrancia y producen la muerte prematura de los individuos mutantes homocigotas<sup>25,112</sup>.

Además de los animales modificados genéticamente para provocar SE, se han desarrollado animales que sobre-expresan neurotrofinas en astrocitos o en neuronas<sup>4</sup> o con expresión reducida o nula de receptores de neurotrofinas<sup>4,120,121</sup>. Los astrocitos también son blanco de manipulaciones genéticas y los investigadores han usado los genes ***Gfap***, ***Aldh1l1***, ***Slc1a3*** y ***Gjb6*** como marcadores para los astrocitos. Usando los promotores de estos genes se pueden expresar selectivamente proteínas en astrocitos que permiten monitorear y manipular a estas células y eventualmente intervenirlas con fines terapéuticos<sup>122</sup>. Estos animales permiten estudiar *in vivo* la contribución de cada tipo celular y de las neurotrofinas a la epileptogénesis y a la neurodegeneración asociada al SE inducido por otros métodos.

## ¿El desbalance en la expresión de receptores de neurotrofinas puede explicar la muerte neuronal inducida por SE?

### Expresión de neurotrofinas maduras inducidas por *Status Epilepticus*

Desde hace tiempo se conoce que la expresión de neurotrofinas en el cerebro aumenta significativamente luego a las convulsiones inducidas por medio de diferentes modelos experimentales<sup>123</sup>. Esto provoca una alteración en la comunicación celular mediada por factores tróficos que puede tener un rol en los cambios estructurales y bioquímicos que se observan luego de las convulsiones, contribuyendo de esta forma con la etiología de la epilepsia<sup>124,125</sup>. Otros factores tróficos, tales como **VEGF**, **FGF-2**, **GDNF**, también estarían involucrados en algún aspecto del SE<sup>126</sup>. Sin embargo, las evidencias más contundentes, incluyendo trabajos de nuestro laboratorio, sostienen que **BDNF**, **NGF** y sus precursores tendrían un rol preponderante, por ello, la mayor parte de esta sección estará destinada a estas neurotrofinas.

La hiperactivación neuronal, característica de la epilepsia puede ocurrir en cualquier área del cerebro, pero se ha observado que los pacientes muestran alteraciones cognitivas debido al daño en el **hipocampo** producto de la reorganización de las redes neuronales<sup>127</sup>. Por ello, la mayor parte de los estudios *in vitro e in vivo* sobre epilepsia o SE exploran principalmente las consecuencias sobre el hipocampo o áreas límbicas relacionadas.

Los primeros trabajos que vincularon a **BDNF** y **NGF** con la epilepsia, se llevaron a cabo en ratas sometidas a un protocolo de *kindling* en el hipocampo. Estos estudios demostraron que el **ARNm** de ambas neurotrofinas aumenta en la corteza piriforme y el área CA1 y giro dentado (DG) del hipocampo dorsal, entre las 2 y 4h posteriores al *kindling*<sup>128</sup>. La administración sistémica de **ácido kaínico** también provocó incrementos muy elevados en el ARNm de *bdnf* entre 1 y 14 días pos-SE en CA1, CA3, DG y moderados en la corteza parietal, piriforme y entorrinal los cuales se correlacionaron con el daño tisular observado en estas mismas áreas<sup>49,129</sup>. El SE inducido por **pilocarpina** también provocó un incremento en el ARNm de BDNF y en el receptor TrkB en hipocampo dorsal, neocorteza, corteza piriforme, amígdala, tálamo y cuerpo estriado, mientras que el incremento del ARNm de NGF se limitó a la capa granular del hipocampo<sup>130</sup>. Estos trabajos muestran que el cambio en el perfil temporal de expresión de los ARNm de estas neurotrofinas es similar en varios modelos experimentales de SE.

El aumento en la expresión del ARNm de BDNF y/o NGF no necesariamente se refleja en cambios en sus proteínas en el mismo sentido, magnitud y curso temporal<sup>131</sup> ya que éstas se sintetizan como pre-pro-neurotrofinas (**Fig. 2**) que pueden ser procesados a neurotrofinas maduras en diferente proporción dependiendo de las condiciones fisiopatológicas de las células<sup>132</sup>. Trabajos de nuestro laboratorio, así como de otros investigadores han demostrado que, efectivamente, ocurre un **incremento** en la expresión de la **proteína BDNF** y **NGF** luego del SE y la hiperactivación neuronal *in vitro*<sup>132-135</sup>. Las consecuencias del incremento de los niveles **BDNF** en la etiología de la epilepsia está ampliamente documentada aunque se encuentran resultados contradictorios. Así, por ejemplo, se ha visto que, la inyección de un vector viral que expresa una combinación de **FGF-2** y **BDNF** en el hipocampo lesionado después del SE inducido por **pilocarpina** es neurogénico, reprime el daño neuronal y la epileptogénesis<sup>136</sup> y aumenta la actividad GABAérgica sugiriendo un **efecto antiepiléptico**<sup>137</sup>. En cambio, la activación de la señalización **BDNF/TrkB** incrementa la **epileptogénesis** inducida por **ácido kaínico** así como también la dispersión de la capa de células granulares del hipocampo, una característica anatómica observada en pacientes epilépticos<sup>49</sup>.

### **Expresión de proneurotrofinas inducidas por *Status Epilepticus***

El desarrollo de anticuerpos capaces de distinguir la expresión de **pro-neurotrofinas** de las formas maduras, abrió un debate acerca de qué **neurotrofina/s** se expresaban luego del **SE**. Debido a que muchos de los anticuerpos utilizados hasta hace unos años reconocían a ambas isoformas, probablemente, resultados atribuidos a neurotrofinas maduras, realmente correspondían a las pro-neurotrofinas.

Se demostró que la expresión de **pro-NGF** ocurre en ratas 24h después del SE inducido por ácido kaínico en el cerebro basal anterior<sup>120,138,139</sup> y en hipocampo<sup>140</sup> y, el uso de anticuerpos contra pro-NGF<sup>138</sup> o contra pro-BDNF<sup>48</sup> administrados en el hipocampo pos-SE inhibe la muerte neuronal en esta área. Sin embargo, VonDran y cols. (2014)<sup>141</sup> encontraron que luego del SE inducido por ácido kaínico o pilocarpina en ratones, incrementa **NGF** y **BDNF maduros**, el receptor **p75** y **pro-BDNF** pero no **pro-NGF** indicando que podrían existir diferencias en los mecanismos activados por SE en ratas y ratones.

Las evidencias respecto a la expresión de **pro-BDNF** luego del SE son más contundentes en roedores tratados con **pilocarpina**. Se han observado incrementos de pro-BDNF en hipocampos de ratas y ratones, entre las 12 y 72h pos-SE y se mantienen elevados hasta 7 o 10 días<sup>4,21,35,46,48,138</sup>. Por el contrario, Ullal y cols (2007)<sup>142</sup> demostraron que el **kindling hipocampal** en ratas provoca un incremento en la expresión de BDNF, mientras que los niveles de proBDNF no cambian. Si bien es esperable que los incrementos de BDNF sean acompañados por aumentos en su precursor proBDNF, estos autores postulan que la pro-neurotrofina es rápidamente procesada por **enzimas** asociadas con el *kindling*.

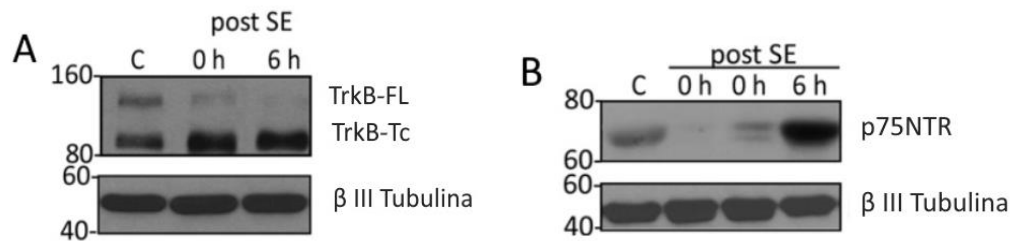
El procesamiento anormal de las pro-neurotrofinas también contribuye a la neurodegeneración asociada a diferentes patologías<sup>143</sup> y podría explicar por qué ocurre el **desbalance en los niveles de neurotrofinas maduras y pro-neurotrofinas** que se observa luego del SE (el procesamiento de las proneurotrofinas se esquematiza en la **Fig. 2** en la sección “**Neurotrofinas y sus receptores**”). El **incremento extracelular** de pro-NGF que se observa luego del SE inducido por ácido kaínico, es producido por la disminución de la actividad enzimática de la metaloproteinasa de matriz-7 (**MMP-7**). Esta disminución se debe al incremento de su inhibidor, el inhibidor tisular de la metaloproteinasa de matriz 1 (**TIMP-1**)<sup>140</sup>.

Un análisis de la maquinaria proteolítica que escinde a proBDNF mostró que el SE, en ratones, disminuye la actividad del activador de **plasminógeno** e incrementa el inhibidor del activador de plasminógeno (**PAI-1**), un inhibidor del procesamiento extra e intracelular de pro-BDNF<sup>35</sup>. Estos antecedentes sugieren que los incrementos en neurotrofinas maduras y proneurotrofinas asociados al SE dependen de la expresión y del procesamiento postraduccional intra y extracelular de estas proteínas.

### **El (des)balance de receptores de neurotrofinas en la neurodegeneración asociada al *Status Epilepticus***

A pesar de la variedad de fenotipos, muchas enfermedades neurodegenerativas comparten como característica, la **desregulación de las neurotrofinas y sus receptores**<sup>36</sup>. El desequilibrio en la expresión de neurotrofinas y sus receptores, puede traer como consecuencia una alteración de la señalización trófica mediada por los **receptores Trk** y aumentos en la actividad pro-apoptótica mediada por **p75<sup>NTR</sup>**. En este sentido, se demostró *in vitro* que la unión de proNGF

al **complejo receptor/co-receptor p75/sortilina**, inhibe la activación de las vías de señalización activadas por BDNF/TrkB<sup>139</sup>. Por otra parte, trabajos realizados en nuestro laboratorio y de otros grupos muestran que el desbalance de receptores de neurotrofinas sería responsable de los efectos neurodegenerativos asociados al SE. En el SE, el **incremento en p75<sup>NTR</sup>** es una característica que se observa en modelos *in vivo*<sup>46,132,135</sup> y en modelos *in vitro* de hiperactivación neuronal<sup>146,87</sup>. Este receptor media la muerte neuronal cuando interactúa con el correceptor sortilina<sup>37,144,145</sup> y el tratamiento con **pilocarpina** en ratas **incrementa** la interacción **p75<sup>NTR</sup>/sortilina**<sup>99</sup>, así como también promueve la unión de p75<sup>NTR</sup> a BDNF<sup>21</sup> y a proBDNF<sup>46</sup>. Por otra parte, los niveles de TrkB disminuyen en hipocampo luego del SE<sup>21,46,48</sup>. El incremento en la expresión de **p75<sup>NTR</sup>** y la disminución de **TrkB** también se observó en neuronas hipocampales en cultivo sometidas a hiperactivación neuronal utilizando un buffer libre de Mg<sup>+2</sup> (**Figura 8, A**)<sup>87</sup>. La **disminución de TrkB-FL** se acompañó de un **incremento en su isoforma truncada** en axones y dendritas que se origina como resultado del procesamiento mediado por **calpaína**. Este **desbalance** entre los receptores **TrkB-FL/TrkB-TC** sería responsable de la neurodegeneración. Es así que la inhibición de la actividad de calpaína, no solo previene el procesamiento de TrkB-FL sino que también atenúa la neurodegeneración<sup>87</sup>.



**Fig. 8. El SE *in vitro* afecta los niveles de las isoformas de TrkB y p75<sup>NTR</sup>.** Los cambios se midieron a las 0 y 6h luego del SE. A) WB representativo de la expresión de TrkB-FL y TrkB-TC. B) p75<sup>NTR</sup>. *Imagen tomada y modificada de Danelon et al. 2016*<sup>87</sup>.

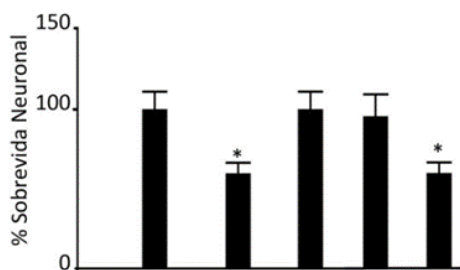
Los resultados revisados hasta aquí demuestran que el **SE** produciría una disminución de TrkB-FL, un incremento de p75<sup>NTR</sup> y un aumento en BDNF y pro-BDNF. Si bien ambas neurotrofinas incrementan pos-SE, solo pro-BDNF sería responsable de la muerte neuronal que se observa luego del tratamiento con pilocarpina. Por el contrario, BDNF sería necesario para sostener la supervivencia de neuronas hipocampales en este contexto de citotoxicidad<sup>46</sup>.

## ¿Qué rol cumplen las neurotrofinas en la comunicación astrocitos-neuronas en la neurodegeneración inducida por SE?

El *Status Epilepticus*, provoca una marcada reactividad astrogial que va acompañada de alteraciones en la expresión de neurotrofinas y sus receptores. En astrocitos de **hipocampo** y **cerebro basal anterior** de roedores se observa un incremento de **pro-NGF** y **pro-BDNF** luego del tratamiento con ácido kaínico<sup>120</sup> o pilocarpina<sup>138</sup> y esto podría contribuir con la muerte neuronal. En cambio, en modelos *in vitro* de SE, como la administración de pentilenotetrazol, la secreción de BDNF en astrocitos disminuye<sup>146</sup>. El pro-BDNF, el BDNF astrocítico y su receptor TrkB han sido relacionados con la epileptogénesis y la delección de BDNF o TrkB reduce las descargas neuronales en ratones tratados con pilocarpina<sup>4</sup>. Por otra parte, la expresión del receptor p75 también incrementa en astrocitos luego del SE provocado por pilocarpina. Pero a diferencia de lo que ocurre en neuronas, los astrocitos no mueren sino que la activación de p75<sup>NTR</sup> retrasa la proliferación lo cual podría frenar la gliosis asociada al SE<sup>74</sup>. Además, p75<sup>NTR</sup> media la internalización de pro-BDNF en astrocitos, para ser procesado a BDNF maduro y liberado como tal, de esta forma, los **astrocitos** podrían **atenuar los niveles de pro-BDNF** disponibles<sup>147</sup>.

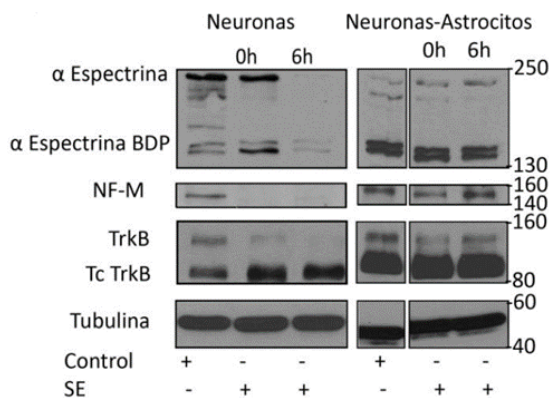
Estos resultados muestran un **escenario complejo** donde los astrocitos y los cambios en la expresión de neurotrofinas parecen tener un **rol dual** en la epileptogénesis y la neurodegeneración vinculada al SE. Para dilucidar los mecanismos que subyacen a la **comunicación neuronas-astrocitos en el contexto del SE** en nuestro laboratorio se investigó el rol de estas células gliales sobre la supervivencia de neuronas sometidas a hiperactivación por eliminación de Mg<sup>+2</sup> en el medio de incubación. Tal como se mencionó anteriormente, la hiperactivación neuronal indujo neurodegeneración, pero la presencia de astrocitos en los cultivos tuvo un efecto neuroprotector, retrasando la muerte neuronal (**Figura 9**)<sup>87</sup>. Otros estudios han demostrado que los astrocitos, a través de la liberación de gliotransmisores, pueden modular la actividad del receptor de **NMDAr** y así, alterar el ingreso de Ca<sup>+2</sup> intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) en las neuronas<sup>148</sup>. Así, los astrocitos regularían indirectamente la actividad de **calpaína** (cuya actividad es calcio-dependiente) y consecuentemente la **degradación de TrkB**. En línea con esta hipótesis, se observó que los astrocitos modulan la actividad de calpaína ya que en co-cultivos de neuronas-astrocitos disminuyó significativamente la degradación de los sustratos de esta enzima: **α-espectrina**, **el neurofilamento M** y el receptor **TrkB** (**Figura 10**).

De esta forma, el efecto neuroprotector de los astrocitos podría estar mediado por la inhibición de la calpaína lo cual evitaría la degradación de TrkB a su forma truncada. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en nuestro laboratorio y por otros grupos que sostienen que la neurodegeneración inducida por el SE se asocia al desbalance en la expresión de **TrkB-FL/p75<sup>NTR</sup>**, así, podríamos pensar en diferentes estrategias de neuroprotección basadas en el restableciendo el balance fisiológico de estos receptores, tal como mencionaremos algunos ejemplos en la sección “Perspectivas sobre estrategias de neuroprotección pos-SE y diagnóstico” de la Discusión.



**Fig. 9. La presencia de astrocitos induce neuroprotección.** Cuantificación de la sobrevivida neuronal. *Imagen tomada de Danelon et al., 2016<sup>87</sup>.*

Control (Neu)	+	-	-	-	-
Control (Neu/Ast)	-	-	+	-	-
SE (Neu) 12h	-	+	-	-	-
SE (Neu/Ast) 12h	-	-	-	+	-
SE (Neu/Ast) 24h	-	-	-	-	+



**Fig. 10. La presencia de astrocitos inhibe la actividad de calpaína y evita la degradación de TrkB.** El WB representativo mostrando los niveles de  $\alpha$ -espectrina y su producto de degradación (BDP, por sus siglas en inglés “break down product”), neurofilamento M (NF-M) y TrkB en cultivos de neuronas puras y en co-cultivos. *Imagen tomada de Danelon et al., 2016<sup>87</sup>.*

## ¿Qué rol cumplen las VE en la comunicación astrocitos-neuronas en condiciones patológicas?

Tanto las neuronas como la glía del sistema nervioso liberan VE<sup>149</sup>, que pueden pasar a la circulación sistémica por transferencia directa a los capilares o a través del líquido intersticial hacia el líquido cefalorraquídeo<sup>150</sup>. En varios experimentos, las VE aisladas de fluidos corporales como la **sangre** y el **líquido cefalorraquídeo** contienen **marcadores específicos** de las neuronas o de la glía, tales como sinaptotagmina y sinaptofisina, presentes en inmunoprecipitados de exosomas derivados del plasma<sup>151</sup>. Dentro del sistema nervioso, las VE pueden ser secretadas por un tipo de célula y dirigidas a otro<sup>149</sup>, y se sugiere que están implicadas en múltiples funciones a través de la transferencia no sólo **componentes de membrana** sino también de **ácidos nucleicos**, lo que pone de manifiesto la relevancia de su papel en la **comunicación intercelular**.

La demostración de que diversas proteínas asociadas a patologías, como los priones, el péptido amiloide, Tau y  $\alpha$ -sinucleína se encuentran presentes dentro de las VE, apunta a la noción de que las VE contribuyen a la **patogénesis** de muchos trastornos primarios del SNC, tales como las enfermedades neurodegenerativas<sup>60,70</sup>. La bibliografía indica que en el sistema de comunicación mediado por VE, los astrocitos no sólo responden a los estímulos y condiciones secretando VE con cargas seleccionadas, sino que también están influenciados por VE secretadas por otras células<sup>70</sup>. En base a estos antecedentes y teniendo en cuenta la relevancia de los astrocitos en la regulación del SNC, nos enfocaremos en la revisión de la comunicación establecida mediante la liberación de VE por los astrocitos (**VEA**) teniendo a las neuronas como células blanco de acción.

Como células secretoras, los **astrocitos en reposo** liberan un gran número de VE que pueden regular la neurogénesis, la angiogénesis y la neuroprotección *in vitro*. Además, bajo estimulación en condiciones patológicas o de envejecimiento, los **astrocitos reactivos** secretan más VE con contenidos alterados de proteínas y miRNA<sup>56</sup>.

Las primeras pruebas de la función neurotrófica de las VE provienen de estudios sobre **VE derivadas de astrocitos (VEA)** que contienen la proteína **sinapsina-I**. El trabajo realizado por Wang y col. 2011<sup>62</sup> demostró que las VEA promueven el crecimiento de neuritas en neuronas del hipocampo y aumentan la supervivencia de neuronas corticales tras el tratamiento con



peróxido de hidrógeno o la privación de oxígeno/glucosa durante experimentos de cocultivo<sup>62</sup>. Así mismo una década atrás, cuando la investigación sobre VE se encontraba en una fase inicial con muy poca información sobre su posible papel regulatorio tanto en la homeostasis como en la patología, y en particular respecto a señales intracelulares que rigen la clasificación de una proteína de carga específica a las VE, se demostró que las VEA contienen un transportador de glutamato extracelular (**EAAT-1**) funcional. Este grupo mostró también el enriquecimiento de EAAT-1 en las VE depende de la activación de **PKC** y confirmó, *in vivo*, que la astrogliosis en la médula espinal está asociada a la activación de PKC y el enriquecimiento de **EAAT-1** y **EAAT-2** en las VEA<sup>152</sup>. Esto tendría una importancia considerable para mantener la homeostasis neuronal, mediante la reducción de la excitotoxicidad, en neuropatologías como la epilepsia.

Otra de las proteínas presentes en las VEA es la proteína de choque térmico **Hsp70**, liberada en el espacio extracelular por astrocitos metabólicamente activos principalmente a través de VE. Hsp70 cumple funciones de protección celular en condiciones de estrés a través de la estabilización de péptidos desplegados, y en neuronas previene la activación de apoptosis e inmunorregulación. La incorporación de esta proteína a VEA está regulada por condiciones de estrés generadas en el microambiente astrocítico, lo cual en última instancia tendría implicancias en la supervivencia de las neuronas vecinas<sup>153</sup>.

Un trabajo más reciente utilizando líneas celulares humanas astrocíticas y neuronales diferenciadas, mostró que **Apolipoproteína D (ApoD)** es transportada exclusivamente por VE desde los astrocitos a las neuronas, donde se internaliza, y que medios condicionados de astrocitos derivados de **animales KO** para ApoD ejercen sólo una **protección autocrina parcial** frente al estrés oxidativo<sup>154</sup>. Asimismo, fue demostrado que los **procesos astrocíticos** aislados de la **corteza cerebral** de ratas adultas y los procedentes de co-cultivos astrocitos-neuronas, liberan **exosomas** que son internalizados selectivamente por las neuronas y les transfieren una proteína (**neuroglobina**) de origen astrocítico<sup>69</sup>. Un paso más lejos fue un grupo que profundizó en relación a los **mecanismos** mediante los cuales las VEA inducen la formación de espinas dendríticas y sinapsis de neuronas corticales primarias. Identificaron a **fibulina-2** como una proteína cargo clave de las VEA, la cual activa la vía de señalización de **TGF-β** en neuronas promoviendo la sinaptogénesis<sup>58</sup>.

## ¿De qué forma las VE liberadas por astrocitos podrían regular la expresión de neurotrofinas en neuronas?

Finalmente, también se demostró la presencia de **factores tróficos** presentes en VEA. Poia y col. 2008 detectaron el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (**FGF-2**) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (**VEGF**) en VE derivadas de cultivos primarios de astrocitos de rata “*naive*” y sugieren su posible participación en una amplia variedad de funciones en el cerebro, y también su potencial **aplicación terapéutica** para promover la reparación después de una lesión o enfermedades tales como la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y la epilepsia<sup>155</sup>.

Recientemente se demostró la participación de BDNF en la comunicación neurona-astrocitos mediada por VEA. Penning y cols<sup>45</sup>, estudiaron la toxicidad inducida por la exposición a **compuestos anestésicos** en neuronas humanas inmortalizadas. Demostraron que la **ketamina** moduló diferentes componentes de la vía del BDNF, y sugieren a la **vía BDNF/pro-BDNF** como una de las principales involucradas y a las VE como posibles mediadores de la neurotoxicidad de la ketamina<sup>45</sup>. Otro estudio demostró que las VE de astrocitos contienen pro-BDNF, cuyos efectos podrían ser neuroprotectores o pro-apoptótico dependiendo de si las VEA habían sido liberado de células saludables o necroptóticas<sup>156</sup>.

Aunque en este trabajo de revisión nos enfocamos sobre la participación de **proteínas** en las **VEA**, dejamos una breve mención referida a la presencia de miARN en VE, cuyos roles en la regulación celular continúan en creciente investigación y descubrimientos.

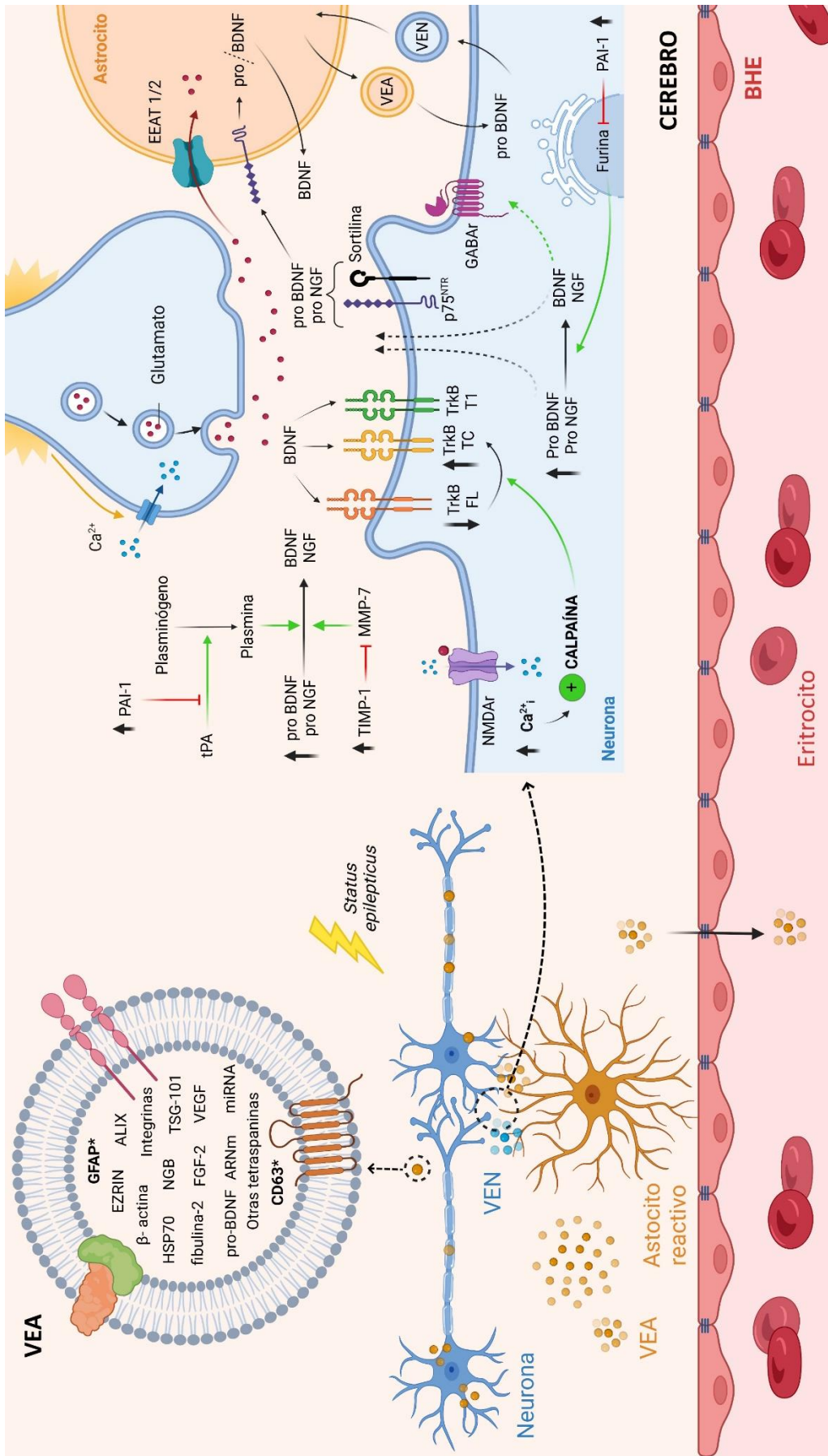
El entorno protegido y **libre de RNasas** de las VE proporciona una ventaja especial para el transporte intercelular de microARN (**miARN**). La carga de miRNAs en exosomas, que conduce a un enriquecimiento de algunos miRNAs en comparación con sus células de origen, estaría mediado por mecanismos que incluyen: la presencia de secuencias específicas de miRNAs (como miRNAs uridilados y “EXOmotifs”); la unión de miRNAs a regiones tipo balsas lipídicas en la cara citoplasmática de la membrana limitante del cuerpo multivesicular; y las interacciones con proteínas tales como ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas sumoiladas o Ago2<sup>157</sup>. Sin embargo, se desconoce si la inclusión dependiente de un estímulo tiene lugar en

la carga particular de miARN en las VEA en condiciones fisiológicas o patológicas. Asimismo, se sabe muy poco sobre los efectos de determinados miARNs de las VEA en la función neuronal, aunque ya existen evidencias que sugieren a los miRNA como moduladores de la actividad de las neuronas a través de la regulación de la expresión traduccional de proteínas que controlan los programas transcripcionales esenciales para la función sináptica y la excitabilidad neuronal. En esta línea y asociado al rol de las neurotrofinas se demostró en cultivos primarios de neuronas de hipocampo expuestos a VE derivadas de astrocitos tratados con citoquinas pro-inflamatorias (**IL-1 $\beta$**  y **TNF- $\alpha$** ), que **miR-125a-5p** y **miR-16-5p** redujeron la expresión del receptor de neurotrofinas TrkC y su efector río abajo **Bcl2**. Este efecto se asoció con reducciones en el crecimiento y la complejidad dendrítica, en las tasas de espigas de potenciales de acción y en las ráfagas de disparos de neuronas<sup>52</sup>. Asimismo, otros autores han propuesto que exosomas derivados de astrocitos cargados de miRNAs, tales como **miR-26a**, están desregulados en varias enfermedades del SNC, y los sugieren como mecanismos de control de la morfología neuronal y la transmisión sináptica<sup>157</sup>.

En base a la información recopilada a partir del compendio total de artículos revisados, cabe mencionar que la literatura en relación a la participación de las VE en una diversidad de mecanismos de comunicación intercelular no deja de crecer. En este trabajo, que hace foco en la comunicación entre dos tipos celulares del SNC, nos limitamos a volcar la bibliografía referida a la incipiente información sobre la forma en que las **VE de los astrocitos median efectos sobre las neuronas**. En la sección de discusión, incluiremos algunas cuestiones asociadas a las implicancias y proyecciones que esta información podría tener en relación a sus aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

De esta manera, a partir de los resultados discutidos anteriormente se elaboró un modelo que explicaría los mecanismos por los cuales los astrocitos protegen a las neuronas luego del SE (**Figura 11**) y en el siguiente enlace:

<https://drive.google.com/drive/folders/1KCzOrieMnkzItqiU4vc10QkayAtmWVMd?usp=sharing>



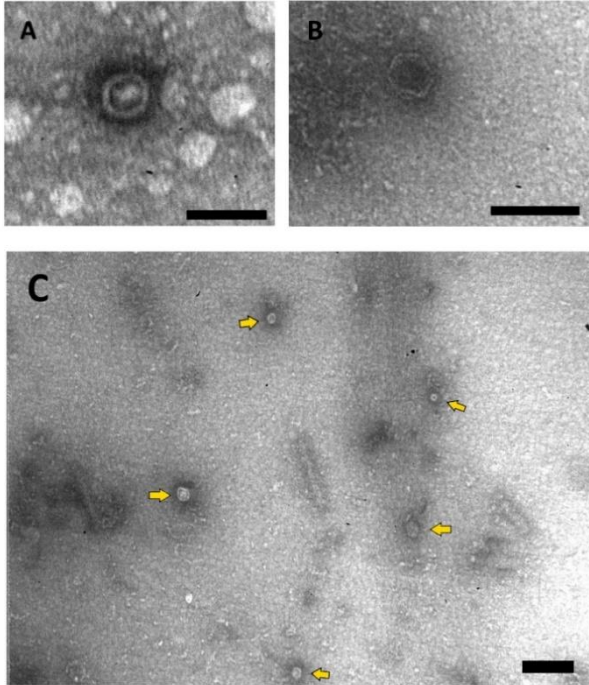
**Fig. 11. Comunicación neuronas-astrocitos en un modelo de neurodegeneración inducido por SE.** El daño excitotóxico producido por el SE induce la expresión de p75<sup>NTR</sup> en neuronas y astrocitos. Además, aumenta la expresión de las proneurotrofinas (pro-BDNF y pro-NGF) debido a una deficiencia en la maquinaria que las procesa intra y extracelularmente, particularmente disminuye la actividad del activador de plasminógeno, incrementa PAI-1 y se inhibe MMP-7. La hiper-despolarización neuronal provocada por el glutamato liberado luego del SE activa los receptores NMDA provocando un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . En estas condiciones, la calpaína se activa escindiendo a su sustrato, el receptor TrkB. Esto lleva a una disminución en los niveles de TrkB-FL y un incremento en TrkB-TC. Los astrocitos, inhiben la actividad de calpaína, por mecanismos no descritos, y consecuentemente, previenen la degradación del receptor TrkB-FL. Además, el pro-BDNF podría unirse al p75<sup>NTR</sup>, procesarlo intracelularmente y liberar BDNF. Las VE liberadas por astrocitos contienen un “carga” común al de vesículas liberadas por otros tipos celulares que incluye lípidos, miARN, ARNm, proteínas como HSP70, Alix, Ezrin, integrinas, tetraspaninas, actina, CD63, etc. El cargo también incluye proteínas propias de los astrocitos como GFAP. Dependiendo de las condiciones patológicas las VE de astrocitos pueden contener factores tróficos, entre ellos FGF-2, VEGF con efectos neuroprotectores o pro-BDNF con efectos apoptóticos sobre las neuronas. Estas VE pueden llegar a fluidos como la sangre o el LCR a partir de los cuales pueden ser aisladas. *En negrita se indican las proteínas que se detectaron experimentalmente en esta tesina.*

A partir de los trabajos realizados en nuestro laboratorio y en base a los antecedentes expuestos, planteamos la **hipótesis general** que postula que *los astrocitos “naive” expresan proteínas marcadoras, específicas de VE y del tipo celular del cual derivan y se unen a neuronas en cultivo.*

## **Caracterización de vesículas extracelulares de astrocitos**

### **1. Los astrocitos liberan VE que exhiben características de exosomas**

Las VEA liberadas al medio condicionado se analizaron por microscopía electrónica de transmisión. Se observaron muestras provenientes de un volumen de 100 ml de medio condicionado, el cual fue concentrado por ultracentrifugación hasta un volumen final de unos 120  $\mu$ l. Las muestras se observaron en un aumento que varió de 60.000x a 100.000x, confirmándose la presencia de **VE** en medio condicionado de astrocitos obtenidos a partir de hipocampo. Las VE se identificaron por la presencia de una doble membrana (**Figura 12, A**) que las delimita así como también la característica apariencia en forma de copa, cuenco (similar a como se observan los glóbulos rojos) (**Figura 12, B**). Además se observó una baja concentración y un tamaño homogéneo (**Figura 12, C**)



**Fig. 12. Vesículas extracelulares derivadas de astrocitos por MET.** A) Microfotografía de exosomas con doble membrana (aumento: 129.300x, barra: 50nm). B) Microfotografía de exosoma con típica forma de copa (aumento: 77.500x, barra: 100nm). C) Microfotografía de numerosos exosomas (señalados por flechas) de similar tamaño en un mismo campo (aumento: 77.500x, barra: 100nm).

El análisis de **24 micrografías** obtenidas arrojó un total de **52 VE**. El diámetro promedio de las mismas fue igual a **28±1,58 nm**. No obstante, el análisis de las fracciones de VE mostró cierta heterogeneidad en el tamaño: La fracción más abundante se correspondió con VEA con un rango que varió entre 15 a 25 nm, las cuales representaron el 48,08% de la muestra. En segundo y tercer lugar, se encontraron vesículas de entre 25 a 35 nm y de más de 35 nm en una proporción de 28,85% y 21,15% respectivamente. Juntos, estos grupos representan el otro 50% de la muestra. Excepcionalmente, encontramos VE por debajo y encima de estos rangos, midiendo 14,45 nm la VE de menor tamaño y 68 nm la de mayor diámetro. Sin embargo, dado el pequeño tamaño de la muestra (n=52) no se pudo realizar una distribución estadística del tamaño. En el futuro, tenemos previsto continuar con este estudio y ampliar el tamaño muestral.

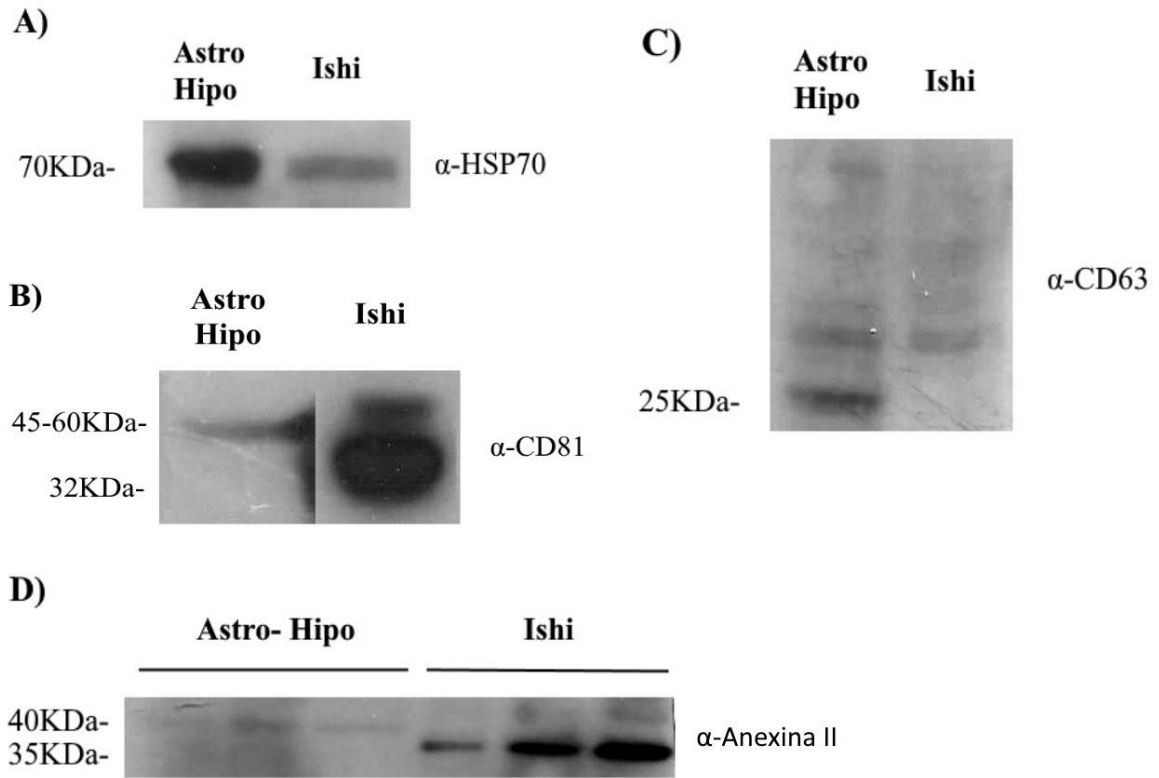
De esta forma, pudimos obtener VEA que muestran las características típicas de **exosomas** (de pequeño tamaño)<sup>55,56</sup>. Por lo tanto, confirmamos la presencia de exosomas como potencial vía de comunicación bajo condiciones fisiológicas, pero no de cuerpos multivesiculares (CMV).

## 2. Los astrocitos y las VEA expresan marcadores de VE

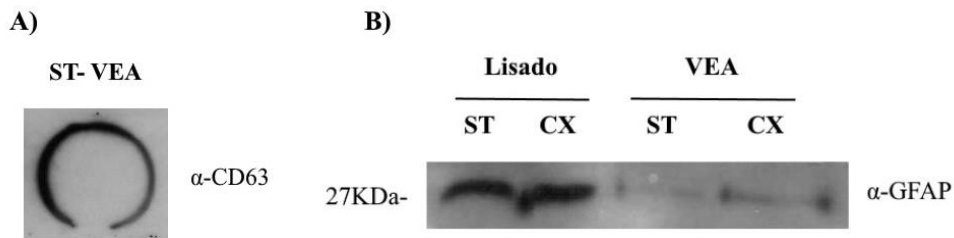
Los lisados de homogenatos celulares totales y las VE de astrocitos de distintas regiones del cerebro se analizaron mediante Western blot y dot blot con el **objetivo** de encontrar **marcadores específicos de VE**. En el caso del análisis de VE, no solo se estudiaron con la intención de hallar marcadores específicos de VE sino también marcadores que indiquen un **origen astrocitario**.

En primer lugar, se evaluó la presencia de marcadores específicos de VE bien caracterizados en lisados de **astrocitos de hipocampo** y en **células Ishikawa** que fueron utilizadas como control positivo<sup>77</sup>, dado que estas células se caracterizan por ser grandes secretoras de VE. El análisis de los blots (**Figuras 13. A, B, C**) mostró en ambos lisados celulares la expresión de las proteínas **HSP70**, **CD63**, **CD81** y **Anexina II**, marcadores establecidos por las recomendaciones de la Sociedad internacional de Vesículas Extracelulares<sup>158</sup>.

Para confirmar lo antes mencionado, se procedió a evaluar ya sea por Western blot como por dot blot la presencia de estos marcadores en las VE de astrocitos. En esta ocasión, se utilizó también la técnica de dot blot para la detección de estas moléculas debido a la baja sensibilidad del Western Blot para revelar los marcadores, los cuales se encontraban en baja concentración en la muestra y provenían de un volumen de medio condicionado menor al que reportan otros trabajos para el análisis de los mismos<sup>159,160</sup>. En las VE de astrocitos se detectó la presencia de **CD63 (Figura 14, A)**, proteína utilizada para identificar VE. No obstante, un hallazgo de gran relevancia fue la positividad de las VEA para **GFAP (Figura 14, B)**. La proteína ácida fibrilar glial o GFAP, filamento intermedio de tipo III es expresada principalmente en astrocitos maduros pero no en otros tipos de células gliales o nerviosas del SNC<sup>161</sup>.



**Figura 13. Expresión de marcadores específicos de VE en lisados totales de astrocitos por Western blot.** A) Western blot representativo mostrando la expresión de HSP70, B) CD81, C) CD63 y D) Annexina A2 en lisados de astrocitos y en células de la línea Ishikawa utilizadas como control positivo de la expresión de estas proteínas.



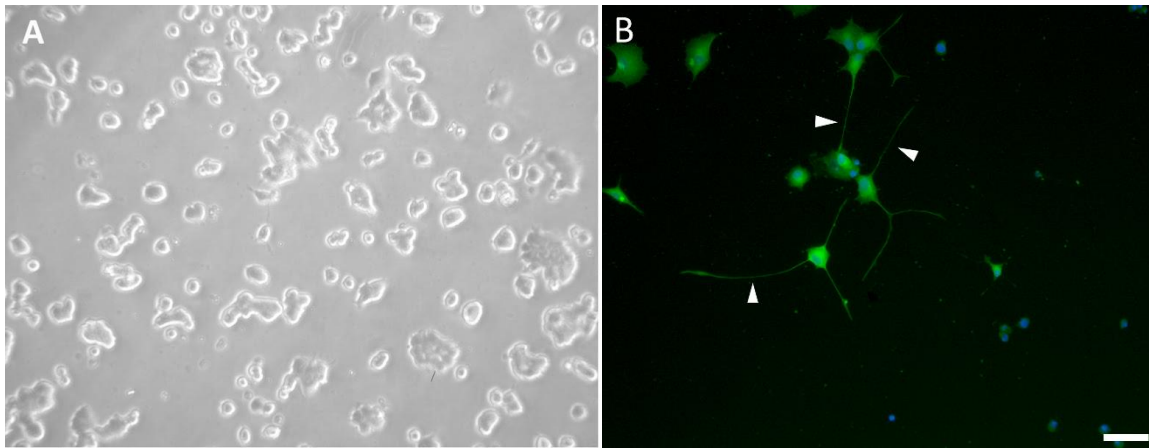
**Figura 14. Expresión de marcadores específicos de VE y de astrocitos en VEA.** A) Dot blot representativo mostrando la expresión de CD63 en VE de astrocitos cultivados a partir de cuerpo estriado de cerebro (ST). B) Western blot representativo mostrando la expresión de la proteína GFAP en lisados de astrocitos y VEA provenientes de cultivos celulares de cuerpo estriado (ST) y corteza cerebral (CX).



### 3. Interacción de VEA con células neuronales

#### 3.1 Diferenciación células neuronales PC12

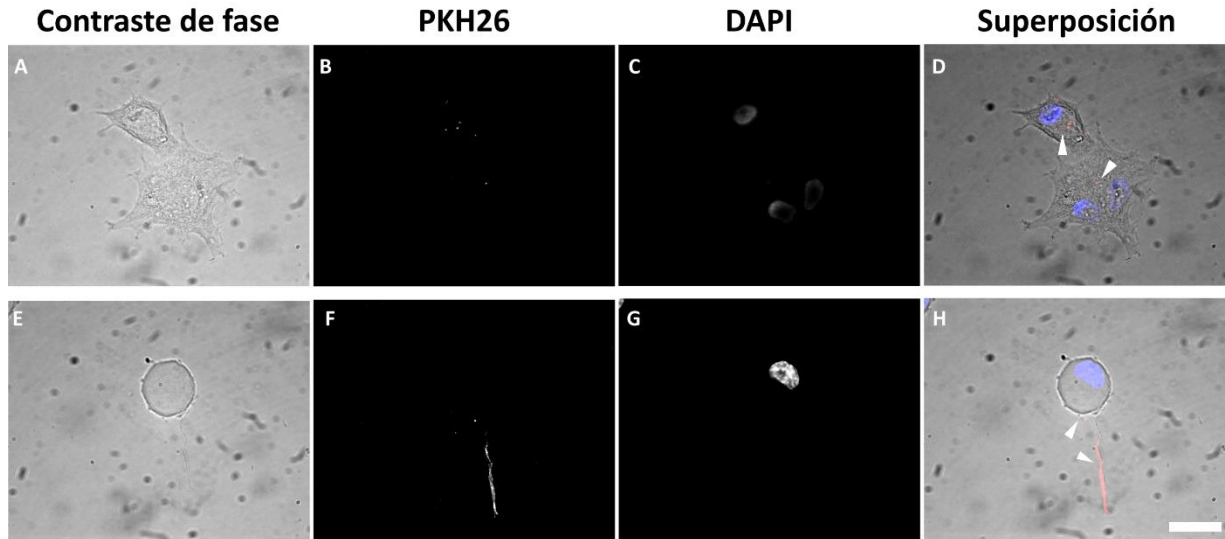
Para evaluar la interacción de vesículas extracelulares astrocitarias con células neuronales, se decidió utilizar una línea celular neuronal derivada de feocromocitoma, las **células PC12**. Estas células tienen una morfología redondeada (**Figura 15, A**) pero pueden diferenciarse en células con morfología neuronal cuando son mantenidas en medio con baja concentración de suero y suplementadas con NGF. Luego de 5 días de ser mantenidas en medio de diferenciación, se observó el desarrollo de procesos dendríticos y también axonales (**Figura 15, b**).



**Figura 15. Cultivo de células PC12.** A) Células indiferenciadas sin desarrollo de procesos visualizadas por microscopía óptica de campo claro (aumento: 20x). B) Células diferenciadas con presencia de procesos similares a dendritas y axones (flechas) visualizadas por microscopía de epifluorescencia. Las células se marcaron con anticuerpos contra tubulin beta III (verde) y DAPI (azul) (aumento:20x, barra: 50 $\mu$ m).

#### 3.2 Las vesículas de astrocitos interactúan con las células PC12

El análisis de los resultados obtenidos por microscopía de epifluorescencia confirmó la **interacción entre VEA y células PC12**. Las VEA se observaron tanto en células indiferenciadas como en diferenciadas. En las PC12 diferenciadas se encontraron VEA unidas en todas las regiones de las células: dendritas, soma y axón, aunque la marca más intensa se observó en el axón (**Figura 16**).

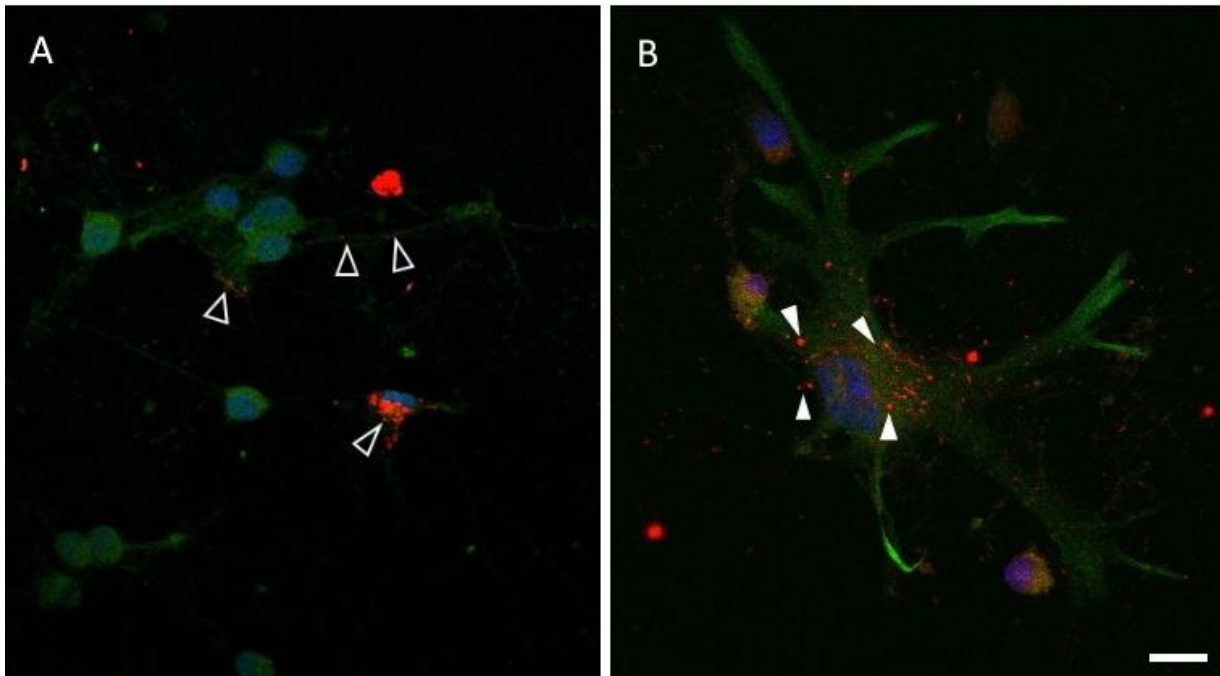


**Fig. 16. Interacción de VEA con células PC12s neuronales.** Microfotografías mostrando a las células de la línea PC12 no diferenciadas (A-D) y diferenciadas (E-H) y las VEA unidas (flechas). Las células PC12 se observan en contraste de fase y en fluorescencia se observa en azul el núcleo marcado con DAPI y en rojo las VEA marcadas con la sonda PKH26 (aumento: 100x, barra: 10 $\mu$ m).

#### 4. Las vesículas de astrocitos interactúan con neuronas hipocampales

Además, se evaluó la interacción VEA con neuronas obtenidas a partir de cultivos primarios de hipocampo. El análisis por microscopía confocal reveló que las VEA interactúan con las neuronas hipocampales, principalmente en la región del soma, en posición perinuclear y en menor proporción a procesos dendríticos y axonales (**Figura 17, A**).

A pesar de que los cultivos de neuronas hipocampales se realizaron en condiciones que favorecen el crecimiento de este tipo celular por sobre el desarrollo de células gliales, se observó la presencia aislada de algunos astrocitos (menos del 5% de la población celular total). Esto permitió detectar que las VEA también interactúan con los astrocitos presentes en los cultivos primarios y se encuentran unidas tanto al soma como a los procesos astrocíticos. Estos resultados aún siendo preliminares, podrían sugerir que las VEA forman parte de mecanismos de comunicación parácrino con neuronas y autócrinos con los propios astrocitos (**Figura 17, B**).



**Fig. 17. Interacción de VEA con neuronas hipocámpales y astrocitos observadas por microscopía confocal.** A) Microfotografía mostrando la interacción de VEA con neuronas hipocámpales. Las neuronas se marcaron con anticuerpos contra tubulin beta III (verde), DAPI (azul) y las VEA fueron marcadas con la PKH26 (rojo). B) Microfotografía de la interacción VEA con astrocitos. Los astrocitos fueron marcados con anticuerpo contra GFAP (verde) y DAPI (azul) y las VEA fueron marcadas con la PKH26 (rojo). Las flechas indican la presencia de VEA en neuronas y astrocitos (aumento: 100x, barra: 10 $\mu$ m).

## DISCUSIÓN

En esta tesina se realizó una revisión sobre la comunicación mediada por **neurotrofinas** y **VE** entre **astrocitos** y neuronas en un contexto de neurodegeneración provocada por el *Status Epilepticus*. El SE es una de las incontables situaciones traumáticas para el SNC en las cuales se observan incrementos en la expresión de neurotrofinas y pro-neurotrofinas y un incremento en la relación **p75<sup>NTR</sup>/TrkB**<sup>162</sup>. La mayor parte de los estudios revisados, son consistentes con que la neurodegeneración pos-SE se asocia a la activación de la señalización mediada por **pro-neurotrofinas/p75<sup>NTR</sup>** en neuronas<sup>46,47,99,135</sup>. La señalización **BDNF/p75<sup>NTR</sup>** también se asocia a la neurodegeneración<sup>21,46-48</sup>, sin embargo, las vías activadas por **BDNF/TrkB** podría desencadenar efectos contradictorios ya sea promoviendo la neurodegeneración y la epileptogénesis<sup>4,49,133,163</sup> o atenuándolas<sup>21,46-48</sup>.

Si bien el **objetivo** de esta tesina se focalizó en el análisis de la **neurodegeneración** asociada al **SE**, es necesario aclarar que esta respuesta y la epileptogénesis son dos fenómenos diferentes que pueden ocurrir en un mismo individuo y ser modulados por la misma neurotrofina. Teniendo en cuenta que BDNF tiene efectos tróficos<sup>126</sup> es de esperar que el incremento de esta neurotrofina y la activación de **TrkB**, aún cuando sus niveles bajan pos-SE, **prevengan la muerte neuronal**. A su vez, el incremento sostenido en el tiempo de BDNF que ocurre en algunos modelos de SE, puede **inducir hiperexcitabilidad** neuronal y alteraciones en las sinapsis lo cual explicaría la epileptogénesis que se observa en algunas situaciones pos-SE<sup>133</sup>.

El efecto dual de **BDNF/TrkB** también podría ser explicado por la diversidad de modelos experimentales utilizados en los estudios, cada uno generando respuestas comportamentales y bioquímicas únicas. Las ratas han sido utilizadas prioritariamente en los estudios que evalúan los efectos de las pro-neurotrofinas sobre la muerte celular luego del SE. En estos animales, la administración de quimioconvulsivantes como el **ácido kaínico** o la **pilocarpina** genera un SE con características similares al **TLE** observado en humanos. Sin embargo, con el advenimiento del uso de ratones genéticamente modificados para alterar la expresión de neurotrofinas y sus receptores, se observó que varias cepas de esta especie eran resistentes a la muerte neuronal inducida por SE, dificultando la comparación de estos resultados con los obtenidos en ratas<sup>164</sup>. Además, VonDran y cols (2014)<sup>135</sup> demostró que en ratones de la **cepa 129SvJ** los quimioconvulsivantes incrementan la expresión de pro-BDNF pero no de pro-NGF, que si se

observa en ratas, y el incremento de p75<sup>NTR</sup> pos-SE no provoca muerte neuronal. Estas y otras discrepancias interespecíficas podrían deberse a que el SE activa diferentes mecanismos en ratones y ratas y esto podría explicar las **diferencias** en las respuestas de la **señalización BDNF/TrkB** mencionadas anteriormente. La elección de un modelo de estudio del SE que represente este fenómeno tal como ocurre en humanos presenta varios desafíos. Las causas que generan convulsiones y SE en humanos son múltiples y comprenden la fiebre, traumas, tumores, drogas de abuso, anormalidades congénitas del cerebro, causas genéticas, etc. Por lo tanto, las respuestas celulares son diversas y difíciles de replicar en un modelo experimental universal. Por otro lado, el estudio del **SE en humanos** requiere de la obtención de muestras de individuos, las cuales son escasas y difíciles de conseguir. A pesar de esto, estudios realizados con tejido proveniente de cerebros epilépticos mostró un incremento en la relación **p75<sup>NTR</sup>/Trks<sup>91</sup>**, similar a lo observado en los modelos *in vivo* e *in vitro* utilizados en nuestro laboratorio y por otros autores<sup>21,36,44,46-48,87,132</sup>. En tanto que las neurotrofinas **BDNF** y **NGF** no mostraron variaciones en el líquido cefalorraquídeo de niños con epilepsia y un meta-análisis realizado a partir estudios publicados mostró que adultos con epilepsia tienen niveles similares a la población general<sup>163,165</sup>. Podemos decir que el **rol del BDNF en el SE no está claro aún** y se requieren estudios adicionales en humanos. Sin embargo, el incremento en la relación de los niveles de expresión **p75<sup>NTR</sup>/TrkB** parece ser un factor común asociado al SE por lo que el control de la expresión o las vías de señalización asociadas podría ser una **terapia efectiva** para controlar las consecuencias del SE.

La disminución en la expresión de TrkB-FL pos-SE puede ocurrir por varios mecanismos: 1) disminución de la expresión del gen de TrkB, lo cual se ha comprobado evaluando los niveles de ARNm<sup>21,46-48,87</sup>, 2) la regulación del *splicing* alternativo favoreciendo TrkB-T1 por sobre TrkB-FL<sup>41-43,87</sup> o 3) por el procesamiento postraducciona de TrkB-FL<sup>40</sup>. En nuestro laboratorio se demostró por medio de estudios *in vitro*, que la excitotoxicidad causada por la activación excesiva de los **receptores NMDA** está estrechamente vinculada a la alteración de los niveles de diferentes isoformas de TrkB. En este contexto, el **Ca<sup>+2</sup> citoplasmático neuronal** que ingresa a través de los receptores NMDA, activa a la enzima **calpaína** y esta escinde a **TrkB-FL** generando dos fragmentos TrkB-TC y el dominio intracelular de TrkB (TrkB-ICD)<sup>87,166</sup>. Se ha demostrado que algunos productos generados luego de la proteólisis mediada por calpaína pueden adquirir una función biológica diferente al sustrato original<sup>167</sup>. El rol de **TrkB-TC** no se

conoce con detalle, pero sabemos que el bloqueo de la actividad de calpaína, previene la formación de TrkB-TC y atenúa la muerte neuronal que ocurre luego de la hiperactivación neuronal<sup>75,87</sup> y luego del accidente cerebro vascular (ACV)<sup>41</sup> por lo que esta isoforma truncada también estaría involucrada en la neurodegeneración. De esta forma, los trabajos analizados permiten afirmar que el desbalance en la expresión de receptores de neurotrofinas, principalmente p75<sup>NTR</sup>/TrkB, participa en la muerte neuronal inducida en diferentes modelos experimentales de SE.

Una característica omnipresente en todos los modelos de SE y en la epilepsia humana es la **activación de los astrocitos**. Estas células son **heterogéneas** en cuanto a su forma, sus funciones y su respuesta a las lesiones que ocurren en el cerebro. Estudios recientes sugieren que los astrocitos reactivos pueden manifestar fenotipos **neuroprotectores o neurotóxicos** dependiendo del estímulo, mostrando la heterogeneidad de roles de la glia reactiva en las patologías del SNC<sup>8</sup>. De hecho, se han mencionado anteriormente trabajos en los que los astrocitos podrían promover la **neurodegeneración** a través de **TrkB** y **BDNF**<sup>4,168</sup>. Además, se ha observado un **incremento** en la expresión de **pro-neurotrofinas** lo que llevó a pensar que podrían ser la fuente de estos factores que causan la muerte neuronal pos-SE<sup>120</sup>. Estudios *in vitro* llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que la presencia de astrocitos sometidos a hiperactivación neuronal retarda la muerte neuronal y previene la degradación de TrkB-FL. Claramente, estas respuestas están asociadas con un fenotipo neuroprotector de los astrocitos, tal como ha sido observado en otras situaciones patológicas o traumáticas<sup>2,169</sup>.

**¿Cómo se explica la presencia de pro-neurotrofinas en astrocitos luego del SE descrita en varias publicaciones?** Por un lado, la expresión de pro-neurotrofinas por sí sola no implica que estas moléculas se liberen ya que pueden ser procesadas pos-transcripcionalmente hasta las formas maduras. Además, los astrocitos pueden incorporar pro-BDNF, mediante la unión a p75<sup>NTR</sup> y luego procesarlo a BDNF maduro y secretarlo<sup>147</sup>. Con estos resultados podemos sugerir que los astrocitos tienen un efecto neuroprotector, al menos en etapas tempranas pos-hiperactivación neuronal. Sin embargo, debemos mencionar que la reactividad glial es un proceso dinámico y que si bien, al principio puede tener efectos beneficiosos sobre el contexto celular dañado, la activación prolongada de estas células puede llevar a un daño que podría explicar los efectos negativos de estas células por ejemplo, sobre la epileptogénesis<sup>4,168</sup>.

Las primeras publicaciones que pusieron de manifiesto la **relevancia de las VE** como una de las formas de comunicación entre astrocitos y neuronas surgieron hace unos 15 años. Las **VE secretadas por astrocitos** en condiciones fisiológicas tendrían propiedades neurotróficas y neuroprotectoras, al igual que en algunas situaciones de estrés oxidativo, isquemia o privación de nutrientes. Sin embargo, en las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y la esclerosis lateral, se ha sugerido que las VEA tienen un papel en la propagación de la neuropatología o en la exacerbación de la extensión de la neurodegeneración<sup>61</sup>.

En base a estos antecedentes y resultados de nuestro laboratorio surgieron los objetivos del trabajo experimental de la presente tesina, que debieron reformularse debido a la **pandemia** quedando acotados en su alcance. Al desafío de establecer cultivos primarios de astrocitos se sumó el de obtener volúmenes significativos de medio condicionado a partir del cual aislar las VE, debido a que la cantidad de vesículas producidas por estas células es menor que la de otras, de acuerdo con nuestras estimaciones indirectas en base a la concentración de proteínas totales. En relación a este aspecto, creemos relevante mencionar que además de su caracterización, fuimos capaces de detectar la interacción de las VEA con neuronas en cultivo usando cantidades que consideramos más cercanas a las fisiológicas que las reportadas por publicaciones que partieron de grandes volúmenes de medio condicionado<sup>159,160</sup>.

Respecto a la **caracterización de las VEA**, el análisis por microscopía electrónica de las muestras obtenidas a partir de la centrifugación diferencial del medio condicionado de astrocitos mostró la presencia de vesículas de **doble membrana** con la característica apariencia en forma de **copa** y con **tamaño** predominante al rango correspondiente a los **exosomas** (30-100 nm). Asimismo, la detección de la proteína **CD63** por Western blot permitió la verificación bioquímica de la presencia de vesículas, y en particular la marca positiva para **GFAP** demostró su origen celular. Este último dato da lugar a la hipótesis de que el análisis de marcadores específicos podría ser útil en la determinación del origen celular de VE obtenidas de **sangre periférica** o de **líquido cefalorraquídeo (LCR)**, constituyéndose en posibles marcadores diagnósticos/pronósticos de trastornos neurológicos, lo cual es de especial relevancia en el caso de tejidos inaccesibles para el análisis directo tales como el SNC.

Además del análisis de proteínas, también el de **miARN** en VE ha recibido un interés considerable en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades neurológicas debido a su mayor estabilidad sobre los ARNm. Particularmente relacionados a epilepsia, hasta el momento existen muy escasos estudios sobre los posibles biomarcadores que pueden obtenerse del análisis de las VE en la sangre o el LCR. Raouf y sus colegas (2017)<sup>170</sup> examinaron el potencial de los miARNs aislados del LCR para ayudar al diagnóstico diferencial de la **TLE** y el **SE** de otras enfermedades neurológicas. Hubo un considerable solapamiento en cuanto a la aparición de miARNs en las VE aisladas del LCR de pacientes con TLE y SE, pero los niveles de algunos miARNs variaron considerablemente entre las muestras con TLE y SE. En otro estudio que realizó un análisis de **miARN** en plasma de 250 muestras, se identificó a **miR-27a-3p**, **miR-328-3p** y **miR-654-3p** como potenciales biomarcadores de epilepsia, validando también muestras de plasma de pacientes con crisis psicógenas no epilépticas que a menudo se confunden con la epilepsia.

En relación a la **interacción de las VE liberadas por astrocitos con las neuronas**, nuestros resultados muestran que las VEA se unen tanto a neuronas de la línea PC12 así como también a neuronas de hipocampo, lo que sugiere la existencia de un nuevo modo no convencional de transmisión de señales entre astrocitos y neuronas, con un impacto inexplorado en la comunicación en el SNC. La transferencia de VE desde los astrocitos podría dar lugar a un cambio de fenotipo de las neuronas receptoras, por ejemplo, por el enriquecimiento en factores neuroprotectores o por la expresión de receptores<sup>171</sup> haciendo a las neuronas transitoriamente capaces de reconocer y decodificar señales extracelulares, con posibles implicaciones neurofarmacológicas relevantes.

La **comunicación** entre astrocitos y neuronas es posible gracias a la liberación de diversas moléculas, proceso al cual se suma la contribución de las VE. Varios estudios han sugerido que las VE derivadas de los astrocitos son neuroprotectoras. Por ejemplo, las VE liberadas por los astrocitos contienen los factores angiogénicos **VEGF** y **FGF-2**, lo que sugiere su contribución a la diferenciación y función de las células cerebrales<sup>155</sup>. Las VE pueden liberarse a partir de los procesos astrocitarios de la corteza cerebral de ratas adultas, posiblemente contribuyendo a la transmisión de señales en el SNC. De hecho, estas VE pueden dirigirse selectivamente a las neuronas en co-cultivo y ser internalizadas<sup>69</sup>. Las VE derivadas de los astrocitos han demostrado exhibir neuroprotección mediante mecanismos dependientes de



la proteína priónica (PrP) contra la hipoxia, la isquemia y la hipoglucemia<sup>172</sup>. Además, las VE que contienen **ApoD** pueden mediar en la protección de las neuronas contra el estrés oxidativo, típico del envejecimiento y varias condiciones patológicas<sup>154</sup>.

Un trabajo reciente mostró que las **VEA** pueden afectar directamente a las neuronas de hipocampo regulando su **morfología**, donde la regulación del desarrollo dendrítico dependería de la capacidad de los astrocitos para modificar la carga de **miARN** en sus VE<sup>173</sup>. Algo similar se observa con la liberación de VE de astrocitos enriquecidas con miARNs que regulan la homeostasis sináptica como **miR-29c** y **miR-130a**<sup>52</sup>. Particularmente, MiR-29c regula positivamente la expresión de BDNF<sup>174</sup>, lo cual sugiere un **mecanismo potencial de modulación** de los niveles de esta neurotrofina en neuronas por parte de las VEA.

En relación con el **rol de las VEA como factores agravantes** en la patogénesis de los trastornos neurológicos, existen evidencias de su participación en procesos como el envejecimiento, la neuroinflamación, lesión neuronal aguda y enfermedades neurodegenerativas crónicas<sup>56,61</sup>. Como mencionamos anteriormente, las respuestas de los astrocitos varían en virtud del estímulo, por lo que resulta difícil generalizar que las VEA sean protectoras o deletéreas para las neuronas. En un estudio reciente, se demostró que las VE de astrocitos corticales contienen pro-BDNF pero esta neurotrofina induce apoptosis neuronal únicamente cuando proviene de VE de astrocitos necroptóticos<sup>156</sup>. Esto sugiere que las VEA contienen otros componentes que pueden promover la supervivencia neuronal o eliminar el efecto neurodegenerativo de esta pro-neurotrofina dependiendo de las condiciones fisiológicas de los astrocitos.

De esta forma es posible pensar que como consecuencia de la carga diferencial de neurotrofinas en su contenido luminal o receptores formando parte de la membrana, las VEA transfieran a las neuronas estos factores para modular su fisiología en situaciones de inflamaciones o lesiones. Dilucidar si el mecanismo está mediado por la fusión de las VE a la membrana plasmática de las neuronas o requiere de su incorporación por endocitosis es una de las cuestiones a dilucidar.

## **Perspectivas sobre mecanismos de neuroprotección pos-SE y estrategias de diagnóstico**

El restablecimiento del balance de receptores de neurotrofinas es uno de los blancos terapéuticos que se exploran con el objetivo de atenuar la muerte neuronal asociada al SE y otras patologías neurodegenerativas. Se ha utilizado un pequeño ligando no peptídico de p75<sup>NTR</sup>, **LM11A-31**, administrado por vía sistémica, que inhibe la interacción con sortilina y con pro-neurotrofinas, pero no previno la neurodegeneración asociada al SE inducido por pilocarpina<sup>175</sup>. Otra estrategia no invasiva consiste en la administración intranasal de un **siRNA** que bloquea la inducción de la expresión de p75<sup>NTR</sup>, que, si bien no se ha probado en modelos de SE ha sido efectiva para atenuar el daño neuronal asociado a traumas<sup>47</sup>.

En nuestro laboratorio se han probado estrategias *in vitro* para modular los niveles endógenos de neurotrofinas y sus receptores a través de una estrategia denominada **pre-condicionamiento**. Brevemente, el preconditionamiento consiste en generar estímulos del mismo tipo o similares al que produce daño cerebral pero debajo del umbral del daño lo cual genera un efecto protector frente a un futuro daño cerebral. Utilizando un modelo de hiperactivación neuronal *in vitro*, se demostró que la aplicación de periodos breves de hiperactivación neuronal y precediendo a una hiperactivación neuronal prolongada atenúa la muerte neuronal en co-cultivos de neuronas y astrocitos<sup>87</sup>. Estos resultados, junto con evidencias obtenidas por otros grupos avalan la idea de que los astrocitos desencadenan mecanismos neuroprotectores frente a determinados estímulos dañinos para las neuronas. Si bien, nuestros antecedentes indican que el balance de neurotrofinas disponibles juega un rol fundamental en el mantenimiento de la vida de las neuronas, se sabe que los astrocitos son células secretoras de una gran cantidad de mediadores que podrían ser responsables de la comunicación glía-neuronas en condiciones de daño o neurodegeneración.

En relación a las VE, la comprensión de sus funciones requiere de herramientas que permitan la marcación *in vivo*, así como poder determinar las fuentes celulares y el momento de liberación de las mismas. En esta línea, un ratón transgénico inducible expresando la proteína CD9 fusionada a GFP (del inglés “*green fluorescent protein*”) permitió la identificación de VE liberadas por astrocitos corticales y su captación por la microglía. Estas VE con un perfil único de miARNs morfogénicos inducen la liberación de citoquinas en la microglía, con lo cual

demostró que las VE son inmunomoduladores necesarios del sistema nervioso en desarrollo y se puso de manifiesto la relevancia de esta contribución metodológica<sup>176</sup>. Usando una estrategia similar, otro grupo demostró que la expresión de la proteína de fusión fluorescente no afectó el tamaño y la concentración de las VE secretadas, y permitió la coprecipitación de los marcadores de TSG101 y ALIX del medio condicionado mediante inmunoprecipitación anti-GFP. Este modelo la marcación de VE dependiente de Cre, proporcionó una nueva aproximación que permite la detección de VE a nivel celular, así como el aislamiento rápido y selectivo de VE específicas de células de plasma y orina, siendo el primer modelo genético reportero de VE que permite un fácil seguimiento y aislamiento de VE *in vivo* en ratones<sup>177</sup>. Estas herramientas fundamentales conforman un nuevo horizonte en el desarrollo de conocimientos en el área de la comunicación intercelular mediada por VE.

En relación a las aplicaciones terapéuticas de las VE, varios estudios demostraron los efectos beneficiosos de VE derivadas de células madre mesenquimales (CMM) para el tratamiento de patologías del SNC tales como en accidentes cerebro vasculares (ACV), isquemia, esclerosis múltiple, Enfermedad de Alzheimer y otras<sup>178</sup>, constituyendo estas VE un promisorio tratamiento para desórdenes neurodegenerativos que exhiben significativa neuroinflamación. Los episodios de SE causan neurodegeneración así como también neuroinflamación aguda, lo que conduce a convulsiones espontáneas. Además, en el hipocampo epiléptico se observa continuamente un aumento de las concentraciones de citoquinas proinflamatorias, que se cree que proceden de la microglía/macrófagos y astrocitos reactivos. Por lo tanto, las intervenciones antiinflamatorias tempranas después del SE parecen críticas para preservar función normal del hipocampo<sup>179</sup>. En esta línea un grupo reportó que la administración intranasal de VE después de SE proporcionó una sólida neuroprotección evidenciada a través de la reducción de la pérdida neuronal en el hilio dentado y en las capas celulares CA1. Así como en la preservación de interneuronas gabaérgicas positivas para parvalbúmina y somatostatina siendo posible, según estos autores, el impacto directo a través de la liberación de factores neurotróficos<sup>180</sup>. Estos resultados evidencian que la administración intranasal de exosomas A1 es eficiente para minimizar los efectos adversos en el hipocampo y prevenir los deterioros cognitivos y de memoria inducidos por el SE.

Estos trabajos son los primeros pasos en la exploración de un campo de posibilidades en el cual las VE se vislumbran como una nueva estrategia para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en particular y desórdenes del SNC en general.

## **CONCLUSIÓN**

Nuestros datos experimentales corroboran la identidad de VE secretadas por astrocitos, a partir del análisis de microscopía electrónica y la detección de proteínas marcadoras específicas de VE y del tipo celular del que derivan. Asimismo, se verifica la interacción de las neuronas con las vesículas, que podrían contener neurotrofinas o receptores capaces de modular distintos procesos celulares. Dilucidar esta cuestión y los mecanismos implicados son los objetivos de futuros trabajos, que contribuirán al creciente volumen de información en torno a las aplicaciones diagnósticas y posibles utilidades terapéuticas de las VE en la detección temprana, monitoreo y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

## ANEXO

Modelos status epilepticus						
Modelos <i>in vitro</i>						
Modelo	Fundamento	Tipos/Modelos de convulsiones	Método de inducción	Aspectos de relevancia	Limitaciones y ventajas generales	Referencias
<b>Buffer libre de Mg<sup>2+</sup></b>	Hiperactivación por desbloqueo de receptores NMDA y flujo intracelular masivo de Ca <sup>2+</sup> .	Descargas epileptiformes continuas de alta frecuencia.	Medio de crecimiento sustituido por buffer sin MgCl a cultivo neuronal, co-cultivo de neuronas y astrocitos o secciones de cerebro.	El restablecimiento de las concentraciones fisiológicas de magnesio finaliza las descargas epileptiformes.	Los sistemas <i>in vitro</i> carecen de muchos factores fisiopatológicos del cerebro humano (inflamación, temperatura, cambios en la vasculatura, etc). Pérdida de interacciones con otros tipos celulares y/o áreas cerebrales. Es un modelo reduccionista.	Sombati & DeLorenzo (1995) Mountroull <i>et al.</i> (2019) DeLorenzo <i>et al.</i> (2005) Mikroulis <i>et al.</i> (2018) Deshpande <i>et al.</i> (2007)
<b>Glutamato</b>	Aminoácido neurotransmisor excitatorio. Activación excesiva de receptores de glutamato (incluido subtipo NMDA permeable al Ca <sup>2+</sup> ).	Excitotoxicidad (excitación prolongada) que lleva a la muerte neuronal.	Elevación de la concentración extracelular de glutamato a rebanadas cerebrales o cultivos primarios de neuronas.	Neurotransmisor más abundante del SN, no resulta un modelo muy específico para estudiar una neuropatología. Puede ser utilizado para tratamientos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	Estudio controlado de variables experimentales a nivel de poblaciones neuronales, una única célula o cerebro entero, uso del mínimo necesario de animales, menor tiempo experimental y costos.	Choi (1985) DeLorenzo <i>et al.</i> (2005)
<b>Hiperactividad neuronal inducida por estimulación eléctrica</b>	Estimulación eléctrica.	Descargas espontáneas.	Estímulos eléctricos repetidos en rebanadas de hipocampo.	Modelo que permitió identificar el rol anti-epileptogénico de antagonistas de NMDA.		Stacheff <i>et al.</i> (1989) DeLorenzo <i>et al.</i> (2005)

**Tabla 1. Modelos de *Status epilepticus*.** Modelos *in vitro* para la caracterización de la hiperactivación neuronal e *in vivo* para el estudio del *Status epilepticus* principalmente desarrollados en roedores.

4-aminopiridina (4-AP)	Bloqueador de canales de potasio dependientes de voltaje de la familia Kv1 (Kv1.3 y Kv1.4).	Descargas espontáneas.	Incubación de secciones de cerebro o cultivos primarios de neuronas con 4-aminopiridina.	Potencia las corrientes de los canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje con aumento intracelular. Permite estudiar la participación de canales iónicos activados por voltaje que controlan la excitabilidad neuronal. Puede ser utilizado para tratamientos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	Voskuyil, & Albus (1985) Fernández-García <i>et al.</i> (2020) Pacico & Mingorance-Le Meur (2014). Heinemann <i>et al.</i> (2006)
<b>Modelos <i>in vivo</i>: Inducción farmacológica del Status epilepticus o quimioconvulsivantes</b>					
<b>Modelo</b>	<b>Fundamento</b>	<b>Tipos/Modelos de convulsiones</b>	<b>Método de inducción</b>	<b>Aspectos de relevancia</b>	<b>Limitaciones</b>
<b>Ácido kainico</b>	Agonista de receptores AMPA y kainato (KA).	SE límbico y convulsiones tónico-clónicas crónicas.	Inyección vía sistémica o intrahippocampal.	Epilepsia del lóbulo temporal (TLE) con esclerosis del hipocampo.	Elevada mortalidad.
<b>Pilocarpina</b>	Agonista de receptores M1 y NMDA.				
<b>Litio-pilocarpina</b>			Inyección de cloruro de litio previa a la aplicación de pilocarpina.	Evidencias contradictorias sobre el efecto potenciador del litio en la actividad convulsiva.	Jope <i>et al.</i> (1986) Clifford <i>et al.</i> (1987) Ninwan <i>et al.</i> (2018) Müller <i>et al.</i>

							(2009) Groticke <i>et al.</i> (2007)
<b>Pesticida organofosforado</b>	Inhibe la acetilcolinesterasa (AChE) y aumenta la liberación de glutamato.	SE límbico.	Inyección intrahipocámpal o periférica.	Refleja los rasgos característicos del SE inducido por la pilocarpina.	Elevada mortalidad.	De Araujo Furtado <i>et al.</i> (2010) Nirwan <i>et al.</i> (2018)	
<b>Flurotilo</b>	Apertura del canal de Na <sup>+</sup> inhibe la síntesis de GABA.	Convulsiones tónico-clónicas.	Vía inhalatoria.	Rápida recuperación de los animales.	Los animales adultos no presentan convulsiones espontáneas.	Lowenstein <i>et al.</i> (1990) Nirwan <i>et al.</i> (2018)	
<b>Toxina tetánica</b>	Bloquea la liberación de GABA y glicina.	Convulsión parcial compleja desarrolla el TLE.	Inyección intrahipocámpal.	Disminuye el umbral convulsivo.	Parálisis y muerte tras inyección sistémica.	Mellanby (1993) Nirwan <i>et al.</i> (2018)	
<b>Cobalto-homocisteína</b>	Afectan la síntesis de GABA, activan la vía glutamatergica o se desconoce el mecanismo.	SE límbico y convulsiones tónico-clónicas.	Inyección vía sistémica.	Potencia las características inducidas por el tratamiento con pilocarpina.	Modelos novedosos. No se conocen bien las bases patológicas exactas de los mecanismos implicados. Aún no se han estudiado cambios conductuales o histológicos retardados.	Walton & Treiman (1988) Baldelli <i>et al.</i> (2010) Nirwan <i>et al.</i> (2018)	
<b>Orfenadrina</b>		Convulsiones parciales complejas desarrollan convulsiones clónicas.		Propiedad convulsiva (actividad colinérgica) como neuroprotectora (NMDA y antagonismo débil de canales Na <sup>+</sup> ).		Rejciak <i>et al.</i> (2011) Nirwan <i>et al.</i> (2018)	
<b>Tiocolchicosido</b>		Convulsiones tónicas y tónico-clónicas.	Inyección vía sistémica o intracraneal.	Relajante muscular de acción central con propiedades antiinflamatorias y analgésicas.		Nirwan <i>et al.</i> (2018) Sechi <i>et al.</i> (2003) Giavina-Bianchi <i>et al.</i> (2009)	



Ácido quinolinico		Convulsiones tónico-clónicas.	Inyección intracraneal.	Cambios similares a la TLE inducida por ácido kainico	Nirwan <i>et al.</i> (2018) Schmidt <i>et al.</i> (2000)
<b>Modelos in vivo: Inducción no farmacológica del Status epilepticus</b>					
<b>Modelo</b>	<b>Fundamento</b>	<b>Tipos/Modelos de convulsiones</b>	<b>Método de inducción</b>	<b>Aspectos de relevancia</b>	<b>Limitaciones</b>
<b>Estado epileptico febril experimental (eFSE)</b>	Desconocido.	Modelo de convulsiones febriles (FS). Inmovilidad, automatismo facial, sacudidas mioclónicas.	Elevar la temperatura corporal central hasta unos 39,5 a 41°C de forma gradual con corriente de aire caliente.	Tipo de convulsión más común en bebés y niños pequeños. No se considera una forma de epilepsia (trastorno convulsivo).	Se requiere prevenir quemaduras debido a la hipotermia. Modelo de SE no tan fiable como otros más convencionales.
<b>Estimulación eléctrica</b>	Modelo de Kindling	Convulsiones parciales que evolucionan a generalización y convulsiones espontáneas.	Estimulación repetitiva y subconvulsiva del cerebro para iniciar la epileptogénesis.	Capacidad para controlar el grado de estimulación en comparación con otros modelos. Sustituye la inducción de SE con quimicoconvulsivos.	Goddard <i>et al.</i> (1969) Croucher & Bradford (1989) DeLorenzo <i>et al.</i> (2005)
	Estimulación eléctrica de la vía perforante (PPS por sus siglas en inglés <i>perforant pathway stimulation</i> ).	Convulsiones parciales complejas desarrollan TLE. Convulsiones tónico-clónicas.	Implantación de electrodos en el hipocampo (1 o 2).		Nirwan <i>et al.</i> (2018) Sloviter <i>et al.</i> (1996) Gorter <i>et al.</i> (2001)
<b>Lesión cerebral</b>	Hipoxia/ isquemia neonatal.	Convulsiones tónico-clónicas.	Suministro reducido de oxígeno.	La combinación de isquemia e hipoxia provoca un aumento en la gravedad de las convulsiones.	Nirwan <i>et al.</i> (2018) Williams <i>et al.</i> (2004) Owens <i>et al.</i> (1997)

	Lesión por percusión de fluidos.		Inyección de solución salina presurizada.	Asociado a déficits motores y cognitivos.	Nirwan <i>et al.</i> (2018) Holmes and Weber (1985)
<b>Modelos in vivo: Modelos de organismos genéticamente modificados (OGM)</b>					
Cepa	Tipos/Modelos de convulsiones	Fundamento	Mutaciones genéticas causales	Método de inducción o aspectos de relevancia	Limitaciones y ventajas generales
GEPR-3 GEPR-9	Modelo audiogénico. Corridas descontroladas seguidas por convulsiones tónico-clónicas	Mutación espontánea.	Desconocidas.	Estimulación acústica. Los animales presentan defectos en la inhibición GABA-érgica y sensibilidad al sonido	Griffiths (1944) Serikawa <i>et al.</i> (2015)
GAERS			Poligenéticas: <i>Cacna1h</i> , <i>R1584P</i> .		Robinson y Gilmore (1980) Marescaux <i>et al.</i> (1992) van Lujtelaar (2014)
WAG/rij	Modelo de ausencia.	Mutación espontánea.	Poligenéticas desconocidas.	Aparición espontánea de descargas epileptiformes generalizadas en electroencefalograma (EEG).	Serikawa <i>et al.</i> (2015)
TRM			<i>tm</i> (Chr 10q24)		Serikawa <i>et al.</i> (1987)
SER	Modelo de ausencia, convulsiones tónicas y tónico-clónicas.	Mutación espontánea, cruce de dos mutantes.	<i>tm</i> (Chr 10q24), <i>zi</i> ( <i>Altm</i> )	Modelos epilepticos relacionados con la enfermedad de Canavan.	Kuramoto <i>et al.</i> (2001) Serikawa <i>et al.</i> (2015)
IER	Modelos de convulsiones tónico-clónicas generalizadas.	Mutación espontánea.	<i>Cat1</i> (Chr 8) <i>Cat12</i> (Chr 15)	Ratas con cataratas de Ihara. Chr 8 estaría implicado en la catarata, y Chr 15 en el momento de la aparición.	Yokoyama <i>et al.</i> (2001) Noda <i>et al.</i> (1998)

<b>NER</b>	Con estimulación sonora desarrollan convulsiones audiogénicas.	Ner1 (Chr 1) Ner2 (Chr 3)			Maihara <i>et al.</i> (2000) Tsubota <i>et al.</i> (2003) Serikawa <i>et al.</i> (2015)
<b>WER</b>	Wistar: Comportamiento inmóvil similar a la ausencia.	Desconocidas.			Zeng <i>et al.</i> (2008)
<b>Modelo Tsc1 GFAP KO.</b>	Modelos de convulsiones tónico-clónicas generalizadas.	Tsc1	Mutagénesis dirigida.	Modelo epiléptico relacionado con el complejo de esclerosis tuberosa (TSC). Inactivación del gen en astrocitos.	Yang <i>et al.</i> (2020)
				Modelo epiléptico relacionado con TSC específico del tipo celular. Inducción de convulsiones por cambios ambientales. Hipopigmentación de la piel. Sin cambios histológicos en el hipocampo.	
<b>GRY</b>	Modelo de ataxia episódica tipo 2 (EA2).	Cacna1a, M251K	Mutagénesis química aleatoria.	MINU (N-Methyl-N-nitrosourea).	Tokuda <i>et al.</i> (2007) Serikawa <i>et al.</i> (2015)
<b>ADMS</b>	Modelo de ataxia episódica tipo 1 (EA1).	Kcna1, S309T	Mutagénesis química aleatoria.	ENU (N-Etil-N-nitrosourea).	Ishida, <i>et al.</i> (2012) Serikawa <i>et al.</i> (2015)
	Modelo de epilepsia del lóbulo temporal lateral y ataques tónico-clónicos generalizados inducidos por sonido.			Lgi1, L385R	
<b>ADLTE</b>					Baulac <i>et al.</i> (2012) Serikawa <i>et al.</i> (2015)

Ratas Hiss	Modelo de convulsiones febriles.		Scn1a, N1417H	ENU (N-Etil-N-nitrosourea). Ratas susceptibles a convulsiones inducidas por hipertermia. Causa común del síndrome de Dravet. Existe un modelo de pez cebra.	Yu et al. (2006) Serikawa et al. (2015)
------------	----------------------------------	--	---------------	---	--

**Tabla 1. Modelos de Status epilepticus.** Modelos *in vitro* para la caracterización de la hiperactivación neuronal e *in vivo* para el estudio del Status epilepticus principalmente desarrollados en roedores.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ben Achour, S. & Pascual, O. Astrocyte–Neuron Communication: Functional Consequences. *Neurochem. Res.* **37**, 2464–2473 (2012).
2. Mederos, S., González-Arias, C. & Perea, G. Astrocyte–Neuron Networks: A Multilane Highway of Signaling for Homeostatic Brain Function. *Front. Synaptic Neurosci.* **10**, (2018).
3. Vannucci, S. J., Maher, F. & Simpson, I. A. Glucose transporter proteins in brain: Delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* **21**, 2–21 (1997).
4. Fernández-García, S. *et al.* Astrocytic BDNF and TrkB regulate severity and neuronal activity in mouse models of temporal lobe epilepsy. *Cell Death Dis.* **11**, 411 (2020).
5. Cragolini, A. *et al.* Regional brain susceptibility to neurodegeneration: What is the role of glial cells? *Neural Regeneration Research* vol. 15 (2020).
6. Grangeiro, M. S. *et al.* Neuroprotection During *Neospora caninum* Infection Is Related To the Release of Neurotrophic Factors BDNF and NGF. *J. Parasitol.* **105**, (2019).
7. Sutter, P. A., Rouillard, M. E., Alshawi, S. A. & Crocker, S. J. Extracellular matrix influences astrocytic extracellular vesicle function in wound repair. *Brain Res.* **1763**, 147462 (2021).
8. Liddelow, S. A. & Barres, B. A. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* vol. 46 (2017).
9. Zamanian, J. L. *et al.* Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. *J. Neurosci.* **32**, 6391–6410 (2012).
10. Sofroniew, M. V. Astrogliosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, (2015).
11. Falco-Walter, J. Epilepsy—Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. *Semin. Neurol.* **40**, 617–623 (2020).
12. Kapur, J., Stringer, J. L. & Lothman, E. W. Evidence that repetitive seizures in the hippocampus cause a lasting reduction of GABAergic inhibition. *J. Neurophysiol.* **61**, 417–426 (1989).
13. Kapur, J. & Lothman, E. W. Loss of inhibition precedes delayed spontaneous seizures in the hippocampus after tetanic electrical stimulation. *J. Neurophysiol.* **61**, 427–434 (1989).
14. Mazarati AM, Liu H, DN, W. C. Self-sustaining status epilepticus. In Status epilepticus: Mechanisms and management. **The MIT Pr**, 209–228 (2006).
15. Wasterlain, C. G., Fujikawa, D. G., Penix, L. & Sankar, R. Pathophysiological Mechanisms of Brain Damage from Status Epilepticus. *Epilepsia* **34**, S37–S53 (1993).
16. Trinka, E. *et al.* A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia* **56**, 1515–1523 (2015).
17. Berliocchi, L., Bano, D. & Nicotera, P. Ca<sup>2+</sup> signals and death programmes in neurons. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **360**, 2255–2258 (2005).
18. Dong, X., Wang, Y. & Qin, Z. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **30**, 379–387 (2009).

19. Fujikawa, D. G. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* **725**, 11–22 (1996).
20. von Bohlen und Halbach, O., Schulze, K. & Albrecht, D. Amygdala-kindling induces alterations in neuronal density and in density of degenerated fibers. *Hippocampus* **14**, 311–318 (2004).
21. Unsain, N., Nuñez, N., Anastasía, A. & Mascó, D. H. 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**, (2008).
22. Yang, C. R. *et al.* Antidepressant Drugs Correct the Imbalance Between proBDNF/p75NTR/Sortilin and Mature BDNF/TrkB in the Brain of Mice with Chronic Stress. *Neurotox. Res.* **37**, 171–182 (2020).
23. Adúriz-Bravo, Agustín; Izquierdo-Aymerich, M. Un modelo de modelo científico para la enseñanza de las ciencias naturales. *Rev. Electrónica Investig. en Educ. en Ciencias* **4**, 40–49 (2009).
24. Box, G. E. P. Robustness in the Strategy of Scientific Model Building. in *Robustness in Statistics* 201–236 (Elsevier, 1979). doi:10.1016/B978-0-12-438150-6.50018-2.
25. Zeng, L.-H., Xu, L., Gutmann, D. H. & Wong, M. Rapamycin prevents epilepsy in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Ann. Neurol.* **63**, 444–453 (2008).
26. Barh, D. *et al.* In Silico Models. in *Animal Biotechnology* 385–404 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-416002-6.00021-3.
27. Kaplan, D. R. & Miller, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 381–391 (2000).
28. Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 299–309 (2003).
29. Binder, D. K. & Scharfman, H. E. Mini Review. *Growth Factors* **22**, 123–131 (2004).
30. Kalb, R. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci.* **28**, 5–11 (2005).
31. Blesch, A. Neurotrophic Factors in Neurodegeneration. *Brain Pathol.* **16**, 295–303 (2006).
32. Schildt, S., Endres, T., Lessmann, V. & Edelman, E. Acute and chronic interference with BDNF/TrkB-signaling impair LTP selectively at mossy fiber synapses in the CA3 region of mouse hippocampus. *Neuropharmacology* **71**, 247–254 (2013).
33. Allard, S. *et al.* Impact of the NGF Maturation and Degradation Pathway on the Cortical Cholinergic System Phenotype. *J. Neurosci.* **32**, 2002–2012 (2012).
34. Costa, R. O., Perestrelo, T. & Almeida, R. D. PRoneurotrophins and CONsequences. *Mol. Neurobiol.* **55**, 2934–2951 (2018).
35. Thomas, A. X. *et al.* Rapid Increases in proBDNF after Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Mice Are Associated with Reduced proBDNF Cleavage Machinery. *eneuro* **3**, ENEURO.0020-15.2016 (2016).

36. Josephy-Hernandez, S., Jmaeff, S., Pirvulescu, I., Aboukassim, T. & Saragovi, H. U. Neurotrophin receptor agonists and antagonists as therapeutic agents: An evolving paradigm. *Neurobiology of Disease* vol. 97 (2017).
37. Zanin, J. P., Montroull, L. E., Volosin, M. & Friedman, W. J. The p75 Neurotrophin Receptor Facilitates TrkB Signaling and Function in Rat Hippocampal Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, (2019).
38. *Neurotrophic Factors*. vol. 220 (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
39. Skaper, S. D. Neurotrophic factors: An overview. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1727 (2018).
40. Tessarollo, L. & Yanpallewar, S. TrkB Truncated Isoform Receptors as Transducers and Determinants of BDNF Functions. *Front. Neurosci.* **16**, (2022).
41. Vidaurre, O. G. *et al.* Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity. *Cell Death Dis.* **3**, (2012).
42. Xie, W. *et al.* The suppression of epileptiform discharges in cultured hippocampal neurons is regulated via alterations in full-length tropomyosin-related kinase type B receptors signalling activity. *Eur. J. Neurosci.* **40**, 2564–2575 (2014).
43. Jerónimo-Santos, A. *et al.* Dysregulation of TrkB Receptors and BDNF function by amyloid- $\beta$  peptide is mediated by calpain. *Cereb. Cortex* **25**, (2015).
44. Danelon, V. Participación de la neurotrofina BDNF y proBDNF en los mecanismos de muerte neuronal en un modelo in vitro de status epilepticus. *Fac. Ciencias Exactas, Físicas y Nat. Univ. Nac. Córdoba*. (2016).
45. Penning, D. H. *et al.* Neuron-Glia Crosstalk Plays a Major Role in the Neurotoxic Effects of Ketamine via Extracellular Vesicles. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, (2021).
46. Montroull, L. E., Danelon, V., Cragolini, A. B. & Mascó, D. H. Loss of TrkB Signaling Due to Status Epilepticus Induces a proBDNF-Dependent Cell Death. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, (2019).
47. Montroull, L. E. *et al.* Proneurotrophins Induce Apoptotic Neuronal Death After Controlled Cortical Impact Injury in Adult Mice. *ASN Neuro* **12**, 175909142093086 (2020).
48. Unsain, N., Montroull, L. E. & Mascó, D. H. Brain-derived neurotrophic factor facilitates TrkB down-regulation and neuronal injury after status epilepticus in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* **111**, 428–440 (2009).
49. Heinrich, C. *et al.* Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* **42**, 35–47 (2011).
50. Cragolini, A. B., Huang, Y., Gokina, P. & Friedman, W. J. Nerve growth factor attenuates proliferation of astrocytes via the p75 neurotrophin receptor. *Glia* **57**, 1386–1392 (2009).
51. Becerra-Calixto, A. & Cardona-Gómez, G. P. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, (2017).
52. Chaudhuri, A. D. *et al.* TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  modify the miRNA cargo of astrocyte shed extracellular vesicles to regulate neurotrophic signaling in neurons article. *Cell Death Dis.* **9**, (2018).

53. Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P. & Krämer-Albers, E. M. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Frontiers in Cellular Neuroscience* (2013).
54. Yáñez-Mó, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 27066 (2015).
55. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
56. Zhao, S. *et al.* Astrocyte-derived extracellular vesicles: A double-edged sword in central nervous system disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **125**, 148–159 (2021).
57. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–383 (2013).
58. Patel, M. R. & Weaver, A. M. Astrocyte-derived small extracellular vesicles promote synapse formation via fibulin-2-mediated TGF- $\beta$  signaling. *Cell Rep.* **34**, 108829 (2021).
59. Pivoriunas, A. & Verkhratsky, A. Astrocyte-derived extracellular vesicles mediate intercellular communications of the neuroglial unit. *Neural Regen. Res.* **16**, 1421 (2021).
60. You, Y. *et al.* Activated human astrocyte-derived extracellular vesicles modulate neuronal uptake, differentiation and firing. *J. Extracell. Vesicles* **9**, 1706801 (2020).
61. Upadhyay, R., Zingg, W., Shetty, S. & Shetty, A. K. Astrocyte-derived extracellular vesicles: Neuroreparative properties and role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *J. Control. Release* **323**, 225–239 (2020).
62. Wang, S. *et al.* Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J. Neurosci.* **31**, (2011).
63. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology* vol. 30 (2014).
64. Lo Cicero, A., Stahl, P. D. & Raposo, G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**, 69–77 (2015).
65. Mulcahy, L. A., Pink, R. C. & Carter, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* **3**, 24641 (2014).
66. van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 213–228 (2018).
67. Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G. & Théry, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **21**, 9–17 (2019).
68. Holm, M. M., Kaiser, J. & Schwab, M. E. Extracellular Vesicles: Multimodal Envoys in Neural Maintenance and Repair. *Trends Neurosci.* **41**, 360–372 (2018).
69. Venturini, A. *et al.* Exosomes from astrocyte processes: Signaling to neurons. *Front. Pharmacol.* **10**, (2019).



70. Gharbi, T., Zhang, Z. & Yang, G.-Y. The Function of Astrocyte Mediated Extracellular Vesicles in Central Nervous System Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
71. Datta Chaudhuri, A. *et al.* Stimulus-dependent modifications in astrocyte-derived extracellular vesicle cargo regulate neuronal excitability. *Glia* **68**, 128–144 (2020).
72. Boukouris, S. & Mathivanan, S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *PROTEOMICS - Clin. Appl.* **9**, 358–367 (2015).
73. Karlsson, O. *et al.* Detection of long non-coding RNAs in human breastmilk extracellular vesicles: Implications for early child development. *Epigenetics* **11**, 721–729 (2016).
74. Cragolini, A. B., Montenegro, G., Friedman, W. J. & Mascó, D. H. Brain-region specific responses of astrocytes to an in vitro injury and neurotrophins. *Mol. Cell. Neurosci.* **88**, (2018).
75. Danelon, V., Montroull, L. E., Unsain, N., Barker, P. A. & Mascó, D. H. Calpain-dependent truncated form of TrkB-FL increases in neurodegenerative processes. *Mol. Cell. Neurosci.* **75**, 81–92 (2016).
76. Franchi, A., Moreno-Irusta, A., Domínguez, E. M., Adre, A. J. & Giojalas, L. C. Extracellular vesicles from oviductal isthmus and ampulla stimulate the induced acrosome reaction and signaling events associated with capacitation in bovine spermatozoa. *J. Cell. Biochem.* **121**, 2877–2888 (2020).
77. Franchi, A., Cubilla, M., Guidobaldi, H. A., Bravo, A. A. & Giojalas, L. C. Uterosome-like vesicles prompt human sperm fertilizing capability. *Mol. Hum. Reprod.* **22**, (2016).
78. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
79. Campos, G., Fortuna, A., Falcão, A. & Alves, G. In vitro and in vivo experimental models employed in the discovery and development of antiepileptic drugs for pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsy Res.* **146**, 63–86 (2018).
80. Raimondo, J. V. *et al.* Methodological standards for in vitro models of epilepsy and epileptic seizures. *Epilepsia* **58**, 40–52 (2017).
81. Nieto-Estévez, V. & Hsieh, J. Human Brain Organoid Models of Developmental Epilepsies. *Epilepsy Curr.* **20**, 282–290 (2020).
82. DeLorenzo, R. J., Sun, D. A. & Deshpande, L. S. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: The calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 105 (2005).
83. Zhou, Y. & Danbolt, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J. Neural Transm.* **121**, 799–817 (2014).
84. Peña, F. & Tapia, R. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* **101**, 547–561 (2000).
85. Heinemann, U., Kann, O. & Schuchmann, S. An Overview of In Vitro Seizure Models in Acute and Organotypic Slices. in *Models of Seizures and Epilepsy* 35–44 (Elsevier, 2006).

86. Stasheff, S. F., Anderson, W. W., Clark, S. & Wilson, W. A. NMDA Antagonists Differentiate Epileptogenesis from Seizure Expression in an in Vitro Model. *Science* (80- ). **245**, 648–651 (1989).
87. Danelon, V. Participación de la neurotrofina BDNF y proBDNF en los mecanismos de muerte neuronal en un modelo in vitro de status epilepticus. (2016).
88. Grainger, A. I. *et al.* In vitro Models for Seizure-Liability Testing Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Front. Neurosci.* **12**, (2018).
89. Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R. A. & Verkhratsky, A. NMDA Receptors Mediate Neuron-to-Glia Signaling in Mouse Cortical Astrocytes. *J. Neurosci.* **26**, 2673–2683 (2006).
90. Skowrońska, K., Obara-Michlewska, M., Zielińska, M. & Albrecht, J. NMDA Receptors in Astrocytes: In Search for Roles in Neurotransmission and Astrocytic Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 309 (2019).
91. Kandratavicius, L. *et al.* Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 1693 (2014).
92. Nirwan, N., Vyas, P. & Vohora, D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Rev. Neurosci.* **29**, 757–770 (2018).
93. Reddy, D. & Kuruba, R. Experimental Models of Status Epilepticus and Neuronal Injury for Evaluation of Therapeutic Interventions. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 18284–18318 (2013).
94. Lévesque, M. & Avoli, M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **37**, 2887–2899 (2013).
95. Blair, R. E., Deshpande, L. S., Holbert, W. H., Churn, S. B. & DeLorenzo, R. J. Age-dependent mortality in the pilocarpine model of status epilepticus. *Neurosci. Lett.* **453**, 233–237 (2009).
96. Müller, C. J., Bankstahl, M., Gröticke, I. & Löscher, W. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: Development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. *Eur. J. Pharmacol.* **619**, (2009).
97. Gröticke, I., Hoffmann, K. & Löscher, W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp. Neurol.* **207**, 329–349 (2007).
98. Clifford, D. B., Olney, J. W., Maniotis, A., Collins, R. C. & Zorumski, C. F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* **23**, 953–968 (1987).
99. Greenwood, S. G. *et al.* A Novel Neuroprotective Mechanism for Lithium That Prevents Association of the p75 NTR -Sortilin Receptor Complex and Attenuates proNGF-Induced Neuronal Death In Vitro and In Vivo. *eneuro* **5**, ENEURO.0257-17.2017 (2018).
100. Mellanby, J. *Tetanus toxin as a tool for investigating the consequences of excessive neuronal excitation. Botulinum and tetanus neurotoxins: neurotransmission and biomedical aspects.* (1993).
101. Sechi, G. *et al.* Focal and secondarily generalised convulsive status epilepticus induced by thiocolchicoside in the rat. *Seizure* **12**, 508–515 (2003).

102. Giavina-Bianchi, P. Epileptic seizure after treatment with thiocolchicoside. *Ther. Clin. Risk Manag.* 635 (2009).
103. Walton, N. Y. & Treiman, D. M. Experimental secondarily generalized convulsive status epilepticus induced by d,l-homocysteine thiolactone. *Epilepsy Res.* **2**, 79–86 (1988).
104. Baldelli, E. *et al.* Homocysteine Potentiates Seizures and Cell Loss Induced by Pilocarpine Treatment. *NeuroMolecular Med.* **12**, 248–259 (2010).
105. De Araujo Furtado, M. *et al.* Spontaneous recurrent seizures after status epilepticus induced by soman in Sprague-Dawley rats. *Epilepsia* **51**, 1503–1510 (2010).
106. Brennan, G. P., Garcia-Curran, M. M., Patterson, K. P., Luo, R. & Baram, T. Z. Multiple Disruptions of Glial-Neuronal Networks in Epileptogenesis That Follows Prolonged Febrile Seizures. *Front. Neurol.* **12**, (2021).
107. Sloviter, R. S., Dean, E., Sollas, A. L. & Goodman, J. H. Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* **366**, 516–533 (1996).
108. Gorter, J. A., Van Vliet, E. A., Aronica, E. & Da Silva, F. H. L. Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 657–669 (2001).
109. Bertram, E. H., Lothman, E. W. & Lenn, N. J. The hippocampus in experimental chronic epilepsy: A morphometric analysis. *Ann. Neurol.* **27**, 43–48 (1990).
110. Bertram, E. H. & Lothman, E. W. NMDA receptor antagonists and limbic status epilepticus: a comparison with standard anticonvulsants. *Epilepsy Res.* **5**, 177–184 (1990).
111. Goddard, G. V., McIntyre, D. C. & Leech, C. K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* **25**, 295–330 (1969).
112. Löscher, W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem. Res.* **42**, 1873–1888 (2017).
113. Williams, P. A., Dou, P. & Dudek, F. E. Epilepsy and synaptic reorganization in a perinatal rat model of hypoxia-ischemia. *Epilepsia* **45**, 1210–8 (2004).
114. Hawkins, N. A. *et al.* Screening of conventional anticonvulsants in a genetic mouse model of epilepsy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **4**, 326–339 (2017).
115. Jucker, M. The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. *Nat. Med.* **16**, 1210–1214 (2010).
116. Yang, F., Yang, L., Wataya-Kaneda, M., Teng, L. & Katayama, I. Epilepsy in a melanocyte-lineage mTOR hyperactivation mouse model: A novel epilepsy model. *PLoS One* **15**, e0228204 (2020).
117. Serikawa, T. *et al.* Advances on genetic rat models of epilepsy. *Exp. Anim.* **64**, 1–17 (2015).
118. Tokuda, S. *et al.* The ataxic groggy rat has a missense mutation in the P/Q-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1A subunit gene and exhibits absence seizures. *Brain Res.* **1133**, 168–177 (2007).

119. Yu, F. H. *et al.* Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat. Neurosci.* **9**, 1142–1149 (2006).
120. Volosin, M. *et al.* Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: Roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J. Neurosci.* **26**, (2006).
121. Huang, Y. Z., He, X.-P., Krishnamurthy, K. & McNamara, J. O. TrkB-Shc Signaling Protects against Hippocampal Injury Following Status Epilepticus. *J. Neurosci.* **39**, 4624–4630 (2019).
122. Kery, R., Chen, A. F. & Kirschen, G. Genetic targeting of astrocytes to combat neurodegenerative disease. *Neural Regen. Res.* **15**, 199 (2020).
123. Li, J. *et al.* Comparison of electroconvulsive therapy and magnetic seizure therapy in schizophrenia: Structural changes/neuroplasticity. *Psychiatry Res.* **312**, 114523 (2022).
124. Gall, C. M. Seizure-Induced Changes in Neurotrophin Expression: Implications for Epilepsy. *Exp. Neurol.* **124**, 150–166 (1993).
125. Lu, B., Nagappan, G. & Lu, Y. BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. in 223–250 (2014). doi:10.1007/978-3-642-45106-5\_9.
126. Falcicchia, C. *et al.* Seizure-Suppressant and Neuroprotective Effects of Encapsulated BDNF-Producing Cells in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **9**, 211–224 (2018).
127. Baxendale, S. Cognitive rehabilitation and prehabilitation in people with epilepsy. *Epilepsy Behav.* **106**, 107027 (2020).
128. Ernfors, P., Bengzon, J., Kokaia, Z., Persson, H. & Lindvall, O. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during *kindling* epileptogenesis. *Neuron* **7**, 165–176 (1991).
129. Hashimoto, K. *et al.* Behavioral changes and expression of heat shock protein hsp-70 mRNA, brain-derived neurotrophic factor mRNA, and cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain following seizures induced by systemic administration of kainic acid. *Brain Res.* **804**, 212–223 (1998).
130. Mudo, G., Jiang, X. H., Timmusk, T., Bindoni, M. & Belluardo, N. Change in Neurotrophins and Their Receptor mRNAs in the Rat Forebrain After Status Epilepticus Induced by Pilocarpine. *Epilepsia* **37**, 198–207 (1996).
131. Nawa, H., Carnahan, J. & Gall, C. BDNF Protein Measured by a Novel Enzyme Immunoassay in Normal Brain and after Seizure: Partial Disagreement with mRNA Levels. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 1527–1535 (1995).
132. Friedman, W. J. Proneurotrophins, Seizures, and Neuronal Apoptosis. *Neurosci.* **16**, 244–252 (2010).
133. Simonato, M. Neurotrophic factors and status epilepticus. *Epilepsia* **59**, (2018).
134. Iughetti, L. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review. *Neuropeptides* **72**, 23–29 (2018).
135. VonDran, M. W. *et al.* p75 NTR, but Not proNGF, Is Upregulated Following Status Epilepticus in Mice. *ASN Neuro* **6**, 175909141455218 (2014).

136. Paradiso, B. *et al.* Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 7191–7196 (2009).
137. Palma, E. *et al.* BDNF modulates GABA A receptors microtransplanted from the human epileptic brain to *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 1667–1672 (2005).
138. Volosin, M. *et al.* Induction of Proneurotrophins and Activation of p75NTR-Mediated Apoptosis via Neurotrophin Receptor-Interacting Factor in Hippocampal Neurons after Seizures. *J. Neurosci.* **28**, 9870–9879 (2008).
139. Song, W., Volosin, M., Cragnolini, A. B., Hempstead, B. L. & Friedman, W. J. ProNGF Induces PTEN via p75NTR to Suppress Trk-Mediated Survival Signaling in Brain Neurons. *J. Neurosci.* **30**, 15608–15615 (2010).
140. Le, A. P. & Friedman, W. J. Matrix Metalloproteinase-7 Regulates Cleavage of Pro-Nerve Growth Factor and Is Neuroprotective following Kainic Acid-Induced Seizures. *J. Neurosci.* **32**, 703–712 (2012).
141. Fulmer, C. G. *et al.* Astrocyte-Derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. *J. Neurosci.* **34**, (2014).
142. ULLAL, G., MICHALSKI, B., XU, B., RACINE, R. & FAHNESTOCK, M. NT-3 modulates BDNF and proBDNF levels in naïve and kindled rat hippocampus. *Neurochem. Int.* **50**, 866–871 (2007).
143. Sun, X.-L., Chen, B.-Y., Xia, Y., Wang, J.-J. & Chen, L.-W. Functional Switch From Pro-Neurotrophins to Mature Neurotrophins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **14**, 617–625 (2013).
144. Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F. & Chao, M. V. High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* **350**, 678–683 (1991).
145. Nykjaer, A. *et al.* Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**, 843–848 (2004).
146. Zhu, H. *et al.* Time-dependent changes in BDNF expression of pentylentetrazole-induced hippocampal astrocytes in vitro. *Brain Res.* **1439**, 1–6 (2012).
147. Bergami, M. *et al.* Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *J. Cell Biol.* **183**, (2008).
148. Horn, M. R. Van, Sild, M. & Ruthazer, E. S. D-serine as a gliotransmitter and its roles in brain development and disease. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, (2013).
149. Budnik, V., Ruiz-Cañada, C. & Wendler, F. Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 160–172 (2016).
150. Thompson, A. G. *et al.* Extracellular vesicles in neurodegenerative disease — pathogenesis to biomarkers. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 346–357 (2016).
151. Goetzl, E. J. *et al.* Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer’s disease. *FASEB J.* **30**, 3853–3859 (2016).
152. Gosselin, R.-D., Meylan, P. & Decosterd, I. Extracellular microvesicles from astrocytes contain

- functional glutamate transporters: regulation by protein kinase C and cell activation. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, (2013).
153. Taylor, A. R., Robinson, M. B., Gifondorwa, D. J., Tytell, M. & Milligan, C. E. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases. *Dev. Neurobiol.* **67**, 1815–1829 (2007).
  154. Pascua-Maestro, R. *et al.* Extracellular vesicles secreted by astroglial cells transport apolipoprotein D to neurons and mediate neuronal survival upon oxidative stress. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, (2019).
  155. Proia P, Schiera G, Mineo M, Ingrassia AM, Santoro G, Savettieri G, D. L. I. Astrocytes shed extracellular vesicles that contain fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor. *Int J Mol Med* **21**, 63–7 (2018).
  156. Chen, Z. *et al.* Necroptotic astrocytes induced neuronal apoptosis partially through EVs-derived pro-BDNF. *Brain Res. Bull.* **177**, 73–80 (2021).
  157. Lafourcade, C., Ramírez, J. P., Luarte, A., Fernández, A. & Wyneken, U. MIRNAS in Astrocyte-Derived Exosomes as Possible Mediators of Neuronal Plasticity. *J. Exp. Neurosci.* **10s1**, JEN.S39916 (2016).
  158. Théry, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **7**, 1535750 (2018).
  159. Sun, H. *et al.* Extracellular vesicles derived from astrocytes facilitated neurite elongation by activating the Hippo pathway. *Exp. Cell Res.* **411**, 112937 (2022).
  160. de Rus Jacquet, A. *et al.* The LRRK2 G2019S mutation alters astrocyte-to-neuron communication via extracellular vesicles and induces neuron atrophy in a human iPSC-derived model of Parkinson's disease. *Elife* **10**, (2021).
  161. Li, D. *et al.* Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *Glia* **68**, 878–897 (2020).
  162. Lin, T. W., Harward, S. C., Huang, Y. Z. & McNamara, J. O. Targeting BDNF/TrkB pathways for preventing or suppressing epilepsy. *Neuropharmacology* **167**, 107734 (2020).
  163. Tekgul, H. *et al.* CSF levels of a set of neurotrophic factors (brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor) and neuropeptides (neuropeptide Y, galanin) in epileptic children. *J. Clin. Neurosci.* **76**, 41–45 (2020).
  164. Schauwecker, P. E. The relevance of individual genetic background and its role in animal models of epilepsy. *Epilepsy Res.* **97**, 1–11 (2011).
  165. Nowroozi, A., Salehi, M. A. & Mohammadi, S. Brain-derived neurotrophic factor in patients with epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsy Res.* **178**, 106794 (2021).
  166. Fonseca-Gomes, J. *et al.* TrkB-ICD Fragment, Originating From BDNF Receptor Cleavage, Is Translocated to Cell Nucleus and Phosphorylates Nuclear and Axonal Proteins. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, (2019).
  167. Lew, J. CDK5: A new lead to survival. *Cell Cycle* **12**, 1981–1982 (2013).

168. Brito, V. *et al.* Imbalance of p75NTR/TrkB protein expression in Huntington's disease: Implication for neuroprotective therapies. *Cell Death Dis.* **4**, (2013).
169. Liddelow, S. A. & Sofroniew, M. V. Astrocytes usurp neurons as a disease focus. *Nat. Neurosci.* **22**, (2019).
170. Raof, R. *et al.* Cerebrospinal fluid microRNAs are potential biomarkers of temporal lobe epilepsy and status epilepticus. *Sci. Rep.* **7**, 3328 (2017).
171. Guescini, M. *et al.* Microvesicle and tunneling nanotube mediated intercellular transfer of g-protein coupled receptors in cell cultures. *Exp. Cell Res.* **318**, 603–613 (2012).
172. Guitart, K. *et al.* Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein. *Glia* n/a-n/a (2016).
173. Luarte, A. *et al.* Astrocyte-Derived Small Extracellular Vesicles Regulate Dendritic Complexity through miR-26a-5p Activity. *Cells* **9**, 930 (2020).
174. YANG, G. *et al.* DNA methyltransferase 3, a target of microRNA-29c, contributes to neuronal proliferation by regulating the expression of brain-derived neurotrophic factor. *Mol. Med. Rep.* **12**, 1435–1442 (2015).
175. Simmons, D. A. *et al.* A Small Molecule p75NTR Ligand, LM11A-31, Reverses Cholinergic Neurite Dystrophy in Alzheimer's Disease Mouse Models with Mid- to Late-Stage Disease Progression. *PLoS One* **9**, e102136 (2014).
176. Neckles, V. N. *et al.* A transgenic inducible GFP extracellular-vesicle reporter (TIGER) mouse illuminates neonatal cortical astrocytes as a source of immunomodulatory extracellular vesicles. *Sci. Rep.* **9**, 3094 (2019).
177. Nørgård, M. Ø. *et al.* A new transgene mouse model using an extravesicular EGFP tag enables affinity isolation of cell-specific extracellular vesicles. *Sci. Rep.* **12**, 496 (2022).
178. Mallocci, M. *et al.* Extracellular Vesicles: Mechanisms in Human Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **30**, 813–856 (2019).
179. Vezzani, A., Friedman, A. & Dingledine, R. J. The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology* **69**, 16–24 (2013).
180. Long, Q. *et al.* Intranasal MSC-derived A1-exosomes ease inflammation, and prevent abnormal neurogenesis and memory dysfunction after status epilepticus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, (2017).