



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A VALPROATO SOBRE LA
ACTIVIDAD GLIAL DEL GIRO DENTADO**

T É S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

ARMANDO ORTEGA XIQUE

TUTOR Y CO- TUTOR DE TESIS

DR. DANIEL REYES HARO

DR. ADÁN HERNÁNDEZ CORTÉS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR

DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ

DRA. GINA LORENA QUIRARTE

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRIA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

JURIQUILLA, QUERÉTARO, NOVIEMBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Tesis realizada en el laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Daniel Reyes Haro y la co-tutoría del Dr. Adán Hernández Cortés. Armando Ortega Xique recibió apoyo económico del CONACYT con número de CVU/becario 858785/629838. Además, contó con el financiamiento PAPIIT-UNAM IN205718.

El presente trabajo está dedicado a mi familia, a mis padres, mi hermana, y mi futura esposa, quienes me han apoyado incondicionalmente y son el motivo principal para dar mi máximo esfuerzo cada día. Gracias por todo su amor, su apoyo y su confianza, los amo mucho.

“Es preciso sacudir energicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes”

Santiago Ramón y Cajal

*“La vida no se apodera del mundo mediante el combate,
sino por la composición de redes”*

Lynn Margulis

AGRADECIMIENTOS

Tutor principal de tesis y co tutor

Dr. Daniel Reyes Haro

Dr. Adán Hernández Cortés

Comité tutorial

Dra. Gina Lorena Quirarte

Dr. Gerardo Ramírez Rodríguez

Titular del laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Técnico Académico del laboratorio D15

MC. Ángeles Edith Espino Saldaña

Bioterio

Dra. Alejandra Castilla León

MVZ. José Martín García Servín

Posgrado y Unidad de Enseñanza

Dra. Nuri Aranda

Unidad de Videoconferencia

Lic. Ma. Lourdes Lara

Unidad de Microscopia

Ing. Elsa Nydia Hernández

Auxiliar del Laboratorio

Marina Ramírez (Doña Mary)

Integrantes del laboratorio D14/15

Dra. Stephanie C. Thebault

Dr. Luis R. Rodríguez

Cynthia A. Rodríguez Arzate **

MVZ. Alma Leticia Avilés*

MC. Ma. Berenice Soria Ortiz**

Dr. Juan Antonio Contreras Vite

IBT. Emmanuel Labrada Moncada**

IBT. Oscar Saúl Morales Tafoya*

QFB. Pamela Reyes Ortega

QFB. Karina Durán Ríos*

MC. Gabriela Gómez González**

Ramsés Noguez Imm**

QFB. Elizabeth Pereida**

Clara K. Villegas

QFB. Marianne Mendoza**

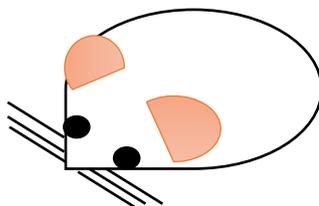
Marimar Becerra González**

QFB. Joel Gallardo Camino

*** próximo (a) maestro (a) en ciencias**

**** próximo (a) doctor (a) en ciencias**

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Alejandra Castilla León, por su valioso apoyo en el suministro de animales en el bioterio que nunca me dejó sin material para realizar mi trabajo; gracias a la M en C. Leonor Casanova Rico, por su valioso apoyo en el seguimiento y apoyo en los trámites al inicio de la maestría, sin su apoyo cuando más perdido estaba en el seguimiento de trámites, seguramente me hubiera puesto en severos aprietos más de una ocasión; a la Dra. Nuri Aranda y a la Lic. Ma. Carmen Mendoza (Carmelita) por su apoyo con los trámites de titulación y mis múltiples dudas en ese tipo de procesos burocráticos. Gracias a mis amigos y compañeros del laboratorio (Lety, Oscar, Bere, Cynthia (Ale), Marianne, Kari, Emmanuel, Clara, Ana, Gaby, Freya, Bhavya), de todos aprendí y me llevo algo valioso, gracias a quienes me enseñaron y me apoyaron para realizar las técnicas y análisis que requería para mi proyecto, gracias por su paciencia, por compartir su tiempo, su conocimiento y su valiosa amistad. Finalmente, pero no menos importante, agradezco a mis sujetos de experimentación, a mis queridos ratoncitos con los que realicé este trabajo y de quienes tomé su existencia con el fin de realizar este proyecto y continuar mi formación, solo espero honrar su vida y haberlos aprovechado de una buena manera.



INDICE

Abstract	11
Estructura y desarrollo del Hipocampo y Giro Dentado	13
Astroglía	16
Interacciones neurona- glía	17
VPA y modelos murinos	19
Transitorios espontáneos y ondas de calcio como mecanismo de comunicación intercelular de las células gliales	22
Justificación	27
Hipótesis	27
Objetivo General	28
Objetivos Particulares	28
Metodología	29
Tasa de la ganancia de peso	29
Prueba de enderezamiento	29
Prueba de identificación del nido	30
Preparación de rebanadas del hipocampo	31
Evaluación de la sulforodamina B como molécula reportera de las células GFAP+ en el GD	31
Estudios de Imagen de Calcio	32
Análisis de la extensión de la red funcional de las células gliales	33
Análisis estadístico	33
RESULTADOS	35
La exposición postnatal temprana a VPA disminuye la ganancia de peso en los neonatos	35
El VPA aumenta la latencia del reflejo de enderezamiento	35
La exposición postnatal a VPA no modifica la latencia de reconocimiento de nido	35
La Sulforodamina B co-localiza con 75% de las células GFAP+	37
La exposición postnatal a VPA no modifica la extensión funcional de la onda de calcio pero disminuye la excitabilidad glial.	39
La exposición al VPA reduce la frecuencia de las oscilaciones espontáneas de calcio en el giro dentado	41
DISCUSIÓN	43

Ganancia de peso corporal, prueba de reflejo de enderezamiento y prueba de reconocimiento del nido.....	43
Los astrocitos participan y son parte fundamental de la onda de calcio	44
La exposición postnatal temprana a VPA modifica la excitabilidad glial en la onda de calcio evocada eléctricamente.....	45
La exposición a VPA reduce la frecuencia de oscilaciones espontáneas del giro dentado.....	47
CONCLUSIONES.....	49
PERSPECTIVAS.....	49
ANEXOS.....	50
Reducción de la dosis de VPA por alta mortandad	50
Curva de calibración para evocar la onda de calcio en el GD.....	50
Peso del cerebro y relación peso corporal/ peso cerebral	51
REFERENCIAS.....	53

TABLA DE FIGURAS

FIGURA 1. LOCALIZACIÓN DE LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL Y ANATOMÍA DE HIPOCAMPO..	13
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA LAMINAR DEL HIPOCAMPO.....	14
FIGURA 3. ORGANIZACIÓN CELULAR DEL GIRO DENTADO (GD).	14
FIGURA 4. FIGURA REPRESENTATIVA DE LA PRUEBA DEL REFLEJO DE ENDEREZAMIENTO.....	29
FIGURA 5. FIGURA REPRESENTATIVA DE LA PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DEL NIDO.....	29
FIGURA 6. TASA DE GANANCIA DE PESO CORPORAL Y REFLEJO DE ENDEREZAMIENTO.....	36
FIGURA 7. LA SRB SE INCORPORA PREFERENTEMENTE EN CÉLULAS GFAP+ Y MÁS DE LA MITAD DE LAS CÉLULAS QUE RESPONDEN AL ATP O QUE SON RECLUTADAS EN LA ONDA DE CALCIO SON SRB+.....	38
FIGURA 8. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL AL VPA SOBRE LA ONDA DE CALCIO EVOCADA POR DESPOLARIZACIÓN.	41
FIGURA 9. LA FRECUENCIA DE LOS TRANSITORIOS DE CALCIO ESPONTÁNEOS SE REDUCE EN EL GRUPO VPA.	42

FIGURA 10. ESTANDARIZACIÓN DE LA AMPLITUD DE CORRIENTE PARA EVOCAR LA ONDA DE CALCIO.....	51
FIGURA 11. PESO CEREBRAL EN AMBOS GRUPOS EXPERIMENTALES	52

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. BLANCOS MOLECULARES DEL VPA OBSERVADOS EN MODELOS ANIMALES DE AUTISMO INDUCIDO POR EXPOSICIÓN A VPA.....	21
TABLA 2. PESO PROMEDIO DIARIO DE LOS NEONATOS DE AMBOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	35
TABLA 3. LATENCIA DE ENDEREZAMIENTO PROMEDIO DE AMBOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	35

ABREVIATURAS

ACSF: Solución Cerebro- Espinal Artificial (por sus siglas en inglés)

ATP: Adenosina Trifosfato

BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina

CA: Cornu Ammonis

CaCl₂: Cloruro de Calcio

E (cifra): Día embrionario x, p.ej. E10 – día embrionario 10

EAAT: Transportador de aminoácidos excitadores (por sus siglas en inglés)

GABA: Ácido gamma aminobutírico o Gamma Amino Butyric Acid (por sus siglas en inglés)

GD: Giro dentado

GFAP: Proteína ácida glial fibrilar o Glial Fibrilar Acidic Protein

GFP: Proteína verde fluorescente o Green Fluorescent Protein (por sus siglas en inglés)

Hz: Hertz

IP₃: Inositol 3,4,5 trifosfato

KCl: Cloruro de Potasio

K₂HPO₄: Fosfato dibásico de Potasio

NaCl: Cloruro de Sodio

NaHCO₃: Bicarbonato de Sodio

nm: Nanómetros

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

mM: Millimolar

OATP: Polipéptido Transportador de Ácidos orgánicos (por sus siglas en inglés)

P (cifra): Día postnatal x, p.ej. P2 – día postnatal 2

SNC: Sistema Nervioso Central

SRB: Sulforodamina B

μA: Microamperios

μm: Micrometros

μM: Micromolar

VGAT: transportador vesicular de GABA (por sus siglas en inglés)

VPA: Ácido valproico o Valproic Acid (por sus siglas en inglés)

Resumen

El hipocampo se ubica dentro del lóbulo temporal intermedio del cerebro, forma parte del sistema límbico y participa activamente en procesos de memoria y aprendizaje. Dentro de la estructura hipocampal encontramos al giro dentado (GD), una región en donde ocurre la neurogénesis en etapas tempranas del desarrollo y se continúa durante la etapa adulta, como se ha determinado en roedores y otros sujetos de experimentación. La organización celular del GD incluye a la astrogliá, identificada por la expresión de la proteína ácido gliofibrilar (GFAP) y por la incorporación selectiva del fluoróforo sulforodamina B (SRB). Parte de estas células son de tipo radial y originan tanto astrocitos como precursores neuronales. La gliogénesis en el ratón inicia alrededor del día embrionario 18 (E18) y continúa durante la primera semana postnatal. Sin embargo, la administración de fármacos como el ácido valproico (VPA) en esta etapa del desarrollo puede alterar tanto su proliferación como su diferenciación, lo que podría afectar la fisiología celular del GD. El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto del VPA sobre la frecuencia de los transitorios espontáneos de calcio y la extensión funcional de las ondas de calcio asociadas a la astrogliá. Se utilizaron ratones macho del día postnatal 2 (P2) que recibieron 5 dosis de VPA (200 mg/Kg) intraperitoneal, cada 12 horas y se monitoreó la ganancia de peso hasta P10. Los ratones (P9- 11) se sacrificaron, el cerebro se aisló y se obtuvieron rebanadas coronales (250 μ m) de los grupos control (inyectado con solución salina) y VPA para realizar estudios de imagen de calcio. En el primer diseño experimental se determinó la extensión funcional de la onda de calcio producida por despolarización del GD. En el segundo diseño experimental se determinó la frecuencia de oscilaciones de calcio espontáneas durante una ventana temporal de 300 s. Los resultados mostraron que la exposición a VPA redujo la ganancia de peso corporal en un -13 % y la latencia en el reflejo de enderezamiento se incrementó significativamente en un 168 % a P7 y 73 % a P8. La frecuencia de las oscilaciones de calcio espontáneas se redujo significativamente en un 32% respecto al grupo control, no obstante, este efecto desapareció en presencia de lidocaína. La extensión de la onda de calcio no se modificó significativamente con lidocaína, y tampoco se observaron diferencias entre los grupos control y VPA. No obstante, el transitorio de calcio promedio disminuyó y el número de células reclutadas aumentó

significativamente (-13.5 % y 155 %, respectivamente) en el grupo VPA con respecto al control. Con base en estos resultados se concluye que el VPA disminuye la frecuencia de los transitorios espontáneos de calcio, al mismo tiempo que disminuye la excitabilidad glial en el desarrollo postnatal temprano del giro dentado.

Abstract

The hippocampus is located inside the intermediate temporal lobe of the brain, it is part of the limbic system and is an active element in the processes of learning and memory. The dentate gyrus (DG) is a neurogenic niche in the hippocampus, not only at early stages of the development but also at adult stage. The cellular organization of DG includes astroglia, identified for its expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and for the incorporation of the fluorophore sulforhodamine B (SRB). Astroglia include radial glia, a specialized type that originates astrocytes and neuronal precursors. Gliogenesis in mice starts around embryony day 18 (E18) and continues during the first postnatal week. However, the administration of valproic acid (VPA) can alter proliferation and differentiation of astroglia at early developmental stages, this could alter the normal cellular physiology of the DG. The aim of this study was to test the effect of VPA on spontaneous calcium transients and evoked calcium waves associated to astroglia. Male mice from postnatal day 2 (P2) received 5 intraperitoneal doses of VPA (200 mg / kg), each 12 hours. Weight gain was monitored daily from P2 to P10. Mice were sacrificed, their brain isolated and coronal slices (250 μ m) from the control and VPA groups to perform calcium imaging studies. In the first experimental design depolarization of DG (200 μ A, 10Hz, 2s) evoked a calcium wave and the functional extension was measured. In the second experimental design, the frequency of spontaneous calcium transients was estimated. Our results showed that VPA reduced the body weight gain in a -13 % and the latency of righting reflex was significantly increased (168 % at P7; 73 % at P8). The frequency of spontaneous calcium transients was significantly reduced (-32 %) in the VPA group when compared to the control. Nevertheless, this effect disappeared in presence of lidocaine suggesting a neuronal component. On the other hand, the calcium wave extension was not affected by VPA, but the mean calcium transient amplitude diminished, and the number of recruited cells were

increased significantly (-13.5 % y 155 %, respectively) in a ratio of 100 μm from the stimulation point. Based on these results we concluded that VPA reduces the frequency of spontaneous calcium transients while diminishes the glial excitability in the early development of the dentate gyrus.

Introducción / Antecedentes

Estructura y desarrollo del Hipocampo y Giro Dentado

El hipocampo es una región del sistema nervioso central (SNC), que forma parte del sistema límbico y la formación hipocampal, la cual incluye el giro dentado, hipocampo, subiculum y parasubiculum, así como la corteza entorrinal. El hipocampo es una estructura laminada dividida principalmente en el cornu ammonis (CA), integrada por las capas CA1, CA2 y CA3, compuestas principalmente por interneuronas y una capa de células piramidales (Khalaf & Francis, 2013) y el giro dentado (GD). Esta estructura cumple con una variedad de funciones entre ellas su participación en procesos de memoria y aprendizaje (Robert et al., 2018).

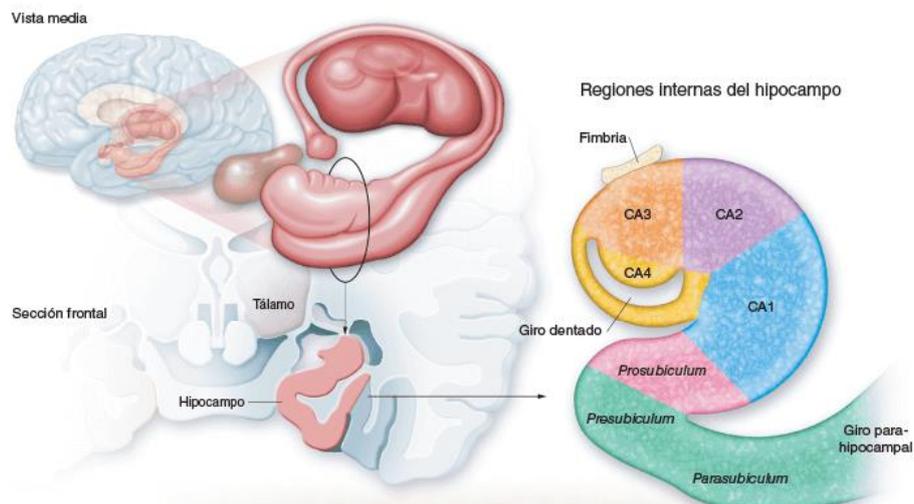


Figura 1. Localización de la formación hipocámpal y anatomía de hipocampo, modificado de www.ec-europe.com/es/ilustracion-medica/psiquiatria

El giro dentado igualmente tiene una estructura laminada, conformada por la capa molecular externa, la capa de células granulares y la capa celular polimórfica profunda o hilus (Figura 2) (Xu et al., 2014; Watson, Paxinos & Puelles, 2012), además de la zona subgranular, que es de gran interés para la neurociencia debido a sus características neurogénicas. La zona subgranular (ubicada en el límite de la capa celular granular y el hilus), contiene células progenitoras del tejido neural, en la cual se ha mostrado el establecimiento, diferenciación y migración de precursores celulares de neuronas y células gliales (Figura 3). Las células diferenciadas y maduras posteriormente pueden

integrarse al circuito hipocampal renovando y refinando los circuitos de acuerdo a las condiciones del medio en las cuales se desarrolle la neurogénesis (Drew, et al., 2013).

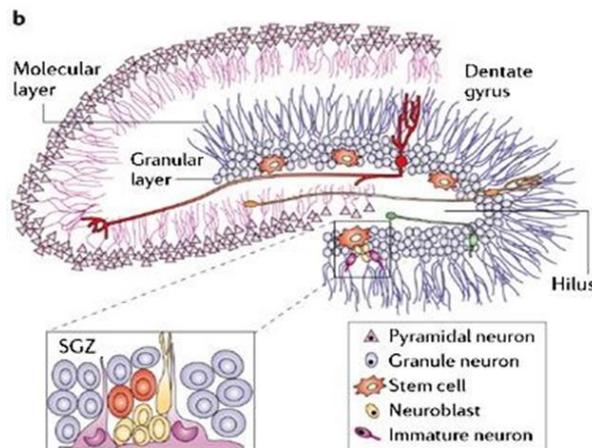


Figura 2. Representación de la estructura laminar del hipocampo. En el giro dentado (GD) se ilustra la distribución compacta de las células granulares y sus proyecciones en la capa molecular, además de otros tipos celulares encontrados en la zona sub granular (SGZ): células madre, neuroblastos y neuronas inmaduras (tomada de Vesconi et al., 2006)

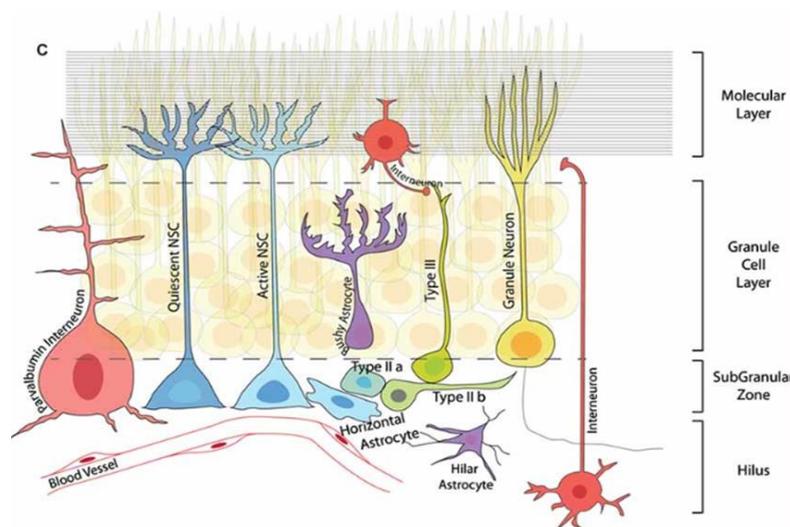


Figura 3. Organización celular del giro dentado (GD). El GD se organiza en cuatro capas: 1) La capa molecular que comprende somas de pequeñas interneuronas y proyecciones dendríticas de las neuronas granulares. 2) La capa granular que incluye somas de las neuronas granulares y astrocitos de tipo arbusto. 3) La Zona Subgranular que incluye somas de las interneuronas positivas a parvalbumina, precusores neuronales silentes y activos, astrocitos horizontales, tipo IIa y IIb, astrocitos del hilus e interneuronas (tomado de Urban & Guillemot, 2014)

El desarrollo del hipocampo comienza alrededor del día embrionario 8 (E8) con el desarrollo del dobladillo cortical (cortical Hem) y las células Cajal – Retzius, cuya expresión de morfógenos y moléculas señaladoras (Wnt, Bmp) inician y

dirigen el desarrollo y establecimiento del hipocampo (Khalaf & Francis, 2013). El giro dentado se forma predominantemente en etapas tardías de la embriogénesis y finaliza alrededor de la segunda semana postnatal, comenzando con el establecimiento de las fibras de la glía radial, seguido de la migración de los precursores y el desarrollo y diferenciación de las matrices primaria, secundaria y terciaria, la proliferación de las células granulares y finalizando con la gliogénesis tardía que involucra la diferenciación y maduración de los astrocitos (Khalaf & Francis, 2013). En el ratón el desarrollo del GD comienza alrededor de E10 como una proliferación de las células neuroepiteliales de la zona ventricular con un pequeño pliegue de la pared medial del ventrículo lateral denominado como la “muesca” dentada, a partir de esta estructura las células Cajal – Retzius dirigen y favorecen el anclaje de los pies terminales de la glía radial a la membrana basal que desempeñan la función de andamios para el tráfico y la migración celular. La glía radial desempeña un papel fundamental en el desarrollo de esta estructura, ya que es capaz de funcionar como célula precursora y como andamio que dirige la migración neuronal, principalmente en conjunto con la glicoproteína relina, en cuya ausencia la glía radial cambia su morfología y se convierte prematuramente en astrocito. Se ha observado que la inhibición de la secreción de reelina en el mutante reeler promueve la maduración temprana de la glía radial a astrocitos lo cual interfiere con la corriente migratoria celular y altera el establecimiento de las células granulares en su estrato correspondiente (Barry et al., 2008).

Estos datos sugieren que aunque en el GD la migración inicial de los precursores neuronales desde la zona ventricular que formarán la capa granular primordial y el primordio dentado han concluido, otros procesos dependientes de la actividad de las células gliales como la migración y establecimiento de precursores neuronales que formarán la capa celular granular madura y la zona subgranular, continúan durante las primeras etapas del desarrollo postnatal (Khalaf & Francis, 2013; Li & Pleasure, 2005).

Astroglía

Las células gliales constituyen más del 50% de las células nerviosas del cerebro humano (Kandel et al., 2000; Ota, 2013). Aquí se agrupan la microglía y la macroglía, la primera de origen mesodérmico y la segunda de origen ectodérmico. Esta última incluye a la glía NG2, oligodendroglía y la astroglía, siendo la astroglía el grupo predominante, más diverso y del cual los astrocitos son un subgrupo particular (Araque et al., 1999; Stipursky et al., 2011; Theodosios et al., 2008).

Los astrocitos cumplen diversas funciones que incluyen el suministro de energía, control vascular, remoción de excedentes de neurotransmisores y metabolitos tóxicos como las especies reactivas de oxígeno (ERO), por mencionar algunas (Freeman & Rowitch, 2013; Verkhratsky, 2012). No obstante, se pensaba que no participaban directamente en el procesamiento de información en el cerebro debido a que son consideradas como células eléctricamente no excitables, por no generar potenciales de acción como las neuronas, sin embargo, se ha propuesto que la excitabilidad de los astrocitos tiene como sustrato las oscilaciones transitorias de calcio intracelular que pueden ocurrir de manera espontánea o en respuesta a la actividad neuronal. En ambos casos esta respuesta puede propagarse a células gliales vecinas ya sea mediante proteínas de membrana que forman canales intercelulares comunicantes, mejor conocidas como conexinas, o a través de la liberación de ATP intracelular y su acoplamiento a los receptores purinérgicos de su membrana produciendo una “onda de calcio” o respuesta del sincitio astroglial, que revela en cierta medida la extensión y conexión funcional de la red glial (Dallérac et al., 2013; Gucek et al., 2012; Parri et al., 2001; Verkhratsky, 2012, Zorec et al., 2012). Además de ello exhiben propiedades biofísicas y eléctricas únicas, un potencial de membrana hiperpolarizado de -80 mV debido a la alta densidad de canales de potasio dependientes de voltaje, baja resistencia de entrada (4- 20 M Ω) y capacitancia (10- 25 pF), son sensibles a la actividad neuronal y capaces de modular la neurotransmisión por medio de la gliotransmisión (Araque et al., 2014; Covelo & Araque, 2018; Dallérac et al., 2013; Oliet et al., 2004; Verkhratsky, 2006). Finalmente es importante mencionar que se puede estudiar fácilmente el papel de estas células en distintos procesos

biológicos a través de la expresión de proteínas marcadoras específicas como vimentina, nestina y GFAP (Nicola, Favel & Kempermann, 2015; Nolte et al., 2001), así como a través del marcaje selectivo con la molécula sulforodamina (101, B, G). (Appaix et al., 2012; Kafitz et al., 2007; Nimmerjahn, Kirchhoff, Kerr & Helmchen, 2004; Schnell et al., 2012; Verant, Serduc, Vial & Van der Sanden, 2008).

Por ejemplo, los astrocitos de la región hipocámpal CA1 responden selectivamente a las aferencias del alveus y las colaterales de Schaffer, más aún son capaces de integrar la información de ambas vías (Perea & Araque 2005). A su vez, la excitabilidad astrocítica produce la liberación de gliotransmisores que modulan la actividad neuronal (Perea & Araque, 2005; Perea, Sur & Araque, 2014; Verkhratsky et al., 2006; Zorec et al., 2012). Inclusive, se ha mostrado que la activación de los astrocitos del hipocampo *in vivo*, pueden estar involucrados en el proceso de potenciación neuronal y el mejoramiento de la memoria. Adamsky et al., (2018) mostraron que la activación del receptor acoplado a proteína G (hM3Dq) en los astrocitos mediante la aplicación de clozapina N-óxido (CNO, por sus siglas en inglés), generaba el aumento en la señalización de calcio de los astrocitos y era suficiente para inducir un aumento en la frecuencia y amplitud de los EPSC de las colaterales de Schaffer, esto al parecer a través de la liberación de D-serina y su efecto sobre la actividad de los receptores NMDA. Este proceso se tradujo como una mejora en el proceso de adquisición de la memoria en los animales en las pruebas de laberinto en T y condicionamiento aversivo.

Interacciones neurona- glía

Existe evidencia experimental de que las interacciones neurona - astroglia desempeñan un papel importante en eventos del desarrollo temprano del cerebro. Por ejemplo, estas interacciones modulan la regulación de la migración y diferenciación de progenitores neurales o neuronas en el cerebro en desarrollo a través de las oscilaciones de calcio transitorias de los astrocitos mediadas por IP₃, independientes de la actividad neuronal y coincidentes con el pico de proliferación neuronal en el tálamo ventrobasal (Parri & Crunelli, 2002;

Weissman et al., 2004). Otro ejemplo es la regulación del crecimiento de las neuritas y el cono axónico de las neuronas adyacentes a través de la expresión de proteínas de la matriz extracelular como N- Cadherina, dependiente de las oscilaciones transitorias de calcio astrocíticas mediadas por IP_3 (Kanemaru et al., 2007), la estimulación de la motilidad y migración de las interneuronas durante el desarrollo o la potenciación de la transmisión sináptica (Parri & Crunelli, 2002; Uhlén et al., 2014). La modulación de estos procesos se logra a través de diferentes mecanismos de señalización, entre los cuales destacan la actividad oscilatoria de calcio espontánea de los astrocitos, la liberación de señales difusibles como ATP, glutamato o GABA y la expresión de moléculas de adhesión celular como la cadherina (Kanemaru et al., 2007; Parri & Crunelli, 2002; Stipursky, 2011; Uhlén et al., 2015; Weissman et al., 2004). La investigación de las interacciones glio - neuronales mediante modelos animales genéticos o farmacológicos ha mostrado que la alteración de esta comunicación puede modificar la modulación de la actividad sináptica y percibirse como parte de cuadros anormales conductuales e incluso patológicos del sistema nervioso o del organismo completo. Un ejemplo de ello pueden ser los modelos farmacológicos de autismo inducido por exposición al ácido valproico (VPA), en períodos críticos del desarrollo y a través de un mecanismo epigenético mediado por la inhibición de la desacetilación de histonas (Gurvich et al., 2004; Lee et al., 2015), lo que produce una expresión génica alterada. Esto puede afectar la proliferación de precursores gliales y neuronales, el arreglo normal de los circuitos sinápticos se modifica y esto resulta en un desbalance sináptico de la excitación / inhibición de proteínas relacionadas con las sinapsis excitadoras e inhibitoras, en específico neuroligina 1, el transportador de aminoácidos excitadores (EAAT), el transportador vesicular de GABA (VGAT) y el marcador de post- sinapsis excitadoras PSD 95 (Wang et al., 2012). En este sentido Kumamaru y colaboradores (2014), mostraron que el VPA a través de su mecanismo como inhibidor de las desacetilasas de histonas redujo la expresión de VGAT y las sinapsis relacionadas a ella, generando a su vez la supresión del crecimiento axonal de las neuronas inhibitoras, de igual manera, Wang y colaboradores (2012), mostraron que la aplicación de VPA en cultivos neurogliales modifica la expresión de proteínas sinápticas como VGAT, PSD 95, EAAT y neuroligina 1. En el caso específico del giro dentado, se conoce poco acerca

de los efectos fisiológicos que tiene la exposición al VPA; algunos estudios realizados con el modelo de exposición prenatal sugieren que la exposición a este fármaco promueve una mayor proliferación celular en la zona sub granular y granular del GD, así como una mayor transcripción de genes relacionados con interneuronas gabaérgicas (Edalatmanesh et al., 2013; Hou et al., 2018; Kinjo et al., 2019; Watanabe et al., 2017). Por otra parte, en lo que respecta al componente glial del giro dentado, se ha observado una mayor proliferación de astrocitos y microglía en la capa molecular e hilus, especialmente en etapas tempranas del desarrollo (Kazlauskas et al., 2016; Bronzuoli et al., 2018). Estos antecedentes, ubicados en un contexto temporal del desarrollo del GD en el que se están llevando a cabo procesos de migración, diferenciación celular y sinaptogénesis, podrían sugerir que la exposición a VPA podría afectar el desarrollo y funcionamiento de los circuitos sinápticos y la organización celular de esta estructura (incluyendo las poblaciones celulares de la zona subgranular) a través de la proliferación alterada de precursores gliales y neuronales, resultando en una posible disfunción del circuito hipocampal y neurogénesis adulta alterada. Este tipo de modelos y aproximaciones experimentales están aportando nueva evidencia acerca de las interacciones glio – neuronales en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso.

VPA y modelos murinos

El ácido valproico (VPA) cuyo nombre formal es ácido 2- propilpentanóico, es un ácido graso de cadena ligera ramificada de ocho carbonos, poco liposoluble y altamente ionizable a pH fisiológico (Löscher, 1999). Es un anticonvulsivo de amplio espectro utilizado como agente terapéutico en el tratamiento de crisis convulsivas, cefaleas, migraña y algunos trastornos del estado de ánimo. Uno de los principales problemas de su uso, son sus efectos teratogénicos y por tanto alteraciones en el neurodesarrollo cuando se produce una exposición prenatal (Deshmukh et al., 2016; López- Hernández et al., 2005, Fujimura et al., 2017). El tratamiento con VPA en personas jóvenes y adultos tiene muy pocos efectos negativos o tóxicos, sin embargo, el tratamiento de mujeres embarazadas afecta el desarrollo normal del feto con muy alto riesgo de generar daño hepático y

alteraciones en el desarrollo normal del sistema nervioso central (SNC). Esto se debe al poco desarrollo de las enzimas involucradas en el metabolismo del fármaco (Glucuroniltransferasa, Citocromo P450) y la muy baja capacidad de eliminación en fetos y niños (Löscher, 1999, Lloyd, 2013).

La exposición prenatal y postnatal al VPA en modelos murinos reproduce conductas asociadas al trastorno del espectro autista en humanos. Algunas de ellas son déficits de interacción social, dificultad en el reconocimiento de objetos, hiperactividad, conductas repetitivas, efectos sobre el desarrollo de la motricidad y otros parámetros del desarrollo como la ganancia de peso corporal y la discriminación olfatoria, los cuales, parecen tener variación con respecto a las condiciones experimentales (edad de los animales, concentraciones de fármaco administradas, exposición pre o postnatal, etcétera) (Favre et al., 2013; Kazlauskas et al., 2016; Schneider & Przewlocki, 2005; Wagner et al., 2006). Además de esto, se han observado anomalías celulares en el SNC características de dicho padecimiento como la disminución de la densidad de células de Purkinje, alteración en la densidad celular de ciertas áreas cerebrales y del volumen cerebral (Crawley, 2007; Deshmukh et al., 2016; Fujimura et al., 2017; Mony et al., 2016; Wagner et al., 2006). La baja liposolubilidad y alto grado de ionización tiene como resultado que sólo una pequeña parte del VPA pueda distribuirse de la sangre a los tejidos por difusión pasiva y pueda unirse a las proteínas plasmáticas. Sin embargo, ocurre el caso contrario en su entrada al cerebro y al líquido cefalorraquídeo ya que ésta sucede rápidamente, siendo una posible explicación su transporte por el transportador sensible a probenecid o polipéptido transportador de ácidos orgánicos (OATP 1 y 3), en la barrera hematoencefálica (Löscher, 1999).

Se han propuesto diferentes mecanismos de acción a través de los cuales el VPA pueda ejercer su acción anticonvulsiva, pero también para explicar sus efectos teratogénicos y tóxicos en el desarrollo del SNC. Los mecanismos de acción anticonvulsiva que produce la administración de VPA abarcan diversos blancos moleculares que incluyen canales iónicos, receptores y enzimas involucradas en la neurotransmisión, proteínas de adhesión, andamiaje sináptico y proteínas relacionadas con la regulación de la expresión de genes como las desacetilasas de histonas H3 y H4, entre otros (Löscher, 1999, Lee et al., 2016;

Wang et al., 2012). Uno de los principales mecanismos de acción del VPA es la inhibición de la desacetilación de histonas (Lee et al., 2016). Este efecto epigenético produce la relajación de la cromatina y una transcripción de genes elevada, promoviendo la proliferación de poblaciones neuronales y gliales, alteración en la síntesis de proteínas relacionadas al citoesqueleto, receptores y canales iónicos, reguladores transcripcionales y epigenéticos, entre otros (Hulbert et al., 2016), los cuales participan en la replicación de fenotipos que asemejan las conductas características del autismo en humanos. Algunos de los genes implicados en la expresión de fenotipos similares al autismo en modelos animales son *Mecp2* (metilación del DNA y remodelado de la cromatina), *Cntnap* (molécula de adhesión celular presináptica), *Fmr1* (hipermetilación y silenciamiento de genes), *TSC1*, *TSC2* (regulación del control del ciclo celular), *Pten* (regulación del control del ciclo celular), *Shank* (proteínas de andamiaje en la densidad postsináptica), neurexinas y neuroliginas (moléculas de adhesión presináptica y postsináptica) (Ergaz et al., 2016; Ito et al., 2017; Hulbert et al., 2016; Schroeder et al., 2016, Verghese et al., 2017). De estos genes mencionados, se sabe que *Mecp2* y neuroliginas son afectados por la exposición a VPA y que causan defectos morfológicos en células granulares, establecimiento de espinas dendríticas y el adecuado establecimiento y maduración de sinapsis (Kolozi et al., 2009, Verghese et al., 2017). Tales tipos de alteraciones en períodos críticos prenatales y postnatales alteran la trayectoria del desarrollo y pueden conferir vulnerabilidad a una variedad de desórdenes en etapas posteriores. Los modelos animales de exposición a VPA pueden ayudar a comprender mejor la neurobiología de la patología (Mony et al., 2016; Lee et al., 2016) y permiten la exploración de otros mecanismos biológicos y componentes celulares que podrían participar en el desarrollo de la patología y tener consecuencias en el funcionamiento y desarrollo del SNC (Tabla 1), tal es el caso de la fisiología de las células gliales.

TABLA 1. Blancos moleculares del VPA observados en modelos animales de autismo inducido por exposición al VPA.

Blanco molecular	Función	Efecto del VPA
Ciclina D1, cinasa dependiente de ciclina 2 y cinasa dependiente de ciclina 4	Control del ciclo celular, transición de la fase G1 a fase S	Aumento en la cantidad de las proteínas y enzimas reguladoras (Fujimura et al., 2017)
Desacetilasas de histonas (HDAC's)	Regulación de la transcripción del ADN	Inhibición de las HDAC's e hiperacetilación del core de histonas H3 y H4 (Gurvich et al., 2004, Fukuchi et al., 2009)
mRNA de GAD 67	(GAD 67) enzima implicada en la síntesis de GABA	Disminución de los niveles del RNA mensajero y de la cantidad de células GAD67+ (Fukuchi et al., 2009)
Exones I – IX de BDNF	Factor trófico neuronal y participante de la transmisión sináptica excitadora	Aumento de los niveles de expresión del mRNA de BDNF (Fukuchi et al., 2009)
NLGN3 (neurologina 3)	Proteína de adhesión celular postsináptica	Disminución de los niveles de mRNA de neurologina 3 en hipocampo (Kolozsi et al., 2009)
MECP2 (Methyl CpG binding protein 2)	Proteína involucrada en la metilación del DNA y remodelación de la cromatina	Disminución de la expresión de la proteína (Kim et al., 2016)
SHANK 2 y 3	Proteínas de andamiaje en la densidad postsináptica	Disminución de la expresión del mRNA (Kawanai et al., 2016)

Transitorios espontáneos y ondas de calcio como mecanismo de comunicación intercelular de las células gliales

El calcio es un elemento químico de gran relevancia, ya que desempeña papeles preponderantes en diversos procesos biológicos que van desde ser cofactores

enzimáticos, segundos mensajeros en rutas de señalización celular, contracción muscular, regulador del ciclo celular y en la neurotransmisión, entre otros (Pinto et al., 2016). Dentro de esta diversidad de procesos biológicos mediados por calcio están los cambios transitorios en su concentración intracelular y su difusión, lo que constituye la base de la comunicación intercelular y la “excitabilidad” glial (Zorec et al., 2012). La señalización de calcio glial se produce ante un estímulo despolarizante que resulta en un incremento en la concentración intracelular de calcio (Verkhratsky et al., 2012). La señalización de calcio involucra la participación de tres compartimentos celulares principales: el citoplasma, el retículo endoplásmico y la mitocondria, así como de canales de calcio dependientes de voltaje, los canales-receptores de potencial transitorio (TRPC, por sus siglas en inglés), receptores ionotrópicos permeables a calcio, receptores a IP_3 , receptores a rianodina y el intercambiador sodio-calcio (NCX), entre otros (Parri & Crunelli, 2002; Skupin et al., 2008; Verkhratsky, Rodriguez & Parpura, 2012, Zorec et al., 2012).

La comunicación glial, a través de estos incrementos transitorios de calcio se divide en dos mecanismos principales: 1) las oscilaciones transitorias espontáneas y / o intrínsecas que ocurren en una célula y 2) las ondas de calcio, aquí el transitorio de calcio se propaga a células vecinas. Las oscilaciones espontáneas se caracterizan por tener una duración de segundos, tener diferentes patrones de duración, frecuencia y amplitud y generalmente están correlacionados con la actividad neuronal, ocurren tanto en cultivos gliales como en rebanadas cerebrales (*in situ*) o en el cerebro (*in vivo*) y su mecanismo de acción se basa en la participación de los receptores a IP_3 , rianodina y a neurotransmisores, destacando el caso de los receptores purinérgicos (Kanemaru, Okubo, Hirose & Lino, 2007; Nett, Oloff & McCarthy, 2017; Shipke & Kettenmann, 2004; Wang et al., 2006). Por su parte las ondas de calcio son señales intercelulares cuya característica es la participación sincronizada del sincitio astroglial, no sólo los cambios transitorios de células individuales pueden producirse de manera espontánea o por estimulación mecánica o eléctrica. Estas respuestas gliales están correlacionadas con la sincronización de la actividad neuronal, la regulación del ciclo celular, la expresión de genes, la proliferación y la diferenciación celular (Pinto et al., 2016; Rabellato et al., 2013; Toth et al.,

2016). La comunicación glial involucra la participación de las conexinas que son proteínas de membrana que forman uniones comunicantes entre las células, mejor conocidas como gap junctions y la participación de los receptores purinérgicos, en donde al parecer, las uniones comunicantes funcionan como iniciadores de la señalización intercelular entre las células proximales y la señalización por ATP es responsable de la propagación de esta señal a larga distancia (Fuji, Meakawa & Morita, 2017; Weissman et al., 2004).

Diversos estudios resaltan la importancia de esta comunicación intercelular basada en las oscilaciones transitorias de calcio en etapas tempranas del desarrollo del SNC, por ejemplo, Komuro y Kumada (2005), reportaron que la frecuencia de los transitorios espontáneos de calcio correlaciona positivamente con la tasa de migración en las células granulares del cerebelo de ratones neonatos. Asimismo, se sugiere que los cambios en la velocidad de migración observados en los límites de las capas celulares es resultado de la interacción con señales extracelulares (por ejemplo, neurotransmisores), que ayudan a dirigir y completar la migración de las células granulares hacia su destino final (Komuro & Kumada, 2005). Otro ejemplo es el estudio de Kanemaru y colaboradores (2007), quienes reportaron que existe una relación entre la señalización de calcio astrocítica, la expresión de N- Cadherina y el crecimiento de las neuritas de las neuronas en el hipocampo. Esto al observar que el contacto con astrocitos deficientes en su señalización de calcio (a través de la actividad de los receptores a IP_3 en el ratón R343-A $5ppase$) y con baja expresión de la proteína de matriz extracelular N- cadherina disminuía la longitud de las neuritas, la velocidad de crecimiento del cono axónico generaba patrones irregulares de movimiento del cono axónico e incluso retracción durante su crecimiento. De esta información se puede deducir que la interferencia en los procesos de señalización de calcio durante el desarrollo podría modificar procesos biológicos, tales como la migración, proliferación, diferenciación celular e incluso sinaptogénesis (Kanemaru et al., 2007). Por ejemplo, se ha observado que el uso de drogas inhibitoras de los canales de calcio tipo L, T (store- operated channels, SOC) durante el desarrollo, generan una disminución de la propagación de señales transitorias de calcio en la glía radial y una consecuente disminución de la proliferación celular en zonas neurogénicas (Rabellato et al.,

2013). En este sentido Weissman y colaboradores (2004), reportaron que la señalización por ondas de calcio ocurre de manera espontánea y evocada en las células de la glía radial durante el desarrollo cortical, dicha actividad está mediada por ATP y activación de los receptores purinérgicos P2Y₁; además, está involucrada en la migración y generación de neuronas corticales a partir de precursores celulares no diferenciados procedentes de la zona ventricular. Más aún, demostró que dicha actividad era dependiente de la fase del ciclo celular en la que se encontraban las células de la glía radial, siendo más responsivas durante la fase S y coincidiendo con el período de mayor proliferación (E15-E16). Posteriormente, confirmó que los transitorios de calcio mediados por ATP regulaban la proliferación celular con esto, al utilizar antagonistas de receptores purinérgicos y observando la correspondiente disminución del marcaje de células con BrdU (indicador de proliferación celular). Finalmente, la administración de fármacos antiepilépticos (VPA, gabapentina y fenitoína) en etapas críticas del desarrollo reduce la frecuencia y la amplitud de los eventos transitorios de calcio en los astrocitos de la corteza somatosensorial primaria de la rata *in vivo* (Tian et al., 2005).

Respecto a la actividad de calcio en el giro dentado, es poca la información disponible tanto para neuronas, como para glía; se sugiere que la disminución de la actividad de calcio neuronal y glial está relacionada con una disminución en la actividad sináptica que está involucrada en procesos como memoria espacial o reconocimiento de objetos, actividad que es procesada en el giro dentado. Esta idea tiene sentido, ya que al parecer la actividad de calcio astrocítica en el giro dentado tiene un componente dirigido por la actividad neuronal de las sinapsis que están rodeando y que pertenecen al circuito tri sináptico de las células granulares, la vía perforante y la corteza entorrinal.

Se ha observado que en el hipocampo (incluyendo el giro dentado) los astrocitos presentan oscilaciones espontáneas que pueden ser dependientes o independientes de la actividad neuronal dependiendo de la capa celular a la que pertenezcan (Haustein et al., 2014; Khakh & Sofroniew, 2017; Nett et al., 2002); y se pueden clasificar de acuerdo a dos principales tipos de transitorios de calcio reportados en los astrocitos del hipocampo y el giro dentado, unos de corta duración y extensión, y otros de larga duración (Di Castro et al., 2011; Khakh &

Sofroniew, 2017; Nett et al., 2002). Finalmente, cabe mencionar que el principal mecanismo que genera estas señales de calcio independientes de la actividad neuronal es principalmente por la unión de ATP a los receptores purinérgicos (principalmente P2Y1), la generación de IP3 y su acción sobre los receptores tipo II a IP3 en el retículo endoplásmico, produciendo la liberación de calcio de los depósitos intracelulares del retículo endoplásmico (Kanemaru et al., 2007; Shigetomi et al., 2018; Wang et al., 2006). Mientras que aquellos transitorios dependientes de la actividad neuronal responden a la actividad neuronal intensa y la liberación espontánea de neurotransmisor de las terminales sinápticas (Di Castro et al., 2011; Haustein et al., 2014).

Justificación

Estudios previos reportaron que la exposición a VPA (pre y postnatalmente) generan alteraciones estructurales y funcionales en áreas como la corteza, la amígdala, el cerebelo y el hipocampo, incluyendo el giro dentado (Hulbert et al., 2016; Komuro y Kumada, 2005; Kanemaru et al., 2007; Lee et al., 2016; Mony et al., 2016; Wang et al., 2012). Las alteraciones en la señalización de calcio de las células gliales, podría modificar el desarrollo normal de los circuitos sinápticos del GD. Por ello, en este estudio se evaluará si la administración postnatal de VPA modifica la frecuencia de los transitorios espontáneos y ondas de calcio durante el desarrollo postnatal temprano del GD.

Hipótesis

- La exposición a VPA alterará la ganancia de peso corporal y las latencias del reflejo motor de enderezamiento y de la identificación del nido.
- La exposición a VPA reducirá la frecuencia de los transitorios de calcio espontáneos en las células nerviosas del GD
- La extensión funcional de la onda de calcio se incrementará por la exposición a VPA.

Objetivo General

Determinar el efecto de la exposición postnatal al VPA sobre la frecuencia de los transitorios espontáneos y la extensión funcional de las ondas de calcio en el GD.

Objetivos Particulares

1. Evaluar el desarrollo de los ratones expuestos postnatalmente al VPA en comparación con el grupo control en los siguientes parámetros:
 - a) Ganancia de peso corporal y peso cerebral
 - b) Reflejo de enderezamiento
 - c) Prueba de identificación del nido
2. Determinar la efectividad del uso de la sulforodamina B (SRB) como reportero de las células GFAP⁺ que participan en la onda de calcio en el GD.
3. Investigar el efecto del VPA sobre la extensión funcional de la onda de calcio evocada por despolarización del GD.
4. Analizar el efecto del VPA sobre la frecuencia de las oscilaciones de calcio espontáneas en los astrocitos del GD.

Metodología

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones establecidas en la guía para el uso y cuidado de animales de experimentación en el laboratorio (Reglamento interno y manual de organización del Comité de Ética en Investigación del Instituto de Neurobiología- UNAM; Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio), aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto de Neurobiología- UNAM.

Todos los ratones se mantuvieron en un cuarto estéril con ciclos de luz oscuridad 12/12, a temperatura ambiente y acceso a comida y agua *ad libitum*. Las ratonas preñadas fueron monitoreadas cada día para detectar el día de nacimiento de las crías, el cual se tomó como el día postnatal 0 (P0). Al segundo día postnatal, las crías fueron sexadas, separadas en grupos e inyectadas con solución salina (NaCl al 0.9%) o VPA (200 mg / Kg) por vía subcutánea. El peso de los neonatos se monitoreó diariamente a partir de P2 a las 11:00 am (\pm 30 min) y las pruebas conductuales se realizaron desde P5 a P9, a las 11:30 am (\pm 30 min).

Tasa de la ganancia de peso

El peso de los ratones se registró diariamente para estimar la ganancia de peso de los individuos de ambos grupos experimentales (control y VPA). Se realizó un análisis de regresión lineal simple para cada individuo desde P2 hasta P10, se promedió el valor de la pendiente y se obtuvo la desviación estándar para cada grupo experimental. El resultado de este análisis nos permitió estimar la tasa de la ganancia de peso.

Prueba de enderezamiento

La prueba de enderezamiento se realizó (de P5 hasta P9) con el objetivo de evitar la alteración en el desempeño de la prueba por efecto de la inyección de VPA, la cual causa aletargamiento en los animales. La prueba consistió en colocar a los ratones boca arriba (supino), sujetarlos de las cuatro extremidades hasta lograr una posición estable (la parte dorsal en completo contacto con la superficie) para finalmente, permitir a los animales recuperar la posición normal sobre sus cuatro patas. Se midió el tiempo (latencia) para enderezarse en una ventana de 60 segundos. Este procedimiento se repitió tres veces, con periodos

intermedios de 5 minutos de descanso entre ensayos, y el resultado de dichas repeticiones se promedió (DiDonato, 2011) (Figura 4).



Figura 4. Figura representativa de la prueba de reflejo de enderezamiento. En esta figura se muestra una secuencia temporal en la cual se puede observar como se coloca al animal sobre su espalda (**recuadro izquierdo**), como el animal comienza a desempeñar el reflejo de enderezamiento para recuperar su postura natural (**recuadro de en medio**) y cuando finalmente el animal, recupera su postura original con las cuatro patas apoyadas en la superficie (**recuadro derecho**)

Prueba de identificación del nido.

La prueba de reconocimiento del nido se realizó con el objetivo de evaluar el desempeño sensorio-motriz. La prueba consistió en colocar a la cría a la mitad de una caja rectangular de acrílico transparente de 32 x 18 cm, en un extremo de la caja se dispuso aserrín limpio, mientras que en el extremo contrario se dispuso aserrín del nido de la cría con excretas, papel del nido y una antigüedad de al menos dos días (Favre et al., 2013; Rouillet et al., 2010). La latencia de reconocimiento del nido de cada cría se registró en una ventana de tiempo de 5 minutos. La caja se limpió con alcohol, agua destilada y fue secada antes de repetir la prueba con otro individuo (Favre et al., 2013) (Figura 5).



Figura 5. Figura representativa de la prueba de identificación del nido. En esta figura se muestra una secuencia temporal en la cual se puede observar cómo se coloca al animal en el centro de la caja, con aserrín limpio y aserrín de su nido en los extremos de la caja (**recuadro izquierdo**), cuando el animal comienza a olfatear y a recorrer la caja en busca del aserrín del nido (**recuadro de en medio**) y cuando finalmente alcanza el aserrín de su nido y se detiene el cronómetro (**recuadro derecho**)

Preparación de rebanadas del hipocampo

Se utilizaron animales de 9 a 11 días postnatales tanto del grupo control como del grupo tratado con VPA. Los animales fueron decapitados y su cerebro fue aislado rápidamente en solución de fluido cerebro espinal artificial (ACSF, por sus siglas en inglés) oxigenado con carbógeno (95 % O₂, 5 % CO₂) y ajustado a pH fisiológico (7.4) a 4 °C. Se cortó la zona correspondiente a los bulbos olfatorios en la parte anterior y al cerebelo en la parte posterior, de esta última se fijó el cerebro a la cámara de soporte de un vibrotomo (LEICA VT-1000S) y se obtuvieron rebanadas coronales de 250 µm de espesor (4 en promedio) que contenían el GD. Las rebanadas fueron colectadas y mantenidas en ACSF en oxigenación por un período de 30- 40 minutos previos a la incubación con el indicador de calcio Fluo 4-AM (10 µM). La composición de la solución ACSF (en mM) fue: 134 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.25 K₂HPO₄, 20 glucosa.

Evaluación de la sulforodamina B como molécula reportera de las células GFAP⁺ en el GD

La sulforodamina B (SRB) se conoce como un marcador fluorescente que se incorpora preferencialmente a los astrocitos (Appaix et al. 2012; Hülssman et al., 2017), por lo que se utilizó como reportero de la astrogliá en los estudios de imagen de calcio en el GD. La SRB (100 mg/ Kg) se inyectó intraperitonealmente 4 horas antes del sacrificio de los ratones transgénicos GFAP-EGFP. Estos ratones expresan la proteína verde fluorescente (GFP) en función de la actividad del promotor de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) (Nolte et al., 2001). Se utilizaron dos protocolos para realizar dichas estimaciones. Las rebanadas coronales se obtuvieron de acuerdo al protocolo mencionado anteriormente. Para la visualización de la proteína GFP y la sulforodamina en rojo, utilizamos microscopía de fluorescencia utilizando los filtros correspondientes, donde se la muestra fue expuesta a una iluminación con longitud de onda de 488 nm para su excitación y para la visualización del canal verde, correspondiente a la señal de la proteína verde fluorescente (excitación: 488 nm; emisión: 507- 509 nm) y a 565 nm para la visualización del canal rojo, correspondiente a la señal de la SRB (excitación: 565 nm; emisión: 585 nm) y se tomaron las imágenes correspondientes en el mismo campo visual. El segundo protocolo fue para los estudios de imagen de calcio, se siguió el mismo procedimiento, pero con

ratones de la cepa CD1. Las rebanadas se incubaron con el indicador de calcio Fluo 4-AM (10 μ M) por 30-40 min a 37 °C. Posteriormente, las rebanadas se transfirieron a la cámara de registro para los estudios de imagen de calcio, se utilizó un microscopio vertical (Olympus BX51WI) acoplado a una cámara CCD (PCO.edge 4.2) y un sistema de iluminación en LEDs (X- CITE, Model XLED- 1). Las rebanadas se perfundieron permanentemente con ACSF oxigenado, a temperatura ambiente (20 – 22 °C) a una velocidad de 2 ml/min. La respuesta celular del GD a la administración extracelular de ATP (100 μ M) fue evaluada, para ello se capturó un video de 150 s. Las imágenes se capturaron a una frecuencia de 1 Hz y el ATP se suministró, 15 s posterior al inicio del video por 30 s. El análisis y procesamiento de imágenes y videos se realizó en el software ImageJ (Fiji) y el conteo celular fue realizado en el software CellProfiler (Broad Institute).

Estudios de Imagen de Calcio

Para el registro de la señal de calcio, se capturaron 300 imágenes con una frecuencia de captura de 1 Hz. El Fluo 4 -AM fue excitado a 488 nm y la emisión de la fluorescencia se registró a 518 nm. El video obtenido fue procesado en el software ImageJ (Fiji), se realizó la proyección en Z en escala temporal para detectar las regiones de interés (ROI por sus siglas en inglés) y evaluar su actividad mediante un código realizado en nuestro grupo de trabajo con el software Spyder (Phyton). Los cambios en la fluorescencia se determinaron mediante la fórmula $\Delta F / F_0$, en donde ΔF es el cambio de fluorescencia y F_0 es la fluorescencia basal (Tada, Takeuchi, Hashizume, Kitamura, Kano, 2014). Para la obtención del área bajo la curva se utilizó la siguiente formula:

$$diF = \int_{t^1}^{t^2} rFl dt$$

La cual nos indica que se realizó el cálculo del cambio de la intensidad de fluorescencia con respecto a la fluorescencia basal (F / F_0), medido como el radio de la intensidad de fluorescencia durante el tiempo de duración del experimento (Seifert et al., 2011).

Análisis de la extensión de la red funcional de las células gliales

Se colocó cada rebanada directamente en la cámara de registro sobre la plataforma del microscopio, se colocó una micropipeta de estimulación de borosilicato (~20 μm de diámetro en la punta, llenada con solución extracelular y con una resistencia de $1.2 \pm 0.2 \text{ M}\Omega$) sobre la rebanada, permitiendo un ligero contacto de ésta con la capa celular superficial. Posteriormente se evocó la onda de calcio mediante estimulación eléctrica de campo utilizando un estimulador (Digitimer Ltd, DS3) controlado y programado por el software PatchMaster a través de un amplificador (HEKA EPC 10). La estimulación consistió de 20 pulsos de 300 μA , en 2 s (10 Hz) de duración y se aplicó 15 s después de iniciar la captura del video. La respuesta a este estímulo se registró por los siguientes 135 s (post estímulo). La extensión de la red glial evocada por la estimulación se estimó midiendo la distancia desde el epicentro del estímulo hasta la célula más lejana que respondió con un cambio en su fluorescencia basal posterior a la despolarización evocada (Reyes-Haro et al., 2010). Además, con el objetivo de eliminar la actividad neuronal y conservar únicamente la respuesta glial, se realizó una serie experimental en presencia de lidocaína (1 mM). Brevemente, la lidocaína se adicionó al ACSF y las rebanadas fueron pre-incubadas por 10 min previo y durante todo el experimento. El video obtenido fue procesado en el software ImageJ (Fiji), se realizó la proyección en Z en escala temporal para detectar las regiones de interés (ROI por sus siglas en inglés) y evaluar su actividad mediante un script del software Spyder (Phyton). Los cambios en la fluorescencia fueron determinados mediante la fórmula $\Delta F / F_0$ antes mencionada.

Análisis estadístico

La normalidad de los datos se analizó mediante la prueba de Shapiro Wilkins, posteriormente se realizaron las pruebas de análisis de varianzas (ANOVA) de una y dos vías, U- Mann-Whitney (datos con distribución no normal y únicamente provenientes de dos grupos) o t-student (t-test) (datos con distribución normal, provenientes de dos grupos experimentales y $n > 30$). Los análisis se realizaron con el software OriginPro 8 (excepto los análisis de ANOVA de dos vías, los cuales fueron realizados en Prisma 6). Los datos pertenecientes a cada grupo experimental se presentan como la media \pm el error estándar de la media,

considerando los resultados como estadísticamente significativos a un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

La exposición postnatal temprana a VPA disminuye la ganancia de peso en los neonatos.

Se utilizaron 23 camadas con un promedio de 11 individuos, de los cuales el 44 % eran machos (rango de 3 a 9) y su peso se monitoreó diariamente desde P2 hasta P10. El peso corporal no cambió significativamente durante el tratamiento con VPA (P2-P4, Tabla 2) (Figura 6A). Sin embargo, el peso corporal disminuyó significativamente entre P5 a P10, posterior al tratamiento con VPA (Tabla 2) (Figura 6). Con base en estos resultados se estimó la tasa de ganancia de peso, la cual mostró una disminución significativa en el grupo VPA respecto al control (Control: 6.48 ± 0.14 g, n= 26 vs VPA: $5.61 \pm .17$ g, n= 26; Two- Way ANOVA $F_{(1, 956)} = 164.3$, $p < 0.001$ a P10) (Figura 6A, recuadro).

El VPA aumenta la latencia del reflejo de enderezamiento.

La prueba del reflejo de enderezamiento (P5 - P9) se realizó con el objetivo de evaluar la latencia de este reflejo motor en los grupos control y VPA (Di Donnato, 2011). Los resultados mostraron un incremento significativo durante los días P7 (169 ± 35 %; Control: 4.3 ± 0.6 s, n=21 vs VPA: 9.4 ± 1.5 s, n= 27; Mann-Whitney, U= 162, $p = .000253$) y P8 (73 ± 24.43 %; Control: 2.5 ± 0.36 s, n=20 vs VPA: $3.53 \pm .039$ s, n= 28; Mann-Whitney, U= 110.5, $p = .0081$) (Tabla 3) (Figura 6B).

La exposición postnatal a VPA no modifica la latencia de reconocimiento de nido.

La prueba de reconocimiento del nido se llevó a cabo en P8 con el objetivo de evaluar la capacidad sensoriomotora (Varman et al., 2018). Los resultados mostraron latencias similares tanto para el grupo control (64 ± 15 s, n= 31) como para el grupo VPA (51 ± 9 s, n= 27; $p = 0.6622$).

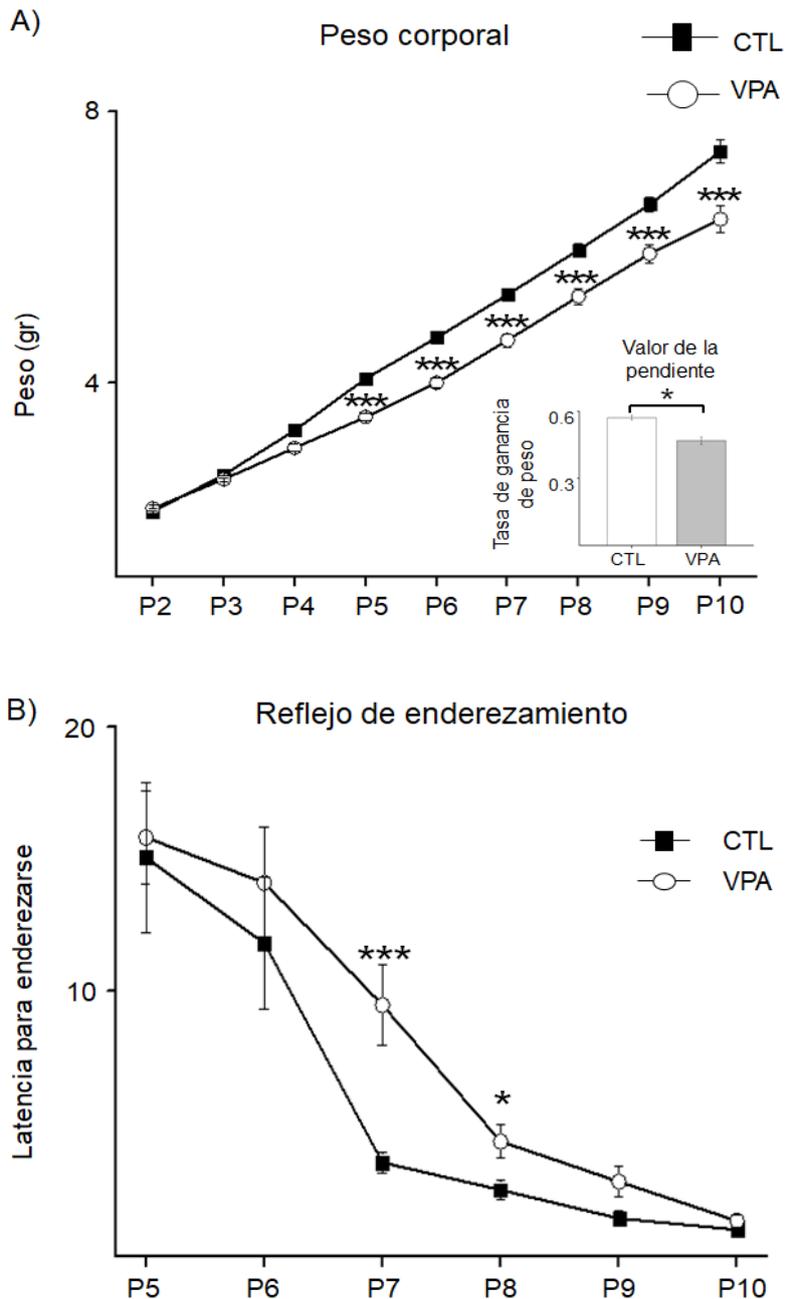


Figura 6. Tasa de ganancia de peso corporal y reflejo de enderezamiento. **A) Ganancia de peso corporal.** Curso temporal de la ganancia de peso de los ratones del grupo control y VPA. La línea del grupo control muestra una pendiente mayor comparada con el grupo VPA, con cambios significativos a partir de P5 hasta P10. La máxima diferencia se observa en P10 con un 13.5 % menos con respecto al control. La tasa de ganancia de peso corporal se determinó con base en la pendiente calculada por un análisis de regresión lineal. La pendiente del grupo VPA disminuyó significativamente respecto al control (control: 0.571 ± 0.010 vs VPA 0.469 ± 0.015 , $p=0.0000002$). **B) Reflejo de enderezamiento.** La latencia en el reflejo de enderezamiento, aumentó significativamente en el grupo VPA respecto al control en P7 y P8 (P7, Control: 4.33 ± 0.61 s, $n=21$ vs VPA: 9.48 ± 1.51 s, $n=27$ de 12 camadas; Mann-Whitney, $U=162$, $p=.000253$; P8, Control 2.5 ± 0.36 s, $n=20$; VPA: 4.33 ± 0.61 s, $n=28$ de 12 camadas; Mann-Whitney, $U=110.5$, $p=.0081$)

Día postnatal	Control peso (g)	VPA peso (g)	Valor P
2	1.840	1.881	.6765
3	2.313	2.256	.3267
4	2.884	2.661	.9545
5	3.554	3.058	1.2488 E-8
6	4.082	3.498	8.6590 E-9
7	4.635	4.047	1.0911 E-6
8	5.213	4.796	1.2046 E-6
9	5.796	5.163	2.5249 E-5
10	6.480	5.608	6.9759 E-4

Tabla 2. Peso promedio diario de los neonatos de ambos grupos experimentales. En esta tabla se muestra el valor promedio del peso diario de los animales de cada grupo experimental y el valor p de la comparación de ambas mediciones obtenida con la prueba Mann-Whitney

Día postnatal	Control latencia (s)	VPA latencia (s)	Valor P
5	15.04	15.81	.264
6	11.82	14.10	.9984
7	3.53	9.48	2.5311 E-4
8	2.5	4.33	0.00811
9	1.43	2.81	0.06953
10	1	1.33	.273

Tabla 3. Latencia de enderezamiento promedio de ambos grupos experimentales. En esta tabla se muestra la latencia de enderezamiento promedio en cada grupo experimental y el valor p de la comparación de las mediciones obtenido con la prueba Two-Way ANOVA

La Sulforodamina B co-localiza con 75% de las células GFAP+

La SRB es preferentemente incorporada por astrocitos (Appaix et al., 2012; Kafitz et al., 2007; Nimmerjahn, Kirchhoff, Kerr & Helmchen, 2004; Schnell et al., 2012; Verant, Serduc, Vial & Van der Sanden, 2008). Por ello se realizaron tres series experimentales. En la primera se investigó si la astrogliá incorporaba SRB en el GD del ratón transgénico GFAP-EGFP. Los resultados mostraron que el 75% \pm 8 % de las células GFAP-EGFP incorporaron SRB (n= 8 de N= 4) (Figura 7A). En la segunda serie experimental se determinó que el 64.5% \pm 12 % de las células que respondieron a la aplicación extracelular de ATP (100 μ M) (n= 7 de N= 7) (Figura 7B) correspondían a células SRB+, lo que sugiere que la respuesta evaluada es principalmente de naturaleza astrogliá. En la tercera serie

experimental se investigó sobre la identidad de las células reclutadas en la onda de calcio evocada por despolarización del GD. Los resultados mostraron que el $62.1\% \pm 5\%$ de las células reclutadas en la onda de calcio incorporaron SRB ($n=7$ de $N=7$) (Figura 7C). En conclusión 2/3 de las células que responden al ATP o son reclutadas en la onda de calcio corresponden a la astroglia.

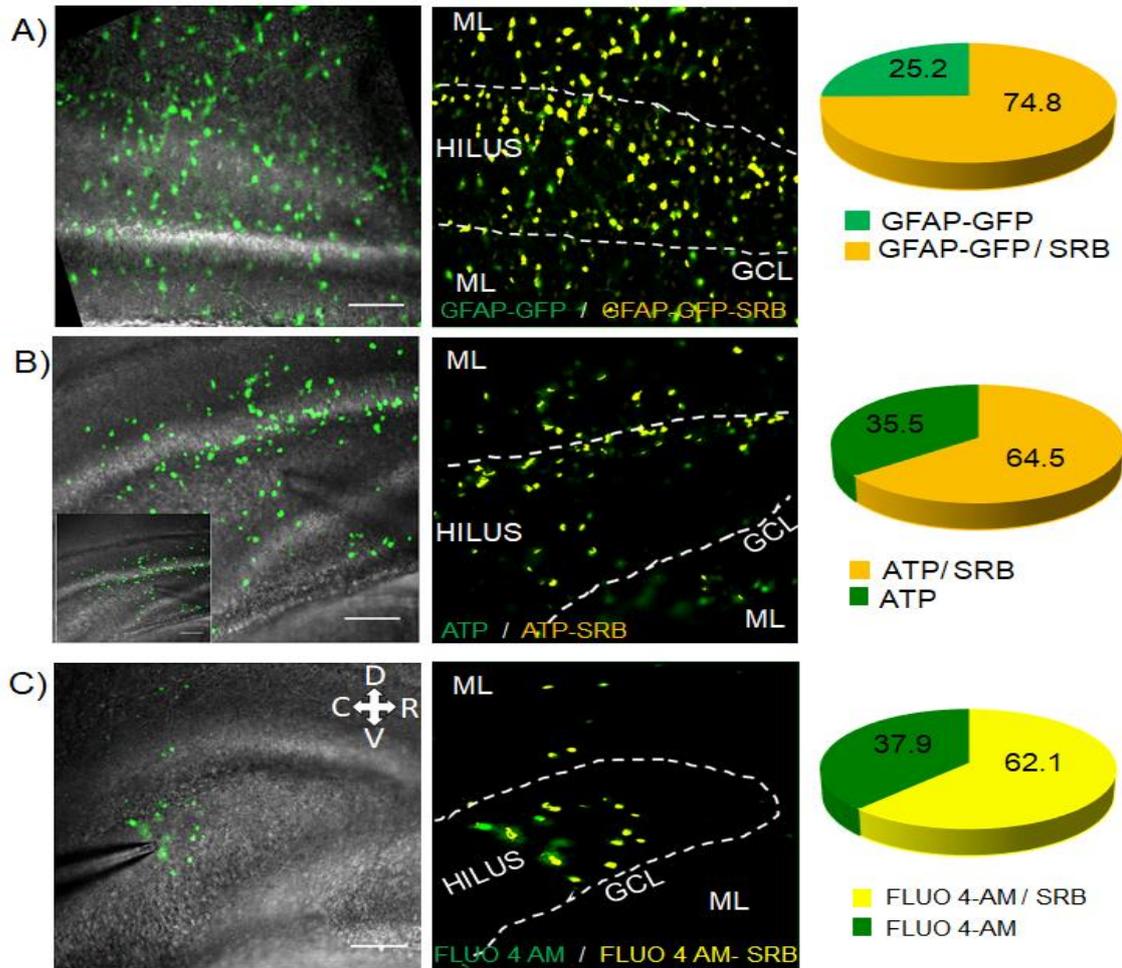


Figura 7. La SRB se incorpora preferentemente en células GFAP+ y más de la mitad de las células que responden al ATP, o que son reclutadas en la onda de calcio, son SRB+. A) Co localización de células GFAP+ y SRB+. A la izquierda se muestran las células GFAP+ en verde, mientras en el recuadro central se muestran las células GFAP+ que co-localizan con SRB (amarillo). La gráfica de pastel ilustra el porcentaje de células que co-localizan con ambos marcadores (74.8 %; $n=5$; $N=4$). B) Identificación funcional de las células SRB+, de izquierda a derecha se muestran en verde las células que respondieron a la activación por aplicación de ATP (100 μ M); en el recuadro central se muestran las células que respondieron a ATP y además incorporaron SRB, (amarillo). La gráfica de pastel muestra el porcentaje de células que responden al ATP e incorporaron SRB (64.5 %). C) Identificación de las células reclutadas en la onda de calcio evocada por despolarización. De izquierda a derecha: se muestra en verde las células reclutadas en la onda de calcio evocada por despolarización, enseguida se muestran estas mismas células y se revela la fracción que incorporó SRB (amarillo); la gráfica de pastel indica que el 62 % de las células reclutadas en la onda de calcio incorporaron SRB. Barras de calibración: 100 μ m. Las cuatro flechas sirven como referencia de la dirección anatómica de la estructura analizada siendo D: dorsal, V: ventral, R: rostral y C: caudal

La exposición postnatal a VPA no modifica la extensión funcional de la onda de calcio pero disminuye la excitabilidad glial.

La extensión funcional de la onda de calcio no presentó cambios significativos entre los grupos control ($214.66 \pm 39.97 \mu\text{m}$, $n=5$) y VPA ($211.25 \pm 36.38 \mu\text{m}$, $n=5$; $p=0.9025$) (Figura 8A, B). Adicionalmente, se investigó la participación del componente neuronal sobre la extensión de la onda de calcio, para ello se adicionó lidocaína (1 mM) al ACSF. Los resultados mostraron que la extensión de la onda de calcio no se modificó significativamente en presencia de lidocaína (Control + lidocaína: $211.06 \pm 31.83 \mu\text{m}$, $n=5$; $p=0.834$) (Figura 8B); lo mismo se observó en el grupo VPA (VPA + lidocaína: $165.63 \pm 17.25 \mu\text{m}$, $n=5$, $p=0.4034$) (Figura 8B). Por otra parte, la velocidad de propagación de la onda de calcio también fue similar entre ambos grupos experimentales (Control: $10.75 \pm 4.29 \mu\text{m/s}$, $n=5$; VPA: $11.80 \pm 2.32 \mu\text{m/s}$, $n=5$, $p=0.9291$), la lidocaína tampoco modificó la velocidad de propagación de la onda en ambos grupos experimentales (Control: $10.02 \pm 1.85 \mu\text{m/s}$, $n=5$; VPA: $9.49 \pm 2.02 \mu\text{m/s}$, $n=5$, $p=0.6049$) (Figura 8B).

Finalmente, con el objetivo de evaluar si la exposición a VPA puede alterar la excitabilidad de las células gliales, se calculó el número de células reclutadas y el área bajo la curva de las oscilaciones de calcio generadas por la estimulación eléctrica. Mientras que sin lidocaína no se observaron cambios entre ambos grupos experimentales, en presencia de lidocaína, se observó un aumento del número de células reclutadas en un radio de 0 a $50 \mu\text{m}$ (Control: 12 ± 2.09 células, $n=5$ vs VPA: 15.6 ± 4.3 , $n=5$ células; Mann-Whitney $U=0.5$; $p=0.0159$) (Figura 8D, inset) y en el área bajo la curva de los transitorios de calcio en un radio de 50 a $100 \mu\text{m}$ (Control: $827.29 \pm 104.47 \Delta F \cdot s$, $n=36$ vs VPA: $504.02 \pm 44.86 \Delta F \cdot s$, $n=43$; Mann-Whitney $U=981$; $p=0.042$) (Figura 8D).

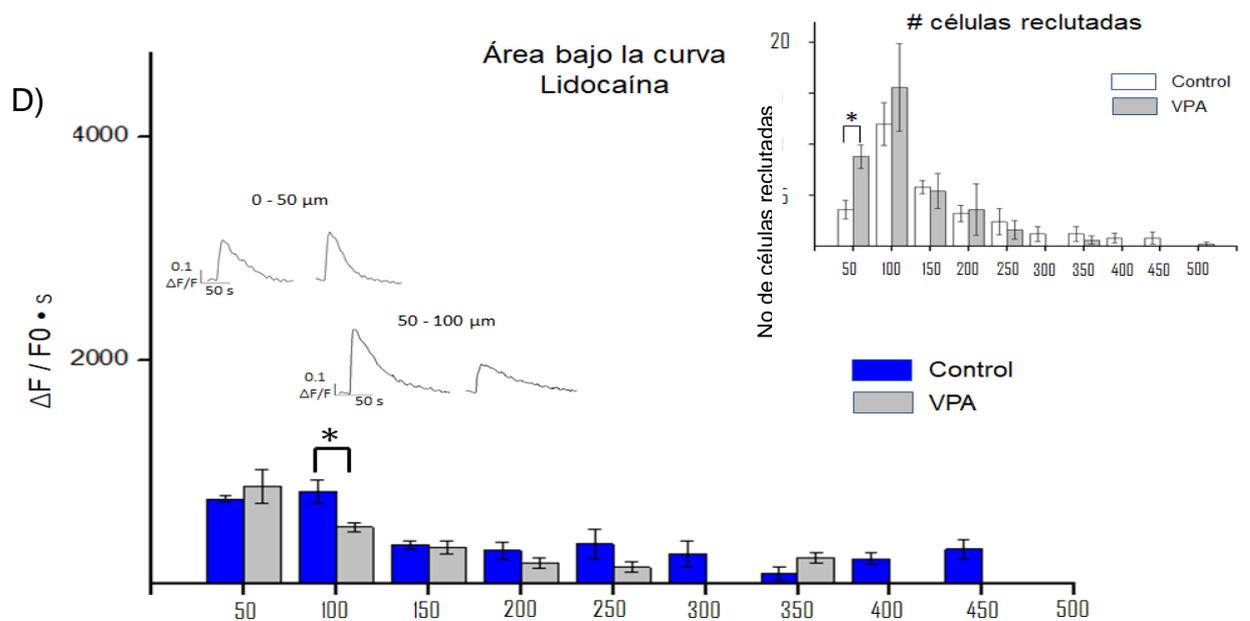
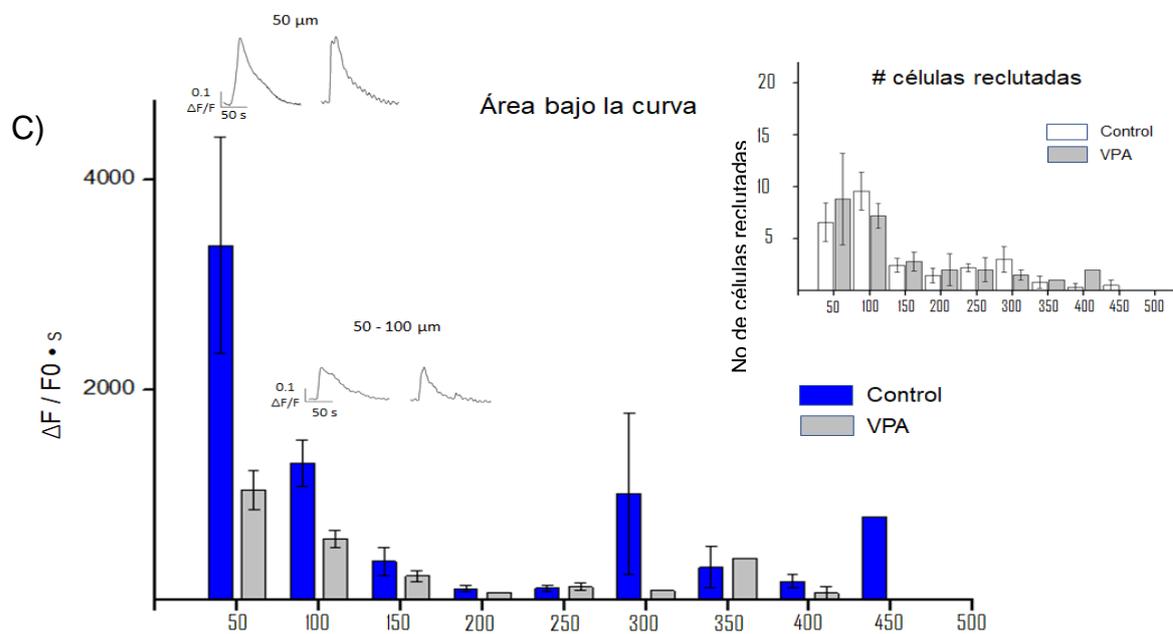
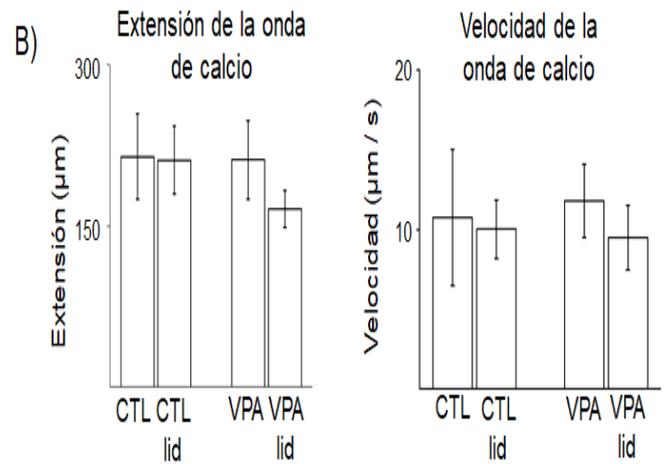
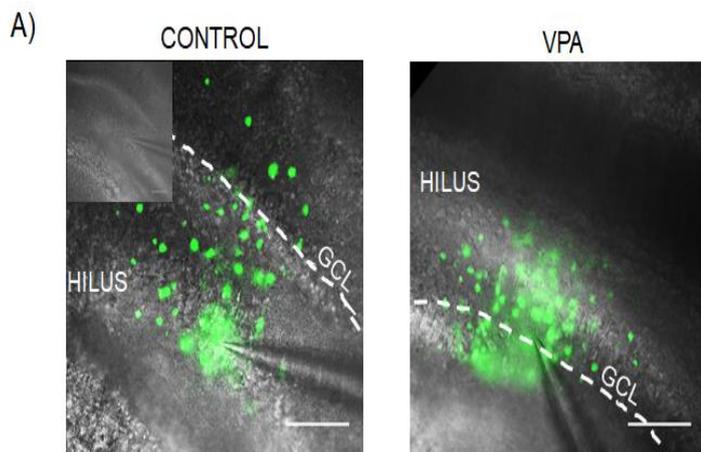


Figura 8. Efecto de la exposición postnatal al VPA sobre la onda de calcio evocada por despolarización. A) Imagen representativa que muestra la extensión promedio de la onda de calcio en los grupos control y VPA. B) Las gráficas muestran que ni la exposición al VPA, ni la lidocaína (1 mM) modifican la extensión de la onda de calcio (control n= 7; N= 5; VPA n= 5; N= 5; p=0.9025) ni su velocidad (control n= 7; N= 5; VPA n= 5; N= 5; p= 0.9291). C) No se observaron diferencias en el número de células reclutadas ni en el área bajo la curva de los transitorios de calcio evocados entre el grupo control y el grupo VPA, sin embargo, en presencia de lidocaína D) se observó un aumento en el número de células reclutadas en un radio de 0 a 50 μm , así como una reducción en el área bajo la curva de los transitorios de calcio en un radio de 50 a 100 μm en el grupo tratado con VPA (Control n= 36 vs VPA n= 43; Mann- Whitney U= 981; p = 0.042). Barra de calibración = 50 μm

La exposición al VPA reduce la frecuencia de las oscilaciones espontáneas de calcio en el giro dentado

La frecuencia promedio de las oscilaciones espontáneas de calcio se redujo 30% en el grupo VPA respecto al grupo control (Control: 0.0107 ± 0.00069 Hz, n= 7 vs VPA: 0.00739 ± 0.00093 Hz, n= 8; Mann- Whitney U=32, p = 0.0303) (Figura 9A-C). En esta misma serie experimental se utilizó lidocaína (1 mM) para eliminar la actividad neuronal y determinar su efecto sobre la frecuencia de las oscilaciones espontáneas de calcio. Los resultados mostraron que la frecuencia se redujo 37% en el grupo control + lidocaína (0.00673 ± 0.00128 Hz, n= 5; Mann- Whitney U= 27, p= 0.0353). En el grupo VPA, la adición de lidocaína también redujo significativamente la frecuencia de las oscilaciones de calcio (-32%; 0.00499 ± 0.00039 Hz, n= 7; Mann- Whitney U= 36, p= 0.0383). No obstante, no hay diferencias significativas entre los grupos control y VPA en presencia de lidocaína (p= 0.4167) (Figura 9A-C).

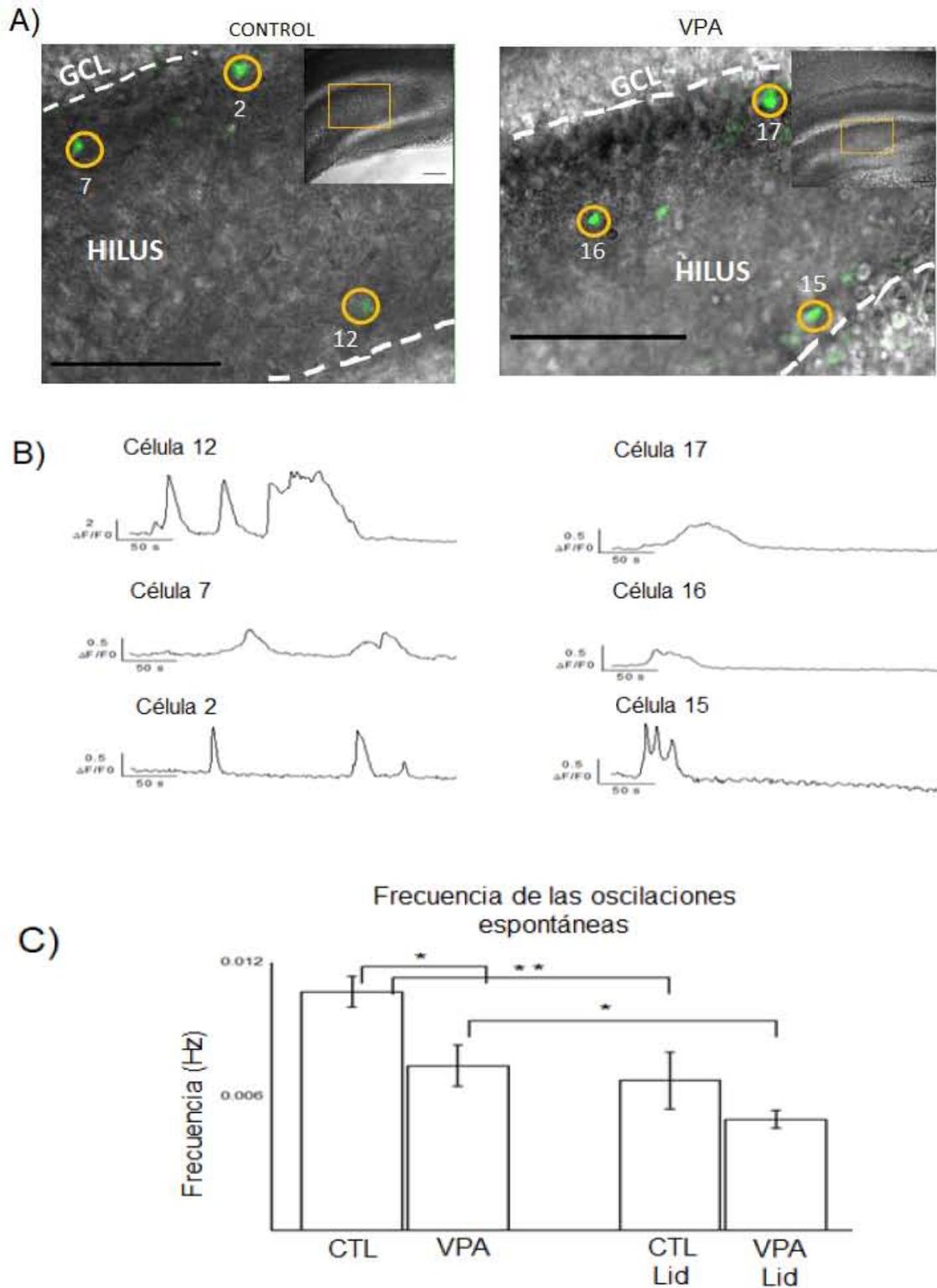


Figura 9. La frecuencia de los transitorios de calcio espontáneos se reduce en el grupo VPA. A) Imagen representativa de los transitorios de calcio espontáneos en los grupos control y VPA. Los recuadros muestran el giro dentado para cada grupo experimental. B) Trazos representativos que muestran el curso temporal de los transitorios de calcio en los grupos control y VPA. C) Frecuencia promedio de los grupos control ($n=7$, $N=7$) y VPA sin lidocaína ($n=8$, $N=8$; $p=0.0303$) y en presencia de lidocaína (1mM) (control: $n=6$, $N=6$; VPA: $n=7$, $N=7$; $p=0.4167$).

Los datos son el promedio \pm S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Barra de calibración: 50 μm ; inset: 100 μm

DISCUSIÓN

Ganancia de peso corporal, prueba de reflejo de enderezamiento y prueba de reconocimiento del nido

Diversos estudios en modelos murinos expuestos a VPA (pre o postnatalmente) reportaron que la ganancia de peso puede aumentar (Wagner et al., 2006), disminuir (Kazlauskas et al., 2016; Schneider & Przewlocki, 2005; Wagner et al., 2006) o no presentar cambios significativos en función de los períodos de exposición (Favre et al., 2013). La disminución en la ganancia de peso corporal observada en nuestro estudio es consistente con los resultados reportados previamente en condiciones de exposición al VPA prenatal o postnatal (Kazlauskas et al., 2016, Wagner et al., 2006 y Schneider & Przewlocki, 2005). La explicación es que la exposición a VPA podría promover la disminución de la ganancia de peso, como consecuencia del aletargamiento producido por la administración de este fármaco lo que limitaría la competencia por el alimento en los neonatos durante los días de exposición (P2- P4). Sin embargo, no se descarta algún mecanismo fisiológico desconocido que esté asociado a la exposición a VPA, para lo cual se requieren otro tipo de experimentos o mediciones tal como la medición de la actividad motriz de los neonatos o el efecto de los metabolitos del VPA sobre el metabolismo (Favre et al., 2013; Schneider & Przewlocki, 2005).

Por otra parte, el desarrollo de la actividad motriz es otra característica evaluada en los modelos murinos de autismo por exposición a VPA. En este sentido, la prueba del reflejo de enderezamiento nos permitió investigar sobre el desarrollo de este reflejo motor en los primeros días posteriores al nacimiento y su posible alteración por exposición a VPA. Nuestros resultados coinciden con una mayor latencia también observada en crías expuestas prenatalmente al VPA entre el día postnatal 4 y 8 (Wagner et al., 2006; Kazlauskas et al., 2016). Finalmente, no encontramos diferencias en la prueba de reconocimiento de nido por discriminación olfatoria, estos resultados son similares a lo encontrado por Favre et al., 2013, quien observó una tendencia al aumento en la latencia de

reconocimiento en los animales expuestos prenatalmente a VPA en comparación con los controles pero sin llegar a obtener significancia estadística, y al mismo tiempo, contrarios a lo encontrado por Schneider & Przewlocki, 2005, quienes observaron un aumento en la latencia de reconocimiento del nido (P9) en los animales expuestos prenatalmente a VPA, lo cual representa una diferencia en el modelo que puede explicar la obtención de diferentes resultados.

Los astrocitos participan y son parte fundamental de la onda de calcio.

Se sabe que la macroglía es el tipo celular más abundante en el SNC desempeñando funciones de mantenimiento homeostático, pero también con una participación importante en los procesos del desarrollo como migración, proliferación y diferenciación celular a través de su mecanismo de señalización de calcio. Por otra parte, los estudios de modelos animales de autismo inducido por exposición a VPA han reportado, entre otras cosas, la alteración en la cantidad (densidad), morfología y proliferación de las células gliales (Bronzouli et al., 2018; Lee et al., 2015; Kazlauskas et al., 2016; Verghese et al., 2017), no obstante, la evidencia experimental sobre su fisiología celular es limitada (Wang et al., 2012).

Para identificar la astrogliosis del GD se utilizó la SRB, la cual se ha propuesto como una molécula que marca específicamente a los astrocitos (Appaix et al., 2012; Kafitz et al., 2007; Nimmerjahn, Kirchhoff, Kerr & Helmchen, 2004; Schnell et al., 2013; Verant, Serduc, Vial & Van der Sanden, 2008). Los resultados mostraron que el 75 % de las células marcadas con SRB co-localizan con células GFAP-EGFP. La expresión de la proteína GFP en el ratón transgénico es exclusiva de los astrocitos al estar ligada al promotor de GFAP y no se expresa en oligodendrocitos ni en neuronas (Nolte et al., 2001). Sin embargo, también hay una fracción de células SRB+ que no co-localizan con los astrocitos, lo que sugiere una población celular adicional, que bien podría ser astrocitos con baja expresión de GFAP (Nolte et al., 2001; Catalani et al., 2002), precursores neuronales o bien otros tipos gliales como oligodendrocitos. Este último dato coincide con la evidencia de que la sulforodamina (B, 101, G), no es un marcador 100 % específico de astrocitos, sino que también puede ser incorporado por los oligodendrocitos (Hülsmann, Hagos, Heuer & Schnell, 2017). Esta idea es aún

controversial y las diferencias reportadas podrían ser producto de las diferentes condiciones experimentales, ya que mientras autores como Nimmerjhan & Helmchen, 2012; Appaix et al., 2012, Kafitz et al., 2007 y Verant, Serduc, Vial & Van der Sanden, 2008, reportan que sólo los astrocitos son capaces de incorporar la sulforodamina. Otros estudios proponen que los oligodendrocitos pueden incorporar el marcador a través de los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP), u obtener el marcaje por medio de las conexiones con los astrocitos, es decir, las gap junctions, siendo estos mismos los mecanismos empleados por los astrocitos para incorporar y difundir el marcador (Hagos & Hülsmann, 2016; Hill & Grutzendler, 2014; Schnell et al., 2015). Nuestra conclusión fue que la SRB es un marcador confiable de la astroglia en el GD, por lo que se utilizó como herramienta para investigar sobre la identidad de las células reclutadas en la onda de calcio evocada por despolarización. Se comprobó experimentalmente que al menos 2/3 de las células reclutadas eran SRB+, lo que indica que la onda de calcio recluta células gliales, principalmente de tipo astrogliar.

La exposición postnatal temprana a VPA modifica la excitabilidad glial en la onda de calcio evocada eléctricamente.

Diversos estudios reportaron que las células gliales y en específico los astrocitos, responden a la actividad neuronal y a la estimulación mecánica y eléctrica con incrementos de calcio intracelular que pueden propagarse a células vecinas produciendo una onda de calcio (Fuji, Meakawa & Morita, 2017; Weissman et al., 2004). La propagación de esta señal se ha propuesto que es mediada por dos mecanismos principales: la transmisión intracelular de la señal química mediante las uniones comunicantes de los astrocitos formadas por conexinas y a través de la liberación de señales químicas difusibles, en específico ATP (Bowser & Kahk, 2007; Charles, 1998; Guthrie et al., 1999; Haas et al., 2005; Hassinger et al., 1996; Weissman et al., 2004) y se ha observado que dichas respuestas gliales están correlacionadas con la sincronización de la actividad neuronal, la regulación del ciclo celular, la expresión de genes, la proliferación y la diferenciación celular (Pinto et al., 2016; Rabellato et al., 2013; Toth et al., 2016).

Weissman et al., (2004) reportó que la aparición de ondas de calcio espontáneas en la glía radial de la corteza en desarrollo estaba relacionada con la etapa de mayor proliferación neuronal (E16 - 17), que en ella participan las glías radiales en fase S del ciclo celular, que eran mediadas por la actividad de ATP sobre los receptores purinérgicos P2Y₁ y que la estimulación mecánica y eléctrica podía emular esta señalización de calcio. Finalmente, encontró que al bloquear los receptores purinérgicos y disminuir la extensión de la onda de calcio de las glías radiales en la etapa de mayor proliferación se disminuía la proliferación celular.

Nuestros resultados muestran que la exposición postnatal temprana a VPA no modifica la extensión ni la velocidad de propagación de la onda de calcio en el giro dentado, además, no se observaron diferencias en el número de células reclutadas por la onda de calcio entre ambos grupos experimentales ni en presencia de lidocaína, salvo en el grupo VPA con respecto al control en presencia de lidocaína en un radio de 50 micras con respecto al punto de estimulación, en donde se observó mayor número de células reclutadas en el grupo VPA. En este sentido, en la literatura no hay reportes que mencionen específicamente un cambio en el número de células reclutadas por la onda de calcio en diferentes condiciones experimentales y los reportes existentes mencionan la propagación intra y extracelular de la onda de calcio y cómo el bloqueo de estas formas de comunicación intercelular puede disminuir el número de células que participan en la onda de calcio (Fiacco & McCarthy, 2006; Schipke & Kettenmann, 2004; Weissman et al., 2004), un ejemplo de ello es el trabajo de Weissman et al., 2004, quien menciona que el bloqueo de la actividad purinérgica disminuye el número de células que participan en la onda de calcio al mismo nivel que en estados de desarrollo en donde la sensibilidad a ATP relacionada con la proliferación celular es menor. Sin embargo, un análisis más profundo de las señales de calcio evocadas por estimulación eléctrica muestra que la excitabilidad de los astrocitos, medida como el área bajo la curva de los eventos transitorios de calcio se encuentra parcialmente alterada en un radio de 100 μ m (desde el punto de estimulación), ya que el grupo VPA presentó una disminución del área bajo la curva promedio respecto al control. Los experimentos se realizaron durante el desarrollo temprano del GD (P9-P11). En esta etapa del desarrollo ocurre el rearrreglo de la matriz secundaria de células de la glía radial

generando neuronas granulares y precursores celulares que se establecerán en la zona subgranular (Berg et al., 2018; Brunne et al., 2010; Khalaf & Francis, 2013, Li & Pleasure, 2005; Namba et al., 2005), por lo que la disminución de la excitabilidad del transitorio de calcio promedio de las células reclutadas en la onda de calcio podría afectar la migración celular y la sinaptogénesis del GD tal como lo observado por Komuro y Kumada (2005), quienes reportaron la disminución de la migración celular en el cerebelo como consecuencia de la disminución de la actividad de calcio o de la misma manera, lo observado por Kanemaru y colaboradores en el 2007, quienes reportaron que el crecimiento del cono axónico y dendritas neuronales hipocámpales se veía disminuido por el contacto con astrocitos con actividad de calcio deficiente.

La exposición a VPA reduce la frecuencia de oscilaciones espontáneas del giro dentado

Las oscilaciones espontáneas de calcio en los astrocitos ocurren en distintas regiones del cerebro y parecen estar relacionadas con eventos de migración, diferenciación y proliferación celular durante el desarrollo (Kanemaru et al., 2007; Nett et al., 2002; Parri & Crunelli, 2002; Wang et al., 2006). Durante el desarrollo postnatal temprano del giro dentado ocurre la diferenciación y maduración de las células granulares, así como la gliogénesis. Por ello se investigó el efecto de la exposición postnatal temprana a VPA sobre la actividad oscilatoria espontánea en los astrocitos del giro dentado.

Encontramos que la frecuencia de oscilaciones espontáneas de las células del GD en condiciones control fue de $0.0107 \pm .00069$ Hz, este resultado es similar a lo observado en otros estudios en los que se investigó la actividad espontánea de los astrocitos del hipocampo, en específico de la región de CA1 en donde se han observado frecuencias de entre 0.0166 Hz a 0.0258 Hz (Srinivasan et al., 2015; Nakayama et al., 2016; Pasti et al., 1997; Nett et al., 2002; Zur Nieden & Daitmer, 2006) y una frecuencia de 0.0231 Hz en la capa molecular del GD (Shigetomi et al., 2018); la diferencia en éste último dato podría ser debido a la edad de los animales (6 – 9 semanas de edad) o a que el indicador de calcio utilizado para esos experimentos fue un indicador de calcio codificado genéticamente (GCaMP), lo cual podría favorecer la apreciación de los

transitorios de calcio más que la incubación del indicador fluorescente. Así mismo, observamos que esta frecuencia de oscilaciones espontáneas disminuía 31% en el grupo VPA con respecto al control. No obstante, la inhibición de la actividad neuronal con lidocaína eliminó este efecto, lo que sugiere que la frecuencia de las oscilaciones espontáneas de calcio tiene dos componentes: 1) uno que es independiente de la actividad neuronal, pues no se ve afectado por la exposición a lidocaína y 2) otro que es modulado por la actividad neuronal, mismo que está reducido en el grupo VPA

Tiang y colaboradores (2005), reportaron que la exposición a VPA y otros fármacos antiepilépticos *in vivo* afectaba directamente la capacidad de los astrocitos corticales de generar señales de calcio, esto porque al evocar actividad epiléptica con aplicación local de 4 AP, esta resultó insensible a TTX pero en presencia de VPA y otros antiepilépticos (gabapentina y fenitoína) se redujo la actividad de calcio y la amplitud y frecuencia de la actividad neuronal relacionada a ella; en contraste, los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales indican que la alteración observada en la actividad oscilatoria de calcio es producto, principalmente, de la afectación del VPA sobre la actividad neuronal, ya que si el VPA tuviera un efecto directo sobre la actividad glial la diferencia en la frecuencia de las oscilaciones espontáneas hubiera sido similar entre grupos experimentales en presencia de lidocaína.

Tales alteraciones podrían ser sobre las neuronas o las sinapsis excitadoras, como en el estudio de Rinaldi y cols. (2007), quienes observaron, entre otras cosas, la disminución en la excitabilidad de las células piramidales corticales como resultado de la exposición prenatal a VPA o bien, podrían ser resultado de la desregulación de las proteínas de sinapsis inhibitoras o incluso las mismas neuronas inhibitoras (Banerjee et al., 2013; Hou et al., 2018; Kumamaru, Egashira, Takenaka, Takamori, 2014; Wang et al., 2012). El VPA puede alterar la expresión de neuroliginas, proteínas de adhesión sináptica necesarias para el establecimiento de sinapsis excitadoras e inhibitoras, comprometiendo el balance excitador/inhibidor en el hipocampo y la corteza somatosensorial (Ito, Morishito, Nagata, 2017; Kolozsi et al., 2009). Esto, sin lugar a duda afectaría la frecuencia espontánea de los transitorios de calcio registrados en los astrocitos del GD. Además, la disminución en la frecuencia de los transitorios de calcio

registrada en el grupo VPA también podría estar relacionada con la expresión de N-Caderina, proteína de matriz extracelular relacionada con la sinaptogénesis (Kanemaru, et al., 2007).

CONCLUSIONES

1) La tasa de ganancia de peso es menor en el grupo VPA respecto al control. 2) La latencia del reflejo de enderezamiento es mayor en los animales tratados con VPA respecto al grupo control. 3) El 75% de las células GFAP+ incorpora SRB. 4) La frecuencia de las oscilaciones de calcio espontáneas se redujo significativamente (- 32%) respecto al grupo control, no obstante, este efecto desapareció en presencia de lidocaína. 5) La extensión de la onda de calcio no se modificó significativamente con lidocaína, ni tampoco se observaron diferencias entre los grupos control y VPA. 6) El número de células reclutadas no varía entre ambos grupos experimentales ni en presencia de lidocaína, salvo en el caso de VPA en presencia de lidocaína donde se registró un mayor número de células reclutadas por la onda de calcio a una distancia de 50 micras con respecto al punto de estimulación. 7) La excitabilidad de la astrogliá se reduce en las células reclutadas por la onda de calcio en un radio de 100 micras en el grupo VPA con respecto al control en presencia de lidocaína.

PERSPECTIVAS

Dado que uno de los principales hallazgos en los modelos murinos de exposición a VPA es la alteración del sistema gabaérgico en diversas áreas del cerebro (Banerjee et al., 2003; Hou et al., 2018; Kumamaru, Egashira, Takenaka, Takamori, 2014; Wang et al., 2012) y se ha encontrado que dicha alteración está relacionado con las conductas relacionadas con el trastorno del espectro autista, aunado a sus implicaciones en la migración celular y refinamiento sináptico en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso (Cellot & Cherubini, 2013; Doengi et al., 2009; Hollrigel, Ross & Soltezs, 1998; Kilb, Kirishuk & Luhmann, 2013; Lo Turco et al., 1995; Romo- Parra et al., 2008; Uhlen et al., 2015), queda como perspectiva el estudio farmacológico de la participación del sistema gabaérgico como posible blanco del VPA y el responsable de la alteración en la frecuencia de la actividad de calcio espontánea en los astrocitos

ANEXOS

Reducción de la dosis de VPA por alta mortandad

Con base en la bibliografía (Favre et al., 2013; Fujimura et al., 2017; Mony et al., 2016; Kazlauskas et al., 2016; Lee et al., 2016; Rouillet et al., 2013; Verghese et al., 2017; Wagner et al., 2006), las dosis utilizadas en los modelos de autismo inducido por exposición a VPA van desde los 200 hasta los 600 mg / Kg, siendo la más común para el modelo de exposición postnatal, 300 mg / Kg, por esta razón, esta dosis fue seleccionada para iniciar el estudio; esta dosis ha sido reportada como efectiva y poco letal en el estudio en ratas, sin embargo al aplicarla en nuestro modelo de ratón, observamos una alta mortandad de los neonatos, la cual alcanzó el 68.4 % (murieron 13 de un total de 19 animales, pertenecientes a 6 camadas) de los animales inyectados, es por esto que se probó disminuir la dosis a la mínima reportada en la literatura, 200 mg / Kg, obteniéndose una disminución en la mortandad de hasta el 12.3 % (murieron 9 de un total de 73 animales, pertenecientes a 23 camadas) y efectos sobre la ganancia de peso, latencia de enderezamiento similares, por lo que se optó por continuar el estudio bajo esta nueva condición.

Curva de calibración para evocar la onda de calcio en el GD

La amplitud de corriente adecuada para evocar una onda local en el giro dentado se determinó con una curva de calibración en la que se evaluaron 5 amplitudes de corriente (200, 300, 500, 750 y 1000 μ A) en rebanadas coronales de animales no tratados y sin aplicación de lidocaína (1 mM). Cada rebanada se estimuló eléctricamente una sola vez, colocando la micropipeta de estimulación en la capa celular polimórfica profunda y se midió la extensión de la onda de calcio evocada. Los resultados muestran un incremento en la extensión de la red en función de la intensidad de corriente de estimulación, por lo que se decidió utilizar 300 μ A de intensidad que produce un 54 % de la extensión de la red (300 μ A: 121 ± 49.35 μ m, n=5) (Figura 10).

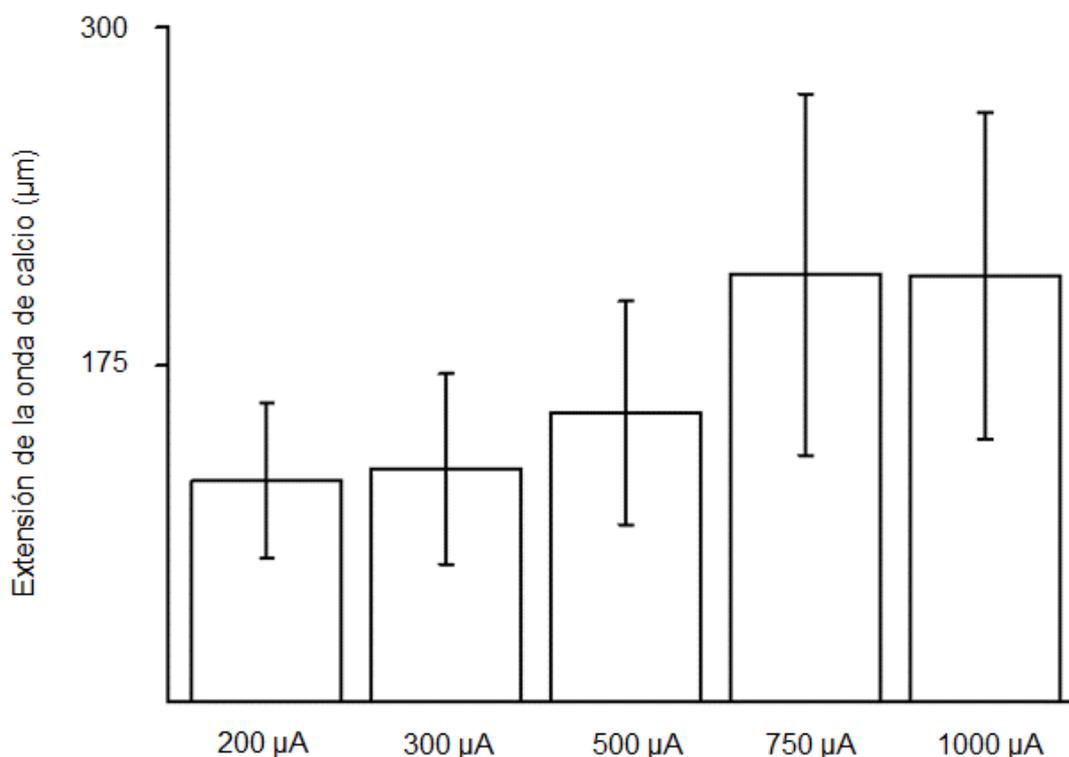


Figura 10. Estandarización de la amplitud de corriente para evocar la onda de calcio. Se probaron 5 amplitudes de corriente para evocar una onda de calcio local en el GD, observándose que las amplitudes de 200 y 300 µA evocaban una onda local (200 µA: 115 ± 40.26 µm; 300 µA: 121 ± 49.35 µm) y las amplitudes mayores evocaban una onda que superaba los límites de la capa celular polimórfica profunda (hilus) del giro dentado (500 µA: 150 ± 58.11 µm; 750 µA: 222 ± 93.83 µm ; 1000 µA: 221 ± 84.74 µm)

Peso del cerebro y relación peso corporal/ peso cerebral

Se obtuvo el peso del cerebro de los animales durante los tres días de experimentación (P9 - P11) con el propósito de evaluar si la exposición al fármaco puede alterar este parámetro corporal. No se observaron diferencias en el promedio del peso del cerebro entre ambos grupos ($p= 0.6539$) ni entre los tres días de medición dentro del mismo grupo (Control: P9 vs P10, P9 $n= 10$, P10 $n= 3$; $p=0.6492$, P10 vs P11, P10 $n= 3$, P11 $n= 4$, $p=0.5096$; VPA: P10 vs P11, P10 $n= 6$, P11 $n= 3$; $p= 0.3918$, One Way ANOVA), salvo el caso del día P9 en comparación con el día P10 en el grupo VPA (VPA: P9 vs P10, P9 $n=7$, P10 $n= 6$; $p= 0.0034$, One Way ANOVA). De igual manera, la relación peso corporal / peso cerebral no se modificó entre ambos grupos experimentales, al agrupar y promediar los tres días experimentales (Control: $5.86 \pm 0.17 \%$, $N= 17$; VPA: $6.15 \pm 0.19 \%$, $N=16$, $p= 0.3306$, Two Way ANOVA) (Figura 11).

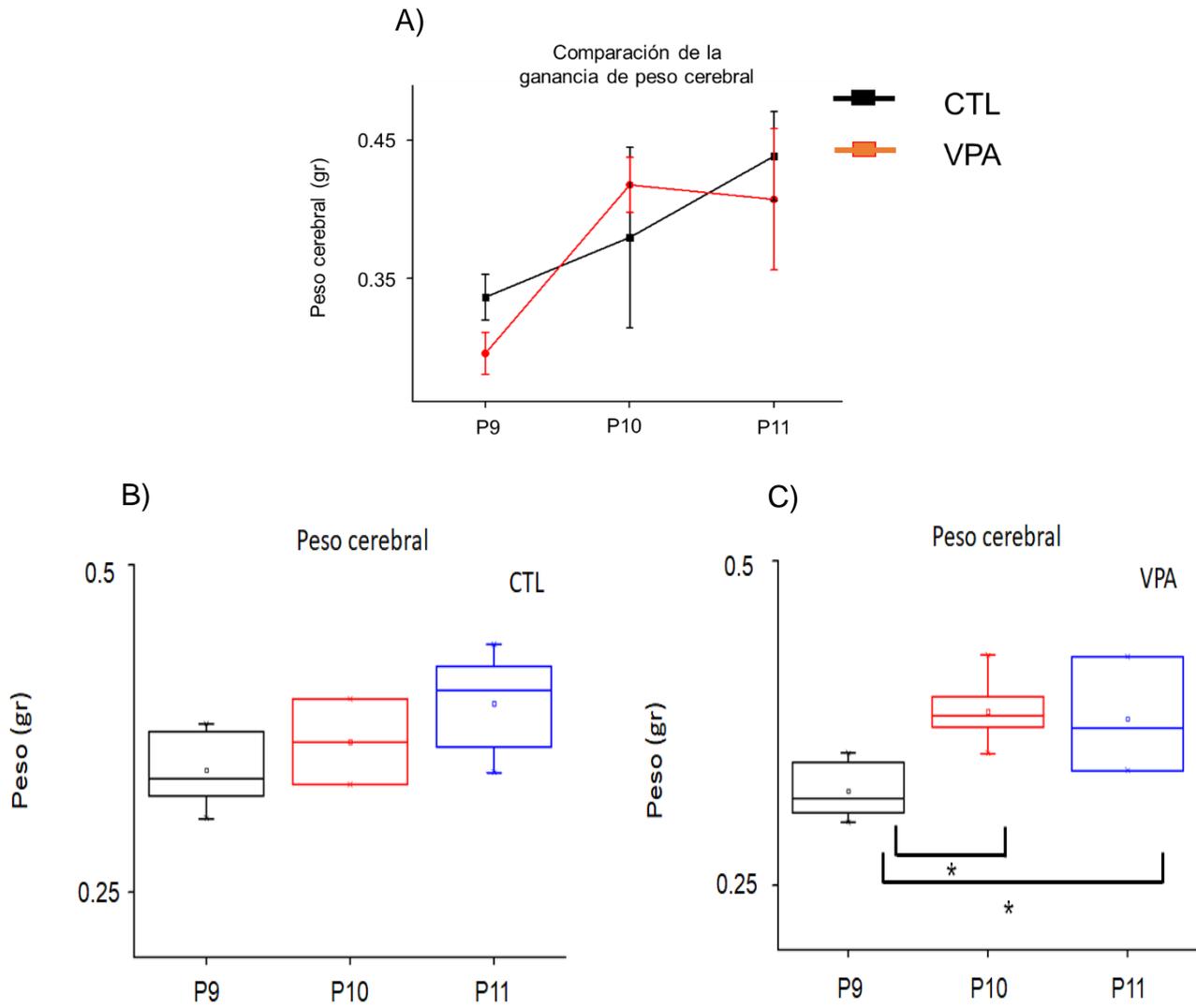


Figura 11. Peso cerebral en ambos grupos experimentales. A) Comparativa de la ganancia de peso cerebral. En esta figura se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en el peso cerebral de los animales control y VPA durante los tres días analizados. B) Como puede observarse en la figura, no se observaron cambios en el peso fresco cerebral en los días 9, 10 y 11 en los animales pertenecientes al grupo control. C) El peso fresco cerebral de los animales de 9 días postnatales fue menor en comparación con el peso del cerebro 10 y 11 días postnatales en los animales expuestos a VPA, pero no hubo diferencias entre los días 10 y 11

REFERENCIAS

- Accardi, M. V., Huang, H., & Authier, S. (2018). Seizure liability assessments using the hippocampal tissue slice: Comparison of non-clinical species. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 93(September), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2017.11.003>
- Achour, S. Ben, & Pascual, O. (2012). Astrocyte-neuron communication: Functional consequences. *Neurochemical Research*, 37(11), 2464–2473. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0807-0>
- Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., ... Goshen, I. (2018). Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell*, 174(1), 59-71.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.002>
- Appaix, F., Girod, S., Boisseau, S., Römer, J., Vial, J. C., Albrieux, M., ... van der Sanden, B. (2012). Specific in vivo staining of astrocytes in the whole brain after intravenous injection of sulforhodamine dyes. *PLoS ONE*, 7(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035169>
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri P, H. P. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neuroscience*, 22, 208–215.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H. R., Robitaille, R., & Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, 81(4), 728–739. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007>
- Banerjee, A., García-Oscos, F., Roychowdhury, S., Galindo, L. C., Hall, S., Kilgard, M. P., & Atzori, M. (2013). Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(6), 1309–1318. <https://doi.org/10.1017/S1461145712001216>
- Barry, G., Piper, M., Lindwall, C., Moldrich, R., Mason, S., Little, E., ... Richards, L. J. (2008). Specific Glial Populations Regulate Hippocampal Morphogenesis. *Journal of Neuroscience*, 28(47), 12328–12340. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4000-08.2008>

- Berg, D. A., Bond, A. M., Ming, G., & Song, H. (2018). Radial glial cells in the adult dentate gyrus: what are they and where do they come from? *F1000Research*, 7(0), 277. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12684.1>
- Brunne B., Zhao S., Derouiche A., Herz J., May P., Frotscher M.. (2010). Origin, Maturation and Astroglial Transformation of Secondary Radial Glia Cells in the Developing Dentate Gyrus. *Glia*, 58(13), 1553–1569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Bowser, D. N., & Khakh, B. S. (2007). Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *Journal of General Physiology*, 129(6), 485–491. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709780>
- Bronzuoli, M. R., Facchinetti, R., Ingrassia, D., Sarvadio, M., Schiavi, S., Steardo, L., ... Scuderi, C. (2018). Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. *Molecular Autism*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0254-0>
- Catalani, A., Sabbatini, M., Consoli, C., Cinque, C., Tomassoni, D., Azmitia, E., ... Amenta, F. (2002). Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(5), 481–490. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796133>
- Cellot, G., & Cherubini, E. (2013). Functional role of ambient GABA in refining neuronal circuits early in postnatal development. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(August), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00136>
- Charles, A. (1998). Intercellular calcium waves in glia. *Glia*, 24(1), 39–49. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199809\)24:1<39::AID-GLIA5>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199809)24:1<39::AID-GLIA5>3.0.CO;2-W)
- Covelo, A., & Araque, A. (2018). Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *ELife*, 7, 1–19. <https://doi.org/10.7554/elife.32237>
- Crawley, J. N. (2007). Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathology*, 17(4), 448–459. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00096.x>

- Dallérac, G., Chever, O., & Rouach, N. (2013). How do astrocytes shape synaptic transmission? Insights from electrophysiology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(October), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00159>
- Deshmukh, U., Adams, J., Macklin, E. A., Dhillon, R., McCarthy, K. D., Dworetzky, B., ... Holmes, L. B. (2016). Behavioral outcomes in children exposed prenatally to lamotrigine, valproate, or carbamazepine. *Neurotoxicology and Teratology*, 54, 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.01.001>
- Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N, Bhaukaurally K, Santello M, Bouvier D, Tiret P, Volterra A. 2011. Local Ca² detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nature Neuroscience*, 14(10): 1276- 1286
- Didonato, C., Bogdanik, L., Lutz, C., Sumner, C., & Burghes, A. (2011). *Behavioral Phenotyping for neonates: Righting reflex Working group members*. (Id), 1–6. Retrieved from http://www.treat-nmd.eu/downloads/file/sops/md/MD_M.2.2.002.pdf
- Doengi, M., Hirnet, D., Coulon, P., Pape, H.-C., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2009). GABA uptake-dependent Ca²⁺ signaling in developing olfactory bulb astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41), 17570–17575. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809513106>
- Drean, G., Leclerc, C., Duprat, A. M., & Moreau, M. (1995). Expression of L-type Ca²⁺ channel during early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *International Journal of Developmental Biology*, 39(6), 1027–1032
- Drew, L. J., Fusi, S., & Hen, R. (2013). Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: Why the dentate gyrus? *Learning and Memory*, 20(12), 710–729. <https://doi.org/10.1101/lm.026542.112>
- Edalatmanesh MA, Nikferjam H, Vafae F, Moghadas M. 2013. Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. *Brain Research*, 1526: 15- 25
- Ergaz, Z., Weinstein-Fudim, L., & Ornoy, A. (2016). Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology*, 64, 116–140. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.04.024>

- Favre, M. R., Barkat, T. R., LaMendola, D., Khazen, G., Markram, H., & Markram, K. (2013). General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00088>
- Freeman, M. R., & Rowitch, D. H. (2013). Evolving concepts of gliogenesis: A look way back and ahead to the next 25 years. *Neuron*, 80(3), 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.034>
- Fujii, Y., Maekawa, S., & Morita, M. (2017). Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13243-0>
- Fujimura, K., Mitsuhashi, T., & Takahashi, T. (2017). Adverse effects of prenatal and early postnatal exposure to antiepileptic drugs: Validation from clinical and basic researches. *Brain and Development*, 39(8), 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2017.03.026>
- Fukuchi, M., Nii, T., Ishimaru, N., Minamino, A., Hara, D., Takasaki, I., ... Tsuda, M. (2009). Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neuroscience Research*, 65(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.05.002>
- Guček, A., Vardjan, N., & Zorec, R. (2012). Exocytosis in astrocytes: Transmitter release and membrane signal regulation. *Neurochemical Research*, 37(11), 2351–2363. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0773-6>
- Guo-Feng Tian, Hooman Azmi, Takahiro Takano, Qiwu Xu, Weiguo Peng, Jane Lin, NancyAnn Oberheim, Nanhong Lou, Ron Zielke, Jiang Kang, M., & Nedergaard. (2015). Public Access NIH Public Access. *Nature Medicine*, 11(9), 973–981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Gurvich, N., Tsygankova, O. M., Meinkoth, J. L., & Klein, P. S. (2004). Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Research*, 64(3), 1079–1086. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871841>

- Guthrie, P. B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M. V. L., Charles, A. C., & Kater, S. B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *Journal of Neuroscience*, *19*(2), 520–528
- Haas, B., Schipke, C. G., Peters, O., Söhl, G., Willecke, K., & Kettenmann, H. (2006). Activity-dependent ATP-waves in the mouse neocortex are independent from astrocytic calcium waves. *Cerebral Cortex*, *16*(2), 237–246. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi101>
- Hagos, L., & Hülsmann, S. (2016). Unspecific labelling of oligodendrocytes by sulforhodamine 101 depends on astrocytic uptake via the thyroid hormone transporter OATP1C1 (SLCO1C1). *Neuroscience Letters*, *631*, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.08.010>
- Halassa, M. M., Fellin, T., & Haydon, P. G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, *13*(2), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.12.005>
- Haustein MD, Kracun S, Lu XH, Shih T, Jackson- Weaver O, Xu J, Yang XW, O’Dell TJ, Marvin JS, Ellisman MH, Bushong EA, Looger LL, Khakh BS. 2014. Conditions and constraints for astrocyte calcium signaling in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron*, *82*(2): 413- 429
- Haydon, P. G., Sanzgiri, R. P., Parpura, V., & Araque, A. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, *22*(5), 208–215. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10322493> http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10322493?ordinalpos=6&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum
- Hollrigel, G. S., Ross, S. T., & Soltesz, I. (1998). Temporal patterns and depolarizing actions of spontaneous GABAA receptor activation in granule cells of the early postnatal dentate gyrus. *Journal of Neurophysiology*, *80*(5), 2340–2351. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.5.2340>
- Hou, Q., Wang, Y., Li, Y., Chen, D., Yang, F., & Wang, S. (2018). A Developmental Study of Abnormal Behaviors and Altered GABAergic Signaling in the VPA-Treated Rat Model of Autism. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00182>

- Hülsmann, S., Hagos, L., Heuer, H., & Schnell, C. (2017). Limitations of Sulforhodamine 101 for Brain Imaging. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(February), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00044>
- Ito, H., Morishita, R., & Nagata, K. ichi. (2017). Autism spectrum disorder-associated genes and the development of dentate granule cells. *Medical Molecular Morphology*, 50(3), 123–129. <https://doi.org/10.1007/s00795-017-0161-z>
- Jan C. Schroeder, Dominik Reim, Tobias M. Boeckers, M. J. S. (2015). Genetic Animal Models for Autism Spectrum Disorder. *Current Topics in Behavioral Neuroscience*, 30(November 2015), 311–324. <https://doi.org/10.1007/7854>
- Kafitz, K. W., Meier, S. D., Stephan, J., & Rose, C. R. (2008). Developmental profile and properties of sulforhodamine 101-Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Methods*, 169(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.11.022>
- Kanemaru, K., Okubo, Y., Hirose, K., & Iino, M. (2007). Regulation of Neurite Growth by Spontaneous Ca²⁺ Oscillations in Astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 27(33), 8957–8966. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2276-07.2007>
- Kawanai, T., Ago, Y., Watanabe, R., Inoue, A., Taruta, A., Onaka, Y., ... Takuma, K. (2016). Prenatal Exposure to Histone Deacetylase Inhibitors Affects Gene Expression of Autism-Related Molecules and Delays Neuronal Maturation. *Neurochemical Research*, 41(10), 2574–2584. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1969-y>
- Kazlauskas, N., Campolongo, M., Lucchina, L., Zappala, C., & Depino, A. M. (2016). Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, 72, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.06.001>
- Khakh BS & Sofroniew MV. 2015. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci*, 18(7): 942- 952
- Khalaf-Nazzal, R., & Francis, F. (2013). Hippocampal development - Old and new findings. *Neuroscience*, 248, 225–242. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.061>

- Kilb, W., Kirischuk, S., & Luhmann, H. J. (2013). Role of tonic GABAergic currents during pre- and early postnatal rodent development. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00139>
- Kim, K. C., Choi, C. S., Kim, J. W., Han, S. H., Cheong, J. H., Ryu, J. H., & Shin, C. Y. (2016). MeCP2 Modulates Sex Differences in the Postsynaptic Development of the Valproate Animal Model of Autism. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 40–56. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8987-z>
- Kinjo T, Ito M, Seki T, Fukuhara T, Bolati K, Arai H, Suzuki T. 2019. Prenatal exposure to valproic acid is associated with altered neurocognitive function and neurogenesis in the dentate gyrus of male offspring rats. *Brain Research*, 1723: 146403
- Kolozsi, E., Mackenzie, R. N., Roulet, F. I., Decatanzaro, D., & Foster, J. A. (2009). Prenatal exposure to valproic acid leads to reduced expression of synaptic adhesion molecule neuroligin 3 in mice. *Neuroscience*, 163(4), 1201–1210. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.021>
- Komuro, H., & Kumada, T. (2005). Ca²⁺ transients control CNS neuronal migration. *Cell Calcium*, 37(5 SPEC. ISS.), 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.01.006>
- Kumamaru, E., Egashira, Y., Takenaka, R., & Takamori, S. (2014). Valproic acid selectively suppresses the formation of inhibitory synapses in cultured cortical neurons. *Neuroscience Letters*, 569, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.066>
- Leclerc, C., Webb, S. E., Daguzan, C., Moreau, M., & Miller, A. L. (2000). Imaging patterns of calcium transients during neural induction in *Xenopus laevis* embryos. *Journal of Cell Science*, 113 Pt 19, 3519–3529. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984442>
- Leclerc, C., Duprat, A. M., & Moreau, M. (1999). Noggin upregulates Fos expression by a calcium-mediated pathway in amphibian embryos. *Development Growth and Differentiation*, 41(2), 227–238. <https://doi.org/10.1046/j.1440-169X.1999.00421.x>
- Lee, H. J., Dreyfus, C., & DiCicco-Bloom, E. (2016). Valproic acid stimulates proliferation of glial precursors during cortical gliogenesis in developing rat. *Developmental Neurobiology*, 76(7), 780–798. <https://doi.org/10.1002/dneu.22359>

- Li, G., & Pleasure, S. J. (2005). Morphogenesis of the dentate gyrus: What we are learning from mouse mutants. *Developmental Neuroscience*, 27(2–4), 93–99. <https://doi.org/10.1159/000085980>
- Lloyd, K. A. (2013). A scientific review: Mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience Horizons*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzt003>
- López-hernández, E., Bravo, J., & Solís, H. (n.d.). Epilepsia y antiepilépticos de primera y segunda Aspectos básicos útiles en la práctica clínica. *Educación Médica*.
- Löscher, W. (1999). Valproate: A reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Progress in Neurobiology*, 58(1), 31–59. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00075-6)
- LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J. S., Davis, M. B. E., & Kriegstein, A. R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*, 15(6), 1287–1298. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90008-X)
- Mony, T. J., Lee, J. W., Dreyfus, C., DiCicco-Bloom, E., & Lee, H. J. (2016). Valproic acid exposure during early postnatal gliogenesis leads to autistic-like behaviors in rats. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 14(4), 338–344. <https://doi.org/10.9758/cpn.2016.14.4.338>
- Namba, T., Mochizuki, H., Onodera, M., Mizuno, Y., Namiki, H., & Seki, T. (2005). The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 22(8), 1928–1941. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04396.x>
- Navarrete, M., Perea, G., Maglio, L., Pastor, J., García De Sola, R., & Araque, A. (2013). Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue. *Cerebral Cortex*, 23(5), 1240–1246. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs122>
- Nett, W. J., Oloff, S. H., & McCarthy, K. D. (2017). Hippocampal Astrocytes In Situ Exhibit Calcium Oscillations That Occur Independent of Neuronal Activity. *Journal of Neurophysiology*, 87(1), 528–537. <https://doi.org/10.1152/jn.00268.2001>

- Newman, E. A. (2003). New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission. *Trends in Neurosciences*, 26(10), 536–542. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00237-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00237-6)
- Nicola, Z., Fabel, K., & Kempermann, G. (2015). Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00053>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N. D., & Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature Methods*, 1(1), 31–37. <https://doi.org/10.1038/nmeth706>
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U. K., ... Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia*, 33(1), 72–86. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(20010101\)33:1<72::AID-GLIA1007>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1098-1136(20010101)33:1<72::AID-GLIA1007>3.0.CO;2-A)
- Oliet, S. H. R., Piet, R., Poulain, D. A., & Theodosis, D. T. (2004). Glial modulation of synaptic transmission: Insights from the supraoptic nucleus of the hypothalamus. *Glia*, 47(3), 258–267. <https://doi.org/10.1002/glia.20032>
- Ota, Y., Zanetti, A. T., & Hallock, R. M. (2013). The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plasticity*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/185463>
- Pannasch, U., Vargova, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., ... Rouach, N. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20), 8467–8472. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016650108>
- Parri, H. R., Gould, T. M., & Crunelli, V. (2001). Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations. *Nature Neuroscience*, 4, 803–812.
- Parri, H. R., & Crunelli, V. (2002). Astrocytes, spontaneity, and the developing thalamus. *Journal of Physiology Paris*, 96(3–4), 221–230. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(02\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(02)00009-8)

- Perea, G., & Araque, A. (2005). Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium*, 38(3-4 SPEC. ISS.), 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.015>
- Perea, G., Sur, M., & Araque, A. (2014). Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00378>
- Pinto, M. C. X., Tonelli, F. M. P., Vieira, A. L. G., Kihara, A. H., Ulrich, H., & Resende, R. R. (2016). Studying complex system: Calcium oscillations as attractor of cell differentiation. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 8(2), 130–148. <https://doi.org/10.1039/c5ib00285k>
- Rebellato, P. (2013). *CALCIUM SIGNALING IN NEUROGENESIS : REGULATION OF PROLIFERATION , DIFFERENTIATION AND MIGRATION OF NEURAL STEM CELLS* (Karolinska Institutet). Retrieved from file:///C:/Users/allancarbal/Documents/Clark/references/thesis/Rebollato. 2013. Ca signaling in neurogenesis.pdf
- Reyes-Haro, D., Müller, J., Boresch, M., Pivneva, T., Benedetti, B., Scheller, A., ... Kettenmann, H. (2010). Neuron–astrocyte interactions in the medial nucleus of the trapezoid body. *The Journal of General Physiology*, 135(6), 583–594. <https://doi.org/10.1085/jgp.200910354>
- Rinaldi, T., Silberberg, G., & Markram, H. (2008). Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid. *Cerebral Cortex*, 18(4), 763–770. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm117>
- Robert A., Hill, J. G. (2016). In vivo imaging of oligodendrocytes with sulforhodamine 101. *Nature Methods*, 11(11). <https://doi.org/10.1002/cncr.27633>. Percutaneous
- Robert, V., Cassim, S., Chevaleyre, V., & Piskorowski, R. A. (2018). Hippocampal area CA2: properties and contribution to hippocampal function. *Cell and Tissue Research*, 373(3), 525–540. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2769-7>
- Romo-Parra, H., Treviño, M., Heinemann, U., & Gutiérrez, R. (2008). GABA actions in hippocampal area CA3 during postnatal development: differential shift from depolarizing to hyperpolarizing in somatic and dendritic compartments. *Journal of Neurophysiology*, 99(3), 1523–1534. <https://doi.org/10.1152/jn.01074.2007>

- Roulet, F. I., Lai, J. K. Y., & Foster, J. A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism - A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and Teratology*, 36, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.004>
- Samuel W. Hulbert, Y. J. (2016). Monogenic Mouse Models of Autism Spectrum Disorders: Common Mechanisms and Missing Links. *Neuroscience*, 321(Mayo), 3–23. <https://doi.org/10.1007/s11065-015-9294-9>.Functional
- Schindelin, J., Arganda-carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Pietzsch, T., Preibisch, S., ... Cardona, A. (2012). Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.Fiji
- Schipke, C. G., & Kettenmann, H. (2004). Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia*, 47(3), 226–232. <https://doi.org/10.1002/glia.20029>
- Schneider, T., & Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
- Schnell Christian, Hagos Yohannes, H. S. (2012). Active Sulforhodamine 101 Uptake into Hippocampal Astrocytes. *PLoS ONE*, 7(11), 1–13. <https://doi.org/10.1371/Citation>
- Schnell, C., Shahmoradi, A., Wichert, S. P., Mayerl, S., Hagos, Y., Heuer, H., ... Hülsmann, S. (2013). The multispecific thyroid hormone transporter OATP1C1 mediates cell-specific sulforhodamine 101-labeling of hippocampal astrocytes. *Brain Structure and Function*, 220(1), 193–203. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0645-0>
- Seifert, S., Pannell, M., Uckert, W., Färber, K., & Kettenmann, H. (2011). Transmitter- and hormone-activated Ca²⁺ responses in adult microglia/brain macrophages in situ recorded after viral transduction of a recombinant Ca²⁺ sensor. *Cell Calcium*, 49(6), 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.03.005>
- Shiguetomi E, Hirayama YJ, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S. 2018. Role of purinergic Receptor P2Y1 in spatiotemporal CA²⁺ dynamics in astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 38(6): 1383- 1395

- Skupin, A., Kettenmann, H., Winkler, U., Wartenberg, M., Sauer, H., Tovey, S. C., ... Falcke, M. (2008). How does intracellular Ca²⁺ oscillate: By chance or by the clock? *Biophysical Journal*, *94*(6), 2404–2411. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.119495>
- Stipursky, J., Romão, L., Tortelli, V., Neto, V. M., & Gomes, F. C. A. (2011). Neuron-glia signaling: Implications for astrocyte differentiation and synapse formation. *Life Sciences*, *89*(15–16), 524–531. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.04.005>
- T.D. Hassinger, P.B. Guthrie, P.B. Atkinson, M.V.L. Bennet, S. B. K. (1996). An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(November), 13268–13273.
- Tada, M., Takeuchi, A., Hashizume, M., Kitamura, K., & Kano, M. (2014). A highly sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging of neural activity in vitro and in vivo. *European Journal of Neuroscience*, *39*(11), 1720–1728. <https://doi.org/10.1111/ejn.12476>
- Theodosis, D. T., Poulain, D. A., & Oliet, S. H. R. (2008). Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Astrocyte-Neuron Interactions. *Physiological Reviews*, *88*(3), 983–1008. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2007>
- Todd A. Fiacco, K. D. M. (2006). Astrocyte Calcium Elevations: Properties, Propagation, and Effects on Brain Signaling. *Glia*, *54*(1), 676–690. <https://doi.org/10.1002/glia>
- Toth, A. B., Shum, A. K., & Prakriya, M. (2016). Regulation of neurogenesis by calcium signaling. *Cell Calcium*, *59*(2–3), 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.02.011>
- Uhlén, P., Fritz, N., Smedler, E., Malmersjö, S., & Kanatani, S. (2015). Calcium signaling in neocortical development. *Developmental Neurobiology*, *75*(4), 360–368. <https://doi.org/10.1002/dneu.22273>
- Varghese, M., Keshav, N., Jacot-Descombes, S., Warda, T., Wicinski, B., Dickstein, D. L., ... Hof, P. R. (2017). Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathologica*, *134*(4), 537–566. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1736-4>

- Varman, D. R., Soria-Ortíz, M. B., Martínez-Torres, A., & Reyes-Haro, D. (2018). GABA ρ 3 expression in lobule X of the cerebellum is reduced in the valproate model of autism. *Neuroscience Letters*, 687(July), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.09.042>
- Vérant, P., Ricard, C., Serduc, R., Vial, J.-C., & van der Sanden, B. (2008). In vivo staining of neocortical astrocytes via the cerebral microcirculation using sulforhodamine B. *Journal of Biomedical Optics*, 13(6), 064028. <https://doi.org/10.1117/1.3041163>
- Verkhatsky, A. (2006). Calcium ions and integration in neural circuits. *Acta Physiologica*, 187(3), 357–369. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2006.01566.x>
- Verkhatsky, A., Orkand, R. K., & Kettenmann, H. (1998). Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiological Reviews*, 78(1), 99–141. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.99>
- Verkhatsky, A., Rodríguez, J. J., & Parpura, V. (2012). Calcium signalling in astroglia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 353(1–2), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.039>
- Wagner, G. C., Reuhl, K. R., Cheh, M., McRae, P., & Halladay, A. K. (2006). A new neurobehavioral model of autism in mice: Pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 36(6), 779–793. <https://doi.org/10.1007/s10803-006-0117-y>
- Wang, C. C., Chen, P. S., Hsu, C. W., Wu, S. J., Lin, C. T., & Gean, P. W. (2012). Valproic acid mediates the synaptic excitatory/inhibitory balance through astrocytes - A preliminary study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 37(1), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.01.017>
- Wang, L. P., Kempermann, G., & Kettenmann, H. (2005). A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 29(2), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.02.002>
- Wang, T. F., Zhou, C., Tang, A. H., Wang, S. Q., & Chai, Z. (2006). Cellular mechanism for spontaneous calcium oscillations in astrocytes. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(7), 861–868. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00397.x>

Watanabe Y, Murakami T, Kawashima M, Hasegawa-Baba Y, Mizukami S, Imatanaka N, Akahori Y, Yoshida T, Shibutani M. 2016. Maternal exposure to valproic acid primarily targets interneurons followed by late effects on neurogenesis in the hippocampal Dentate Gyrus in rat offspring. *Neurotox Res*, 31:46-62

Watson, P. & P. (2012). *The mouse nervous system*.

Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C., & Kriegstein, A. R. (2004). Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, 43(5), 647–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.015>

Xu, L., Tang, X., Wang, Y., Xu, H., & Fan, X. (2014). Radial Glia, the Keystone of the Development of the Hippocampal Dentate Gyrus. *Molecular Neurobiology*, 51(1), 131–141. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8692-y>

Zorec, R., Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Verkhratsky, A., & Parpura, V. (2012). Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro*, 4(2), 103–119. <https://doi.org/10.1042/AN20110061>