



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFEECTO DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL DEL VALPROATO SOBRE LA
ACTIVIDAD GLIAL DEL CUERPO CALLOSO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

IBT. ÓSCAR SAÚL MORALES TAFOYA

TUTOR PRINCIPAL

DR. DANIEL REYES HARO (INB)

COMITÉ TUTOR

DRA. VERÓNICA MIREYA RODRÍGUEZ CÓRDOVA (INB)

DR. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS (INB)

JURIQUILLA, QUERÉTARO

MARZO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Daniel Reyes-Haro. Óscar Saúl Morales Tafuya recibió una beca CONACyT para sus estudios de maestría No. 521406. El proyecto fue financiado a través del programa PAPIIT-UNAM No. IN205718

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Óscar Saúl Morales Tafoya, cuyo título es: "Efecto de la exposición postnatal del valproato sobre la actividad glial del cuerpo calloso" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. María Magdalena Giordano Noyola

Secretario (Tutor)

Dr. Daniel Reyes Haro

Vocal

Dr. Lenin David Ochoa de la Paz

Suplente

Dra. Edith Arnold Hernández

Suplente

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

DEDICATORIAS

Para Martha Patricia, mi madre. Porque todo lo que soy y en todo lo que hago estás tú. Mis logros también son tuyos. Nunca olvides cuánto te amo.

Para don Jesús y doña Cuca. Los más increíbles abuelos, padres, y héroes. Sus bendiciones y enseñanzas me acompañan todos los días. Los quiero siempre.

“Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro”.

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

AGRADECIMIENTOS

Extiendo mi agradecimiento a la UNAM, por el apoyo recibido a través del financiamiento PAPIIT-UNAM (IN205718), el cual permitió la realización de este proyecto. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), que sin la beca recibida (521406) hubiera hecho muy difícil mi permanencia y egreso en mi programa de posgrado.

Al Instituto de Neurobiología (INB), por incluirme calurosamente, y por incentivar mi curiosidad científica mediante todos los trabajos de investigación que se realizan; por abrirme sus puertas y formarme durante estos dos años como Maestro en Ciencias.

Al Dr. Daniel Reyes-Haro, por su dirección, compromiso y tutoría para este trabajo; por su apoyo y su paciencia. A la Dra. Verónica Mireya Rodríguez-Córdoba y al Dr. Francisco Gabriel Vázquez-Cuevas, por los consejos y retroalimentaciones que derivaron en la versión final de este trabajo.

Al Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular (D-15), porque en él encontré un espacio de aprendizaje y desarrollo personal y profesional. Al Dr. Ataulfo Martínez-Torres, la M. en C. Ángeles Edith Espino-Saldaña y la Sra. Marina Ramírez Romero por el apoyo técnico y académico recibido.

Al Bioterio del INB, dirigido por la Dra. Alejandra Castilla-León y el MVZ. Martín García-Servín, por su ayuda, disposición y cuidado para con los animales, parte medular de este proyecto.

A la Dra. Maricela Luna-Muñoz, la Dra. Nuri Aranda-López y la Dra. Leonor Casanova-Rico, por el enorme apoyo administrativo desde el inicio de este programa de posgrado, siempre resolviendo mis constantes dudas. A mis profesores, que durante el transcurso del posgrado, con su dedicación y su pasión por la investigación me hicieron descubrir la infinita cantidad de posibilidades de las neurociencias para estudiar, y que el ingrediente principal para la ciencia es la curiosidad.

A mis amigos de antaño: Mayra, Jonathan, Daniela, Cape, América, César,

Carolina, Linda, Carla, Ricardo. Por echarme porras desde lejos, por escucharme siempre y por apoyarme de tantas formas; que las risas, las anécdotas y las cervezas nos acompañen siempre. Los quiero mucho. (Sí, ahora sí ya terminé).

A los compañeros del laboratorio: Bere, Cynthia, Lety, Freya, Gaby, Emmanuel, Marlene, Bhavya, por sus conocimientos, su ayuda, su enorme paciencia para conmigo, por compartir las comidas, los pagos de piso, las risas y los seminarios. A Marianne, Karina, Guillermo y Armando, los amigos que logré durante este tiempo dentro y fuera del posgrado; por todas las aventuras, las charlas y las carcajadas, estoy seguro que habrá más de donde vinieron.

¡Y faltan mis ratitas! Que sin ellas todos los resultados de esta tesis no hubieran sido posibles. Sus vidas tendrán un buen propósito.

Y creo que es todo por ahora. ¡Hasta la tesis del doctorado!

Óscar.

RESUMEN

El cuerpo calloso (CC) es una comisura interhemisférica única en los mamíferos placentarios. La composición del CC incluye a las células gliales, que representan más del 99% de los somas celulares, y a los axones corticales de proyección interhemisférica.

Las alteraciones morfológicas del CC se asocian a trastornos del neurodesarrollo como el del espectro autista (TEA). El riesgo de desarrollar TEA se incrementa por la exposición a fármacos como el valproato (VPA) durante el embarazo o los primeros meses de vida del neonato. Sin embargo se desconoce si la fisiología celular del CC se altera en respuesta al VPA. Al respecto, la despolarización de las membranas celulares del CC produce transientes de calcio en las células gliales que se propagan a células vecinas originando la respuesta conocida como onda de calcio. Este paradigma experimental revela la extensión funcional de la red glial. El objetivo del presente estudio fue evaluar la exposición postnatal temprana a VPA sobre la extensión funcional de las redes gliales en el CC. El VPA (300 mg/kg) se inyectó en ratas Wistar macho en 5 ocasiones, cada 12 horas, a partir del día postnatal dos (P2), se monitoreo su peso diariamente (P2-P8), se realizaron pruebas de enderezamiento y reconocimiento del nido (P8) para identificar cambios sensoriomotores en los individuos expuestos a VPA. Las crías se sacrificaron (P8-P11), el cerebro fue aislado y se obtuvieron rebanadas coronales (250 μ m) de los grupos control y VPA para realizar estudios de imagen de calcio y evaluar la extensión funcional de la red glial.

Observamos que no hubo diferencias significativas en la ganancia de peso entre los grupos, sin embargo, las latencias se incrementaron significativamente en las pruebas de enderezamiento (+76%, P5) y reconocimiento del nido (+86%, P8) en el grupo inyectado con VPA. Por otra parte, la extensión funcional de la red glial no se modificó al inhibir la actividad neuronal con lidocaína en ambos grupos. No obstante, la extensión de la onda de calcio y el número de células reclutadas disminuyeron significativamente (35% y 36%) en el grupo VPA respecto al control. La magnitud del transitorio de calcio promedio de las células reclutadas en la onda de calcio fue mayor en el grupo VPA respecto al control; mientras que la velocidad de la onda de calcio no se modificó significativamente. Con base en estos resultados concluimos que el VPA reduce tanto la extensión funcional de la red glial como el número de células reclutadas e incrementa la magnitud del transitorio celular promedio de la onda de calcio evocada en el CC. Estas alteraciones funcionales en las células gliales podrían asociarse a los cambios morfológicos (como aumento en el volumen del genu) reportados en el CC de neonatos con alto riesgo de desarrollar TEA.

ABSTRACT

The corpus callosum (CC) is a unique commissural tract of placental mammals. The CC is composed of interhemispheric axons and glial cells (99% of the somata). Neurodevelopmental disorders, such as Autism Spectrum Disorder (ASD), are associated with morphological changes in CC. Early exposition to valproate (VPA) increases the risk to develop ASD during pregnancy or the first months of the newborn. However, little is known about cellular physiology alterations of CC in response to VPA. On the other hand, depolarization of CC cell membranes induces intracellular calcium transients that propagate to neighboring cells producing a calcium wave. This paradigm reveals the functional extension of the glial cells network. The aim of this study was to test early postnatal exposure to VPA on glial cells network. Thus, VPA (300mg/kg) was injected five times, every 12h, in Wistar rat male pups starting at postnatal day 2 (P2). The body weight gain was recorded daily (P2-P8) and righting reflex and nest identification tests were performed to identify sensorimotor deficits in VPA exposed rats. The pups (P8-P11) were sacrificed, the brains were isolated and coronal slices (250 μ m) from control and VPA groups were obtained. Calcium imaging studies were performed to test the functional extension of the network.

Our results showed no differences in body weight gain, but the latencies for righting reflex (+76%, P5) and nest identification (+86%, P8) were significantly increased in the group injected with VPA. The calcium wave extension in both groups was unaffected when lidocaine was added to the aCSF and blocked neuronal activity. The size of the calcium wave and the number of recruited cells were significantly reduced (35% and 36% respectively) in the VPA group when compared to the control group. The mean calcium transient of the recruited cells in the calcium wave was significantly increased for the VPA group, while the calcium wave velocity was unchanged. We conclude that VPA reduce the size of the calcium wave and the number of recruited cells, while the mean calcium transient was increased. These functional changes in glial cells may be associated with the morphological changes observed in the CC of neonates with high risk to develop ASD.

ÍNDICE TEMÁTICO

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La anatomía del cuerpo caloso.....	1
1.2 Las células gliales y la citoarquitectura en el CC	1
1.2.1 Los astrocitos en el CC.....	5
1.3 El desarrollo del cuerpo caloso.....	7
1.4 El Trastorno del espectro autista.....	9
1.5 El ácido valproico y su farmacocinética.....	9
1.6 Los transitorios espontáneos y las ondas de calcio como mecanismo de comunicación intracelular de las células gliales en el neurodesarrollo.....	13
1.6.1 La dinámica de calcio en la glía.....	14
1.6.2 Las ondas de calcio y sus mecanismos de propagación.....	15
2. ANTECEDENTES	16
2.1 El uso del valproato en los modelos animales.....	16
2.2 La propagación de las ondas de calcio en el CC.....	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	18
5.1 General.....	18
5.2 Específicos.....	18
6. METODOLOGÍA	19
6.1 Animales.....	19
6.2 Preparación de rebanadas e imagen de calcio.....	19
6.3 Farmacología de bloqueo neuronal.....	21
6.4 Análisis estadísticos.....	21
7. RESULTADOS	22
7.1 El VPA no tuvo efecto sobre la ganancia de peso corporal.....	22

7.2 La administración postnatal de VPA incrementa la latencia del reflejo de enderezamiento.....	23
7.3 La latencia de reconocimiento del nido se incrementa por la exposición postnatal al VPA.....	24
7.4 La exposición postnatal a VPA reduce la extensión de la onda de calcio.....	25
7.5 La extensión funcional de la onda de calcio decae linealmente y es independiente de la actividad neuronal.....	27
7.6 La excitabilidad de las células reclutadas en la onda de calcio se incrementa en el grupo VPA.....	30
8. DISCUSIÓN.....	32
8.1 Déficits sensoriomotores por exposición postnatal al VPA.....	32
8.2 La exposición postnatal al VPA reduce la extensión funcional de la red glial.....	34
8.3 La lidocaína no afecta la extensión de la onda de calcio.....	34
8.4 Relación entre la extensión de la onda de calcio y el transiente de calcio en el CC.....	37
9. CONCLUSIONES.....	39
10. PERSPECTIVAS.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
APÉNDICES.....	54
I. Estandarización del pulso de corriente para estimulación eléctrica...54	
II. Análisis de videos de onda de calcio.....55	
III. Cálculo de la velocidad de propagación de la onda de calcio.....56	

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1.</u> Localización y anatomía del CC.....	2
<u>Figura 2.</u> Clasificación de la neuroglia.....	3
<u>Figura 3.</u> Corte sagital de cerebro de rata.....	8
<u>Figura 4.</u> Ganancia de peso corporal.....	22
<u>Figura 5.</u> Latencia del reflejo de enderezamiento durante el desarrollo postnatal (P3 – P8)	23
<u>Figura 6.</u> Latencia del reconocimiento de nido en los grupos control y VPA.....	24
<u>Figura 7.</u> La extensión funcional de la onda de calcio se reduce en el modelo VPA.....	26
<u>Figura 8.</u> Tasa de decaimiento de la extensión funcional de la onda de calcio.....	29
<u>Figura 9.</u> La respuesta celular promedio aumenta en el grupo VPA.....	31
<u>Figura 10.</u> Arreglo experimental para la selección del pulso de corriente.....	54
<u>Figura 11.</u> Velocidades estimadas de propagación de la onda de calcio evocada por despolarización.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

<u>Tabla 1.</u> Ejemplos de los blancos moleculares afectados por la administración de VPA.....	11
<u>Tabla 2.</u> Promedio de la ganancia de peso corporal.....	22
<u>Tabla 3.</u> Latencia promedio del reflejo de enderezamiento en los grupos control y VPA.....	24
<u>Tabla 4.</u> La extensión funcional de la red glial y su decaimiento en estímulos despolarizantes consecutivos.....	28

ABREVIATURAS Y SIGLAS

[Ca²⁺]_i	Calcio intracelular
2Cl-ATP	Cloroadenosín Trifosfato
ADP	Adenosín Difosfato
ATP	Adenosín Trifosfato
BrDU	2-bromo deoxiuridina
Ca²⁺	Ión calcio
CC	Cuerpo calloso
CO₂	Dióxido de carbono
CPu	Caudado Putamen
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GFAP	Proteína ácida gliofibrilar
GTP	Guanosín Trifosfato
HDAC	Histona Desacetilasa
IP₃	Inositol Trifosfato
Na⁺	Ión sodio
SRB	Sulforodamina B
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TEA	Trastorno del Espectro Autista
VPA	Ácido Valproico

1. INTRODUCCIÓN

El cuerpo calloso (CC) es la comisura interhemisférica de mayor tamaño e importancia en mamíferos placentarios, y conecta ambos hemisferios cerebrales de manera transversal. El CC está constituido por aproximadamente 180-200 millones de axones, procedentes de las células piramidales de la corteza (en su mayoría, de las capas II y III), también de neuronas fusiformes de la capa VI. (Quintero-Gallego et al., 2003). En roedores, el número de axones incrementa de 4.4 millones a 11.5 millones desde el nacimiento hasta el día posnatal 5 (P5), y este número se mantiene constante hasta la edad adulta (Gravel et al., 1990).

Existen evidencias neuroquímicas y electrofisiológicas que establecen como mayoría a las sinapsis excitatorias de los axones del CC; sin embargo, algunos de estos axones conducen a neuronas inhibitorias, lo que conlleva a una estricta regulación de la vía sobre sus zonas blanco (Innocenti, 1986; Payne, 1994). Cada región cortical está conectada con su región correspondiente en el hemisferio opuesto, esto se conoce como conexión callosa homotópica; aunque también existen conexiones heterotópicas, es decir, conexiones entre áreas hemisféricas no correspondientes.

1.1 La anatomía del cuerpo calloso

En el cerebro humano, el CC mide aproximadamente 9 cm de longitud, con un espesor promedio de 6 mm hacia el tercio anterior, 4 mm hacia el tercio posterior y 6 mm en la sección del esplenio en el adulto (Antunez, 1979). Anatómicamente se divide en *genu*, cuerpo y *esplenio* en las secciones anterior, media y posterior, respectivamente. La estructura del CC está presente en todos los mamíferos placentarios, excepto en los marsupiales (Aboitiz & Montiel, 2003).

El genu (rodilla) es la parte más engrosada del CC, llamado así por un cambio abrupto en su orientación entre la lámina rostralis y el cuerpo, además forma el límite anterior del septum pellucidum. Sus fibras se cruzan y dan lugar a los fórceps menores, una conexión entre las regiones de la corteza frontal (Hofer & Frahm,

2006). El esplenio, por su parte, es la porción más delgada en el CC. De morfología variable entre plana y redondeada, comúnmente se ubica arriba o justo en el piso del tercer ventrículo. Sus fibras se mueven posteriormente, y contribuyen a la formación del fórceps principal, que establece comunicación entre lóbulos occipitales (Jea et al., 2008). El cuerpo es la porción horizontal que se extiende desde el genu hasta el punto donde el fórnix se apoya en la superficie inferior del CC (Hofer & Frahm, 2006). Sus fibras forman la corona radiata, así como otras importantes fuentes de sustancia blanca, a medida que se mueven transversalmente por la corteza cerebral. Finalmente, las regiones orbitales de los lóbulos frontales se conectan a través de las fibras rostrales. Por su ubicación anatómica, el CC está muy relacionado con el fórnix, y en conjunto con este, forman una barrera física que separa los ventrículos laterales (Goldstein & Mesfin, 2017).

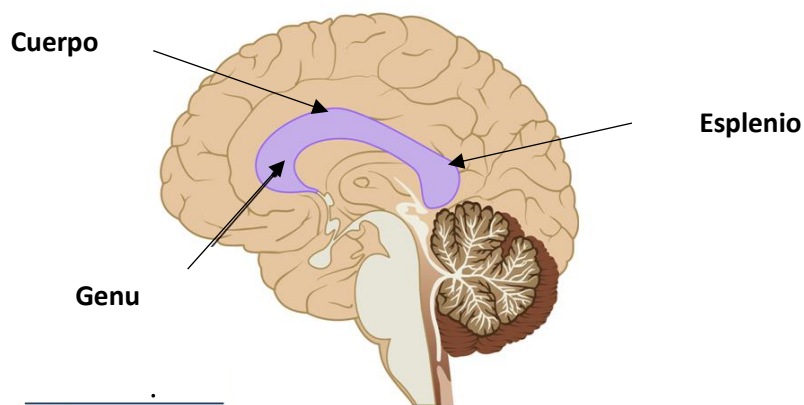


Figura 1. Localización y anatomía del CC. Se enlistan las secciones principales de la estructura. Modificado de <https://asociacioneducar.com/ilustracion-cuerpo-caloso>.

1.2 Las células gliales y la citoarquitectura en el cuerpo calloso

La característica principal que define a las neuronas es su capacidad de transmisión de impulsos eléctricos en forma de potenciales de acción. Aquellas células del sistema nervioso que carecen de esta propiedad son conocidas como glía (Allen & Barres, 2009).

Las células gliales se encuentran en el sistema nervioso de todos los vertebrados, y existen dos diferentes tipos de glía de acuerdo a su origen durante el desarrollo. Las células macrogliales (astroglía y oligodendroglía), son de origen ectodérmico, mientras que la microglía, es de origen mesodérmico. Algunas de las funciones de la glía refieren a la homeostasis del SNC a nivel, celular, molecular, metabólico, inmunológico y de señalización. Además, algunos tipos de neuroglia actúan como elementos quimiosensitivos en el cerebro, que pueden detectar cambios de pH, y los niveles de CO₂ y Na⁺ (Verkhratsky & Butt, 2013). En el SNC incluye a los astrocitos, oligodendrocitos, NG2 y microglía, mientras la glía del SNP incluye células de Schwann mielinizadas, no mielinizadas y perisinápticas (Figura 1) (Verkhratsky & Butt, 2013).

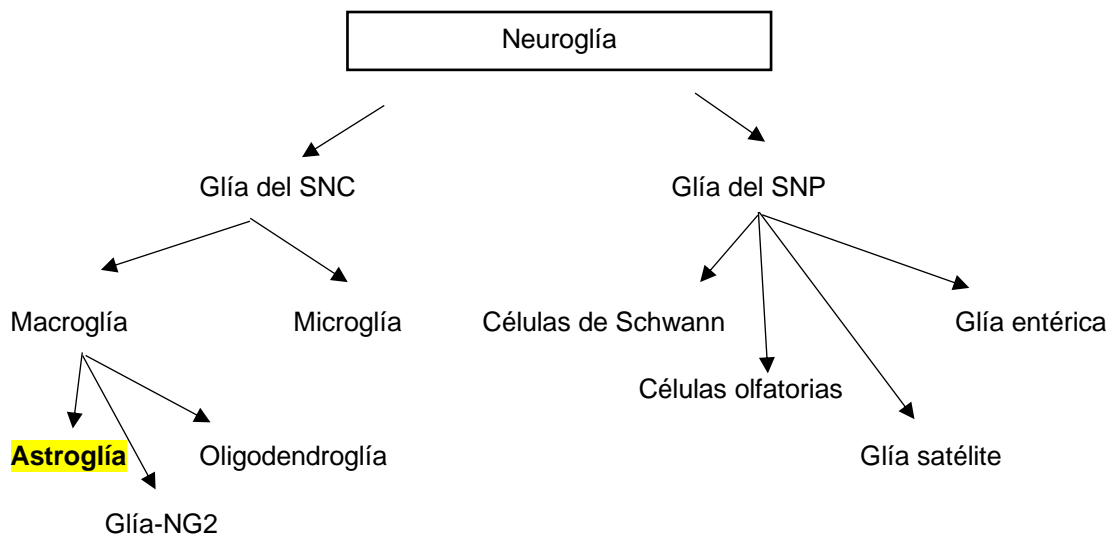


Figura 2. Clasificación de la neuroglía. El apartado de astroglía se encuentra en amarillo para señalar el tipo celular de interés en el presente trabajo (Modificado de Verkhratsky et al., 1998).

Los oligodendrocitos son las células especializadas en la producción de mielina que recubre los axones en el SNC, lo que permite una conducción eficiente del impulso eléctrico neuronal (Scolding, 2010). La vaina de mielina es una membrana de ácidos grasos formada por una envoltura en espiral en las extensiones de la membrana plasmática alrededor del axón, que extruyen el citoplasma y compactan las bicapas

lipídicas apiladas, lo que favorece el aislamiento axonal para conducir los impulsos nerviosos eficazmente (Simons & Trajkovic, 2006).

Pío del Río Hortega, en 1921, describió a los oligodendrocitos y los clasificó en cuatro tipos con base en su tamaño y forma del soma, número de procesos y axones que mieliniza, además de su localización y aparición durante el desarrollo. Estos criterios se utilizaron posteriormente en estudios de inmunohistoquímica, microscopía electrónica y expresión de genes reporteros específicos (Berry et al., 1995; Bjartmar et al., 1994; Butt et al., 1998). A lo largo del axón, la capa de vaina de mielina es segmentada por los nódulos de Ranvier, regiones altamente especializadas donde los potenciales de acción son generados. Los segmentos mielinizados entre cada nódulo de Ranvier se conocen como internodos (Verkhatsky et al., 1998). Además de los oligodendrocitos mielinizados, existen dos poblaciones principales de oligodendrocitos que carecen de esta propiedad: la glía NG2 y la glía satélite (Ludwin, 1984; Nishiyama et al., 2009). En el CC, los oligodendrocitos son la población celular más abundante, con casi un 66 % del total (Sturrock, 1976).

La glía NG2 fue la última en descubrirse, y su identificación fue posible gracias a su inmunoreactividad al proteoglicano de sulfato de condroitina en el hipocampo (Bergles & Jahr, 1997). Algunas de las características para que una célula sea clasificada como glía NG2 son su capacidad de expresar receptores de PDGFR α (Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas), una lenta proliferación in vivo y la capacidad de generar oligodendrocitos en el SNC adulto; además no expresan el marcador astrogliar de la proteína ácida gliofibrilar (GFAP) o marcadores de microglía, (Verkhatsky & Butt, 2013). La glía NG2 se caracteriza por presentar largos procesos, recibir contacto sináptico y no presentar uniones comunicantes (Dimou et al., 2008; Nishiyama et al., 2009).

Las células gliales NG2 se presentan y proliferan en tejido cerebral adulto (Nishiyama et al., 1999). En la sustancia blanca se considera un precursor de oligodendrocitos; mientras que en la sustancia gris mantienen su fenotipo y raramente originan oligodendrocitos o astrocitos (Verkhatsky & Butt, 2013).

La microglía posee pequeños somas similares a los astrocitos y un número pequeño de procesos (4 – 8) extendidos (Lenz et al., 2013). Algunas de las características propias de la microglía son su aparición durante un periodo temprano de desarrollo en el cerebro de manera que se distribuyen en el parénquima cerebral (Gehrmann et al., 1995). Ante un evento patológico cambia su morfología ramificada ameboide, el tamaño del soma aumenta y desarrolla actividad de tipo macrófago, lo que le permite migrar hacia otras áreas del SNC, y fagocitar cuerpos celulares (Ojemann, 2008; Verkhratsky et al., 1998).

1.2.1 Los astrocitos en el CC

Los astrocitos son la población más diversa dentro de las células gliales, dicha población está encargada de funciones como la formación de la barrera hematoencefálica, el mantenimiento de las neuronas y la regulación de la sinapsis neuronal (Tabata, 2015). Otras características importantes de los astrocitos es su ausencia de excitabilidad eléctrica (como en todos los tipos de glía), la expresión de transportadores de GABA (ácido gamma-aminobutírico) y glutamato, lo que permite la remoción y la liberación de neurotransmisores, un potencial de membrana muy negativo (entre -80 y -90 mV), debido a sus altas concentraciones de K^+ , y su comunicación con otros astrocitos mediante uniones comunicantes formadas por conexinas 43 o 30 (Kimmelberg, 2010; Parpura & Haydon, 2009). Una de las singularidades de la astrogliía es la expresión de marcadores como GFAP, nestina y vimentina. Estas proteínas de citoesqueleto modifican su expresión ante un evento inflamatorio que convierte a los astrocitos en reactivos y promueve su proliferación, en estas condiciones sus procesos se contraen y el soma incrementa su tamaño (Pekny & Pekna, 2014; Verkhratsky et al., 1998). A pesar del papel de GFAP dentro de la dinámica del astrocito, se han encontrado células astrogliales como las células de Müller, tipo de astrogliía radial en la retina, no expresan GFAP en condiciones fisiológicas normales (Kimmelberg, 2004).

Los astrocitos se agrupan en dos grandes clases: astrocitos protoplasmáticos y fibrosos (Hillman & Hillman, 2012). Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran

en la sustancia gris, de apariencia irregular y procesos altamente ramificados, que envuelven los vasos sanguíneos formando una especie de “barrera glial”, que es la pared más externa de la barrera hematoencefálica (Oliet et al., 2001). Algunas de las funciones de los astrocitos protoplasmáticos son la modulación de las sinapsis (Uwechue et al., 2012) y la regulación del flujo sanguíneo en respuesta a estos eventos (Takano et al., 2006). A pesar de la gran cantidad y extensión de sus procesos, las funciones de los astrocitos protoplasmáticos son independientes, y no se sobrelapan (Halassa et al., 2007). Los astrocitos fibrosos por su parte, se encuentran distribuidos en la sustancia blanca y tienen una forma más regular, casi similar a la de una estrella, y presentan una arborización compleja tipo arbusto de amplia cobertura sináptica (Miller & Raff, 2018). Además de sus características morfológicas, existen marcadas diferencias entre los astrocitos en humanos y en los murinos (Oberheim et al., 2009). Los astrocitos protoplasmáticos en humanos son significativamente más largos y complejos que sus contrapartes en roedores, a pesar de esto, no existen diferencias en la densidad entre ambas especies (DeFelipe et al., 2002).

Los glioblastos (precursores de las células gliales) constituyen la población celular dominante en el CC durante la primera semana de desarrollo postnatal de los roedores. Previo al inicio de la mielinización, estos precursores inician su diferenciación y maduración hacia el linaje oligodendroglial (Sturrock, 1976). Los astrocitos se encuentran ausentes en el nacimiento, sin embargo, en el día postnatal 5 (P5), su población es aproximadamente del 5%; por otro lado, la microglía está presente desde el nacimiento y tiene su mayor población en los primeros estadios del desarrollo murino (P17, 11 %). La densidad glial del CC no es similar en todas sus regiones, y esta varía con la edad. La región del genu, por ejemplo, contiene una densidad mayor de células gliales (Reyes-Haro et al., 2013).

1.3 El desarrollo del cuerpo caloso

El CC es una región anatómica reciente exclusiva de los mamíferos placentarios, su desarrollo es a través de una fusión interhemisférica entre los grupos de fibras gliales llevando las fibras callosas al hemisferio contrario (Rakic & Yakovlev, 1968).

El proceso de neurulación en los mamíferos placentarios inicia justo después de la gastrulación, para dar lugar a la formación del tubo neural, que posteriormente originará al cerebro y la médula espinal (Wolpert et al., 2015). En los roedores este evento ocurre en el día embrionario 13.5 (E13.5); el CC aparece en el día E18.5 y en el E21 se pueden identificar el genu y el esplenio (Valentino & Jones, 1982). En el humano el desarrollo del CC inicia entre las semanas 8 y 12 de gestación en la *lámina reuniens* de His, y posteriormente progresa su desarrollo sobre la rodilla en dirección cráneo-caudal hasta el esplenio. La última sección de desarrollo es el *cuerpo rostral*, entre la semana 18-20 de gestación (Blay-Beltrán et al., 2012). A pesar de que la forma del CC es esencialmente la que tendrá a lo largo de la vida del individuo en la semana 20, esta sección de fibras solo representa el 5 % de lo que será en un cerebro maduro, debido principalmente al tamaño y peso del cerebro del feto a esta etapa (Jovanov-Milosevic, 2009). En las ratas, el CC tiene la misma función que en los humanos; su composición es similar, los somas neuronales representan menos del 1 % de su población y el resto corresponde a células gliales después del día P5, principalmente precursores de oligodendrocitos (Sturrock, 1976).

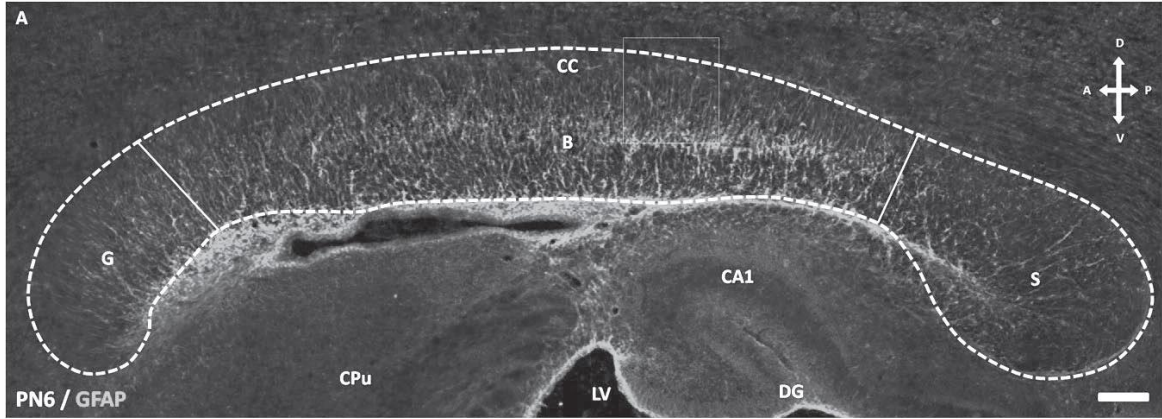


Figura 3. Corte sagital de cerebro de rata vista con inmunotinción de GFAP. La orientación en la parte derecha describe las direcciones: dorsal (D), ventral (V), anterior (A) y posterior (P); en la parte izquierda de la imagen está el tercio anterior en donde se encuentra el *genu* (G), y siguiendo la estructura de izquierda a derecha se ubican los tercios medio y posterior, que contienen el *corpus* (B) y *esplenio* (S), respectivamente. Otras regiones representadas son Caudado Putamen (CPU), Región CA1 del Hipocampo (CA1), Giro Dentado del Hipocampo (DG), Ventrículo lateral (LV), Región Anterior (A). La barra de calibración indica una distancia de 80 μm (tomada de Reyes-Haro et al., 2013)

El CC constituye el sistema primario de proyección cortical, por lo que cualquier anomalía tendrá un efecto adverso en el neurodesarrollo de la corteza (Innocenti, 1994).

Algunos padecimientos relacionados con anomalías en el CC son: la agenesia (Vélez-Domínguez, 1998), la esclerosis múltiple (De Castro et al., 2009) y el trastorno del espectro autista (TEA) (Amaral et al., 2008). En el caso del TEA, los estudios recientes de imagen por resonancia magnética reportaron un mayor espesor del genu, en los bebés de 6-12 meses de edad que posteriormente fueron diagnosticados con TEA (Wolff et al., 2015).

1.4 El Trastorno del Espectro Autista

El autismo se define como un trastorno conductual, que afecta la comunicación además de una interacción social y emocional anómala (Rogel-Ortiz, 2005). Se caracteriza por anomalías, en la conducta, el lenguaje, la cognición y la motricidad, asociadas al retraso mental, la epilepsia, el síndrome de Asperger, entre otros; sin otra causa de disfunción cerebral. Esto sugiere que se trata de un trastorno funcional difuso en la corteza de asociación con respecto a las cortezas primaria sensorial y motora y la sustancia blanca (Quijada, 2008).

Una de las generalidades en el TEA es el problema de la adquisición del lenguaje, presentándose un déficit en la comprensión, un uso limitado o disfuncional de las palabras o la mímica, una disprosodia leve y en casos graves, una ausencia total del lenguaje. Cuando el lenguaje se presenta pueden existir fenómenos como la ecolalia, los neologismos, el lenguaje telegráfico y los errores en el uso de tiempo y la persona (Rogel-Ortiz, 2005).

A pesar de que el TEA es un trastorno del neurodesarrollo, su diagnóstico ocurre después de los dos años de desarrollo, el conocimiento sobre la neurobiología celular previa al diagnóstico es limitado. En este sentido, los modelos murinos de autismo ofrecen la oportunidad de investigar al respecto, ya que emulan las características conductuales, motoras y cognitivas observadas en los individuos diagnosticados con este trastorno (Schneider & Przewłocki, 2005).

El TEA tiene orígenes aún poco conocidos, no obstante, la administración de fármacos como el ácido valproico (VPA) durante etapas críticas del desarrollo pre y postnatal, produce cambios neurobiológicos y conductuales asociados al trastorno (Chomiak et al., 2013).

1.5 El Ácido Valproico y su farmacocinética

El ácido valproico (ácido dipropilacético; ácido 2-propilpentanoico) (VPA) es un fármaco anticonvulsivo de amplio espectro, actúa como estabilizador del estado de ánimo del trastorno bipolar y es efectivo en el tratamiento de la migraña (Peterson & Naunton, 2005). El VPA potencia la neurotransmisión inhibitoria lo que reduce la

hiperexcitabilidad neuronal que se presenta en la epilepsia. No obstante, el mecanismo de acción del VPA aún es controvertido. (Nalivaeva et al., 2009). El VPA también es un inhibidor de las desacetilasas de histonas (HDAC) de acción amplia. Las HDAC modifican la estructura de la cromatina y la expresión génica de las células nerviosas (Göttlicher et al., 2001). Aunado a esto, también causa deficiencia de ácido fólico, defectos del tubo neural (en mayor escala si se administra durante el primer trimestre de gestación), e inducción de estrés oxidativo (Ornoy, 2009). Además de su importante papel en la transcripción génica y en la diferenciación fenotípica, las HDAC realizan diferentes acciones dentro del SNC.

La HDAC1 es un subtipo de HDAC que se expresa en las células troncales y en la glía; mientras que la HDAC2 está expresada en los neuroblastos, las neuronas y la glía no diferenciada; todos estos procesos de expresión génica ocurren durante las diferentes etapas de vida tanto en roedores como en humanos (Balasubramaniyan et al., 2006; Hsieh & Gage, 2005).

El VPA es un fármaco teratogénico, y a nivel central actúa inhibiendo el sitio activo de la HDAC por diferentes vías; el VPA puede inhibir la HDAC1 mediante su interacción con el sitio activo, mientras que en HDAC2 puede inducir su degradación proteosomal (Phiel et al., 2001). Además, el VPA interfiere con mecanismos epigenéticos como la metilación de histonas y del ADN, lo que desencadenan fenómenos de activación y represión génica (Balasubramaniyan et al., 2006; Hsieh & Gage, 2005). La administración prenatal de VPA aumenta la expresión de 726 genes, e inhibe otros 577 (Fukuchi et al., 2009).

Tabla 1. Ejemplos de los blancos moleculares afectados por la administración de VPA. El criterio para decidir si la expresión de un blanco está alterado, es que los niveles cuantificables de este sean más del doble para sobreexpresión y menos de la mitad para inhibición (Fukuchi et al., 2009).

Blanco molecular	Función	Alteración por inhibición/excitación/VPA
Desacetilasas de histonas tipo I. (HDAC1 y HDAC2)	Regulan la transcripción del ADN	Cuando se inhiben pueden aumentar el número de sinapsis y una facilitación de su maduración. El VPA promueve una proliferación de neuritas y neuronas (Akhtar et al., 2009; Go et al., 2012).
Exón I-IX de BDNF	Responsables de la excitabilidad neuronal	Al aumentar su expresión, produce hiperexcitabilidad neuronal, y aumenta la expresión de mRNA (Fukuchi et al., 2009).
GAD 65 Y GAD 67	Enzimas limitantes de la síntesis de GABA	Al ser inhibidas por el VPA, disminuye la expresión de marcadores para neuronas GABAérgicas (Huang et al., 2007) y el número de células (Fukuchi et al., 2009).
PTEN	Regulador de la vía AKT, crecimiento y circuitos cerebrales	Inhibidas por el VPA, aumenta el radio de AKT en corteza e hipocampo, además se observa un cambio en la morfología del área CA1 del hipocampo (Yang et al., 2016).
Neuroligina 3 (NGLN3)	Adhesivo celular	Inhibición por VPA, con niveles más bajos de mRNA en hipocampo y corteza (Kolozsi et al., 2009)

Estudios de autoradiografía muestran que el VPA se absorbe y se distribuye rápidamente en las estructuras cerebrales pocos minutos después de su administración (Eymard et al., 1971). La concentración máxima en el cerebro de la rata ocurre aproximadamente a los 30 minutos de administración, y algunos estudios demuestran que el VPA se distribuye homogéneamente en el cerebro,

excepto en el cerebelo, donde la sustancia blanca muestra mayor actividad que la corteza (Schobben et al., 1975). En humanos, la vida media del fármaco oscila entre las 9 y 20 h (Genton, 2005); sin embargo, en ratas la vida media del VPA es variable y dependiente de la concentración de la dosis siguiendo una tendencia no lineal; encontrándose entre 2 y 5 h a una dosis de 80 mg/kg (Löscher, 1999). El VPA cruza la barrera hematoencefálica, posiblemente por un mecanismo de transporte activo (Loscher & Esenwein, 1978) que implica a los transportadores de monocarboxilatos (MCTs 1 y 2). Se cree que los dominios catalizan el co-transporte de un protón con la molécula de VPA, llevándola a la madre y al feto, posteriormente al tracto intestinal y de ahí a la circulación (Utoguchi & Audus, 2000). Además de los MCT como medio de entrada y salida, se ha encontrado que el VPA puede unirse a moléculas de ácidos grasos de cadena media, como medio de transporte para su paso del torrente sanguíneo a la barrera hematoencefálica (Tsuji, 2005).

La administración de VPA durante las etapas críticas del neurodesarrollo como en la gestación puede derivar en malformaciones congénitas en los hijos como el cierre del tubo neural, además de malformaciones cardíacas y craneofaciales; además de un compromiso cognitivo de los infantes, manifestándose diagnósticos como el Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) y TEA (Tomson et al., 2011). El tratamiento con VPA suele tener efectos mínimos o nulos en adultos y jóvenes; sin embargo, se ha documentado un efecto comprometedor en la función hepática de niños y bebés, ya sea por tratamiento o durante la lactancia (Dreifuss et al., 1987). Esto se debe particularmente a los aumentos de concentración del fármaco. Aunque durante la gestación el VPA se depura más rápidamente, durante la lactancia los valores de VPA en leche oscilan entre 4 % y 10 % en el plasma materno y entre 4 % y 12 % en los lactantes; aunado a esto en lactantes y niños hay un menor desarrollo de las enzimas que participan en el metabolismo de este fármaco, como el Citocromo P450 (Asconapé, et al., 1993).

1.6 Los transitorios espontáneos y las ondas de calcio como mecanismo de comunicación intercelular de las células gliales en el neurodesarrollo.

La señalización con calcio (Ca^{2+}) tiene un papel esencial en los eventos de neurulación, proliferación, diferenciación y migración de las células nerviosas. La señalización de Ca^{2+} está regulada por las interacciones entre cascadas de señalización, canales iónicos, proteínas efectoras y otros factores (Toth et al., 2016).

Las células gliales son capaces de comunicarse con otras células gliales cercanas mediante incrementos intracelulares de calcio $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que pueden propagarse a las células vecinas, estos transientes de calcio ocurren de manera espontánea o en respuesta a un estímulo externo (Charles, 1998). Los primeros experimentos se realizaron en cultivos primarios de astrocitos y mostraron que las ondas intracelulares de Ca^{2+} podían propagarse largas distancias a través de las uniones comunicantes lo que implicaba el reclutamiento de varias células y evidenciaba la red glial funcional (Cornell-Bell et al., 1990).

Los transientes de calcio intracelular se generan en la glía radial y están implicados en los procesos de migración, proliferación y diferenciación neuronal (Dupont, 2014; Malatesta et al., 2003; Owens & Kriegstein, 1998). Weissmann y colaboradores (2004) demostraron que la despolarización neuronal cortical promovía la liberación de Adenosín Trifosfato (ATP) y evocaba las ondas de calcio de la glía radial lo que incrementaba la tasa de neurogénesis en la zona subventricular durante el neurodesarrollo embrionario del ratón (E16 – E18), (Weissman et al., 2004).

1.6.1 La dinámica de calcio en la glía

En el sistema nervioso, la señalización de $[Ca^{2+}]_i$ ha sido ampliamente estudiada y caracterizada en una gran variedad de neuronas, en donde se ha demostrado que este ion divalente es fundamental. Los estudios de Ricardo Miledi en el axón gigante del calamar demostraron que el Ca^{2+} tiene un papel fundamental en la liberación vesicular de los neurotransmisores (Jeng, 2002). En la glía también se expresa un complejo de moléculas que controlan la señalización de Ca^{2+} , incluyendo los canales de voltaje dependientes de Ca^{2+} . La señalización con Ca^{2+} es la base de la excitabilidad glial que se presenta espontáneamente o en respuesta a la actividad neuronal. Los transitorios de Ca^{2+} intracelular pueden difundirse a otras células gliales a través de las uniones comunicantes tipo Gap o bien por la liberación del ATP como gliotransmisor, lo que establece una comunicación interglial que puede modular la actividad neuronal (Parpura & Zorec, 2010; Verkhratsky & Kettenmann, 1996)

Los transitorios de Ca^{2+} que ocurren intracelularmente en los astrocitos pueden ser promovidos por la activación de receptores acoplados a proteínas G a distintos neurotransmisores, mismos que promueven la activación de las cascadas de señalización intracelular que incluyen al Inositol Trifosfato (IP_3) y favorecen la liberación de calcio intracelular de los reservorios ubicados en el RE (Bezprozvanny, 2005; Hamilton, 2005). Las mitocondrias también tienen un papel importante en la excitabilidad/señalización celular al modular las respuestas gliales y neuronales. La captura de Ca^{2+} y su liberación en el citosol modulan respuestas fisiológicas. En las células gliales los incrementos citosólicos de IP_3 se traducen en incrementos mitocondriales de $[Ca^{2+}]_i$, que modifican la propagación de la onda de calcio (Rizzuto et al., 2012).

1.6.2 Las ondas de calcio y sus mecanismos de propagación

Los transitorios de calcio intracelular pueden propagarse a células vecinas, lo que constituye un mecanismo de comunicación intercelular entre las células gliales (Fujii et al., 2017). Las ondas de calcio pueden evocarse y propagarse a través de estímulos físicos o farmacológicos, y puede influir en la actividad de las neuronas adyacentes, la microglía y las células endoteliales, alterando los fenómenos de proliferación y comunicación (Koizumi et al., 2003; Nedergaard, 1994).

Fujii y colaboradores (2017), demostraron que las ondas de calcio evocadas en los astrocitos constan de tres elementos: 1) los incrementos intracelulares de Ca^{2+} en las células estimuladas; 2) la rápida propagación del Ca^{2+} intracelular en las regiones proximales mediada por uniones comunicantes; y 3) la lenta propagación de Ca^{2+} intracelular en las regiones distales mediada por el ATP extracelular. Este estudio reveló nuevas propiedades en la fisiología de los astrocitos, particularmente en las vías principales de la dinámica de calcio: las uniones comunicantes y el ATP extracelular. Las ondas de calcio se consideran transmisoras de señales fisiológicas y patológicas en el cerebro, y estudios recientes han demostrado la participación de los astrocitos, las redes y las ondas de calcio en la regulación de la actividad neuronal y enfermedades neurológicas (Pannasch & Rouach, 2013).

2 ANTECEDENTES

2.1 El uso del valproato en los modelos animales

El VPA es un fármaco teratogénico que al ser administrado durante el embarazo promueve malformaciones que incluyen al SNC, además de interferir con los procesos del neurodesarrollo lo que puede conducir a trastornos como el autismo- (Lee et al., 2016). Al respecto, Lee y colaboradores (2016) investigaron los efectos de una administración postnatal de VPA sobre ratas en edades P2-P4, y encontraron un aumento significativo de la proliferación de precursores gliales, particularmente en la corteza frontal. Se desconoce si un evento similar ocurre en el CC, lo que podría explicar el aumento inicial en el grosor del genu reportado en bebés que posteriormente fueron diagnosticados con TEA (Wolff et al., 2015).

2.2 La propagación de las ondas de calcio en el CC

Se han propuesto dos mecanismos para la transmisión de $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos: la difusión de segundos mensajeros vía uniones gap con una subsecuente liberación de Ca^{2+} , y la liberación de ATP al espacio extracelular, seguido por la activación de receptores purinérgicos en los astrocitos vecinos, ocasionando una elevación en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$. Schipke y colaboradores (2002), demostraron que las ondas de calcio en el CC no modifican su extensión al utilizar bloqueadores de las uniones comunicantes como el octanol, sin embargo, la extensión funcional de la red glial se reduce significativamente al utilizar reactive blue, un antagonista no selectivo de los receptores purinérgicos tipo P2X3. Adicionalmente, también comprobaron que la extensión funcional de la red glial no se modifica en presencia del bloqueador de canales de sodio tetrodotoxina, lo que indica que las ondas de calcio se producen independientemente de la actividad neuronal.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El TEA es un trastorno del neurodesarrollo cuya etiología se desconoce. No obstante, los modelos murinos de autismo como el de exposición al VPA permiten investigar al respecto. Estudios recientes de resonancia magnética reportaron un incremento en el volumen del genu, región anterior del CC, en niños de 6 meses de edad. Sin embargo, se desconocen las alteraciones en la fisiología celular del CC que ocurren en el TEA. En este estudio se investigó si la extensión funcional de la onda de calcio evocada por despolarización en el CC está alterada en el modelo de autismo por exposición postnatal al VPA.

4 HIPÓTESIS

La exposición postnatal al VPA produce déficits sensoriomotores e incrementa la extensión funcional de la red glial en el CC.

5 OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto de la exposición postnatal a VPA sobre la extensión funcional de la red glial en el CC.

5.2 Específicos

- Estudiar si la actividad sensoriomotora está alterada por la administración postnatal de VPA.
- Investigar sobre la participación de los astrocitos en la onda de calcio en el CC.
- Determinar si la actividad neuronal regula la extensión de la onda de calcio asociada a células gliales en el CC.
- Analizar si la administración de VPA postnatal induce cambios en la extensión funcional de la onda de calcio evocada.

6 MÉTODOS

6.1 Animales

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología se llevó a cabo con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se utilizaron crías macho de ratas Wistar alojadas con su madre en condiciones 12 h luz/12 h oscuridad, con alimento y agua. Se determinó el sexo de las crías y fueron pesadas en el día postnatal 2 (P2), así mismo se seleccionaron a las diez crías de mayor peso corporal y el resto fueron descartadas. Los individuos seleccionados se inyectaron cinco veces de manera subcutánea de P2 a P4, cada administración espaciada por un periodo de 12 h con una dosis de 300 mg/Kg de VPA (Sigma), mientras que los controles fueron inyectados con solución salina (NaCl al 0.9% w/v).

Prueba del reflejo de enderezamiento. La prueba se realizó durante los días postnatales P3 a P8, previamente descrita (Wagner et al., 2006). Las crías se colocaron boca arriba sobre una superficie lisa, y se estimó el tiempo que tardó en voltearse sobre sus 4 patas. La prueba se consideró fallida si el tiempo sobrepasaba los 30 s, se realizó por triplicado y se espació por un tiempo de 5 min, para cada animal. La duración de las pruebas durante y después de los días de administración del VPA tiene como objetivo determinar si la exposición aguda al fármaco tiene efectos similares en la prueba de enderezamiento a edades posteriores.

Prueba de reconocimiento de nido. Esta prueba se realizó con ratas P8 siguiendo un protocolo previamente descrito (Bogdanik & Lutz, 2011). Se colocó a la cría sobre el centro de una caja de 37x18 cm. En un extremo de la caja se encontraban aserrín del nido de la cría, mientras que el extremo contrario contenía aserrín limpio. Se estimó el tiempo aproximado en el que la rata tardó en llegar a uno de los dos extremos.

6.2 Preparación de rebanadas e Imagen de calcio

Los animales fueron sacrificados en una ventana de tiempo de P8 a P11 mediante decapitación. Los cerebros se aislaron en solución aCSF-Ca²⁺ fría (1 L: NaCl 134 mM; KCl 2.5 mM; Glucosa 20 mM; K₂HPO₄ 1.25 mM; NaHCO₃ 26 mM; MgCl₂ 1.3 mM, oxigenada por 1 h, pH 7.4) y la parte ventral se eliminó para tener un mejor acceso a la zona del CC, posteriormente se realizaron cortes coronales de 250 µm utilizando el vibrotomo marca Leica VT-1000S. Las rebanadas fueron puestas en solución aCSF+Ca²⁺ (1 L: aCSF-Ca²⁺ + 2 mM CaCl₂, oxigenada 1 h, pH 7.4). Las rebanadas con la región de interés, el genu (Bregma 1.60 mm – 0.70 mm; Interaural 10.60 mm – 9.70 mm; 3 rebanadas por animal) se incubaron con Fluo-4 AM (10 µM) durante 30 – 40 min a 37 °C en una incubadora (atmósfera de 95 %, aire 5 %CO₂). A continuación, las rebanadas se transfirieron a la cámara de registro y se examinaron en un microscopio vertical (Olympus BX51 WI) acoplado a una cámara CCD (PCO-EDGE 4.2, Germany) y un sistema LEDs (X-cite fluorescence Leds Illuminator). Las rebanadas se perfundieron permanentemente con aCSF+Ca²⁺ oxigenado, a temperatura ambiente (20-22°C). El genu se identificó visualmente utilizando el contraste de fases, tomando como referencia la corteza y el Caudado Putamen (CPu) en dirección dorsal y ventral, respectivamente.

Los cambios de [Ca²⁺]_i se observaron con un haz de luz de 488 nm y adquiriendo la luz emitida a 518 nm) durante un periodo de 150 s, con imágenes adquiridas cada segundo. Estas variaciones fueron estimadas mediante el establecimiento de una fluorescencia basal, por lo que las respuestas (picos) fueron normalizados en función de esta (F/F₀). Los incrementos de [Ca²⁺]_i fueron evocados mediante estimulación eléctrica con un microelectrodo de borosilicato que contenía solución aCSF, la punta tenía una resistencia ~1 MΩ. Los primeros 15 s del video correspondieron al pre-estímulo, posteriormente se aplicó un protocolo de estimulación eléctrica que consistió en aplicar un pulso de corriente de 300 µA (Apéndice I), a 10 Hz, por 2 s. Los videos fueron analizados posteriormente utilizando el software de edición ImageJ® (Apéndice II).

6.3 Farmacología de bloqueo neuronal

Se realizó el mismo protocolo de estimulación para cuantificar los cambios de $[Ca^{+2}]_i$, añadiendo además lidocaína 1 mM en solución aCSF+HEPES (2 mM), incubando el fármaco recirculándolo en la rebanada por un periodo de 5 – 10 min previos a la estimulación eléctrica, para observar si existían diferencias en la onda de calcio, utilizando ~15 mL de lidocaína 1 mM por rebanada. Se realizaron 4 series de experimentos con rebanadas: control, control + lidocaína, VPA y VPA + lidocaína.

6.4 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados con los programas R y GraphPad Prism 6®. El programa R se utilizó para evaluar la normalidad de los grupos de datos utilizando la prueba de Shapiro Wilkinon con un intervalo de confianza $\alpha = 0.05$, y de acuerdo con el valor arrojado se procedió a realizar en el software estadístico las pruebas pertinentes (ANOVA 1 vía/2 vías/3 vías, Friedman, Mann-Whitney, t Student), prueba post-hoc de Tukey. 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 $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 El VPA no tuvo efecto sobre la ganancia del peso corporal.

El peso corporal de los animales de ambos grupos experimentales se monitoreo por siete días consecutivos (de P2 a P8), y no se encontraron diferencias significativas [ANOVA 2 vías; $F_{(6,470)} = 0.724$; $p = 0.63$] entre las crías inyectadas con VPA (N=42 de 14 camadas) y las controles (N=32 de 14 camadas), lo que sugiere que no existe una relación entre la administración postnatal del VPA y el peso de las ratas macho monitoreado durante los primeros días postnatales. (Figura 4).

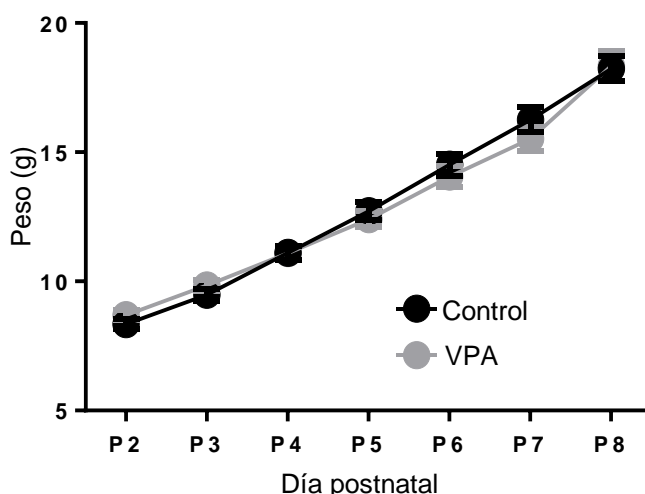


Figura 4. Ganancia de peso corporal. El peso corporal se registró cada 24 h durante siete días (P2-P8) en los sujetos de los grupos control (n=28 de 14 camadas) y tratado con VPA (n=32 de 14 camadas). Los datos son el promedio \pm el error estándar de la muestra (S.E.M). * $p < 0.05$

Tabla 2. Promedio de ganancia de peso corporal. Con número de camadas = 14, n=32 sujetos control y n=42 sujetos tratados con VPA de P2-P7, para P8 n=22 en control y n=23 en VPA. Los datos son el promedio \pm S.E.M.

Día postnatal	Peso control (g)	Peso VPA (g)	p
2	8.34 \pm 0.19	8.68 \pm 0.19	> 0.99
3	9.48 \pm 0.23	9.83 \pm 0.20	> 0.99
4	11.10 \pm 0.26	11.09 \pm 0.25	> 0.99
5	12.71 \pm 0.35	12.40 \pm 0.31	> 0.99
6	14.51 \pm 0.41	14.05 \pm 0.39	0.99
7	16.25 \pm 0.48	15.52 \pm 0.46	0.96
8	18.23 \pm 0.48	18.34 \pm 0.57	> 0.99

7.2. La administración postnatal de VPA incrementa la latencia del reflejo de enderezamiento

La latencia de enderezamiento en ratas control y tratadas con VPA se estimó en el periodo de P3 a P8. Los resultados mostraron un incremento significativo para el grupo tratado con VPA (+76%) respecto al control en P5 [ANOVA 2 vías; $F_{(5,228)}=1.23$; $N_{\text{control}}=15$, $N_{\text{VPA}}=18$; Figura 5; Tabla 3]. No obstante, no se observaron diferencias significativas en la latencia de enderezamiento durante el resto de las edades postnatales monitoreadas (P3-P8) ($N_{\text{control}}=15$, $N_{\text{VPA}}=18$; Figura 4; Tabla 2).

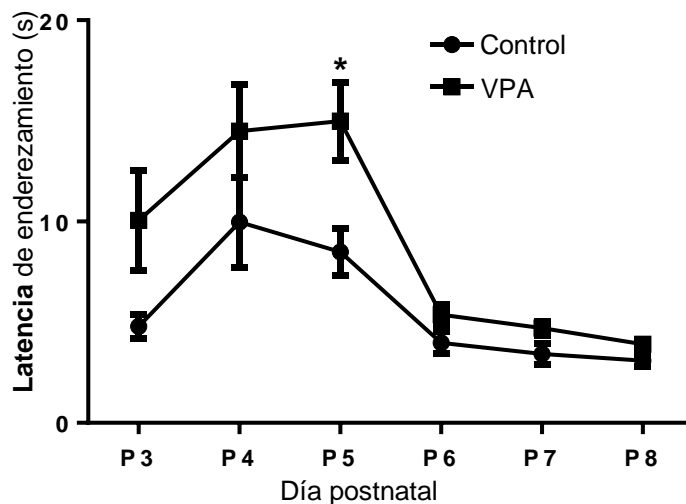


Figura 5. Latencia del reflejo de enderezamiento durante el desarrollo postnatal (P3-P8). La latencia del reflejo de enderezamiento se monitoreó cada 24 h durante seis días (P3-P8) para cada uno de los individuos de los grupos control (N=15) y tratado con VPA (N=18). Los datos son el promedio \pm S.E.M. * indica p valor <0.05.

Tabla 3. Latencia promedio del reflejo de enderezamiento en los grupos control y tratado con VPA. Los valores corresponden a los tiempos promedio \pm S.E.M.

Edad postnatal	Latencia control (s)	Latencia VPA (s)	<i>p</i>
3	4.78 \pm 0.59	10.06 \pm 2.49	0.09
4	9.97 \pm 2.23	14.48 \pm 2.31	0.16
5	8.49 \pm 1.15	14.98 \pm 1.93	0.01
6	3.98 \pm 0.54	5.37 \pm 0.48	> 0.99
7	3.42 \pm 0.50	4.71 \pm 0.35	> 0.99
8	3.08 \pm 0.29	3.91 \pm 0.22	> 0.99

7.3 La latencia para el reconocimiento del nido se incrementa por la exposición postnatal al VPA

La prueba conductual de reconocimiento del nido se realizó con ocho camadas de ratas y se evaluó la capacidad sensorio-motriz en (P8) (Varman et al., 2018). La latencia de reconocimiento del nido se estimó en 37 ± 4 s (N=13) para el grupo control y se incrementó 86% para el grupo tratado con VPA [68 ± 14 s; N=15; $F_{(11,9)}=12.24$; $p=0.02$] (Figura 6).

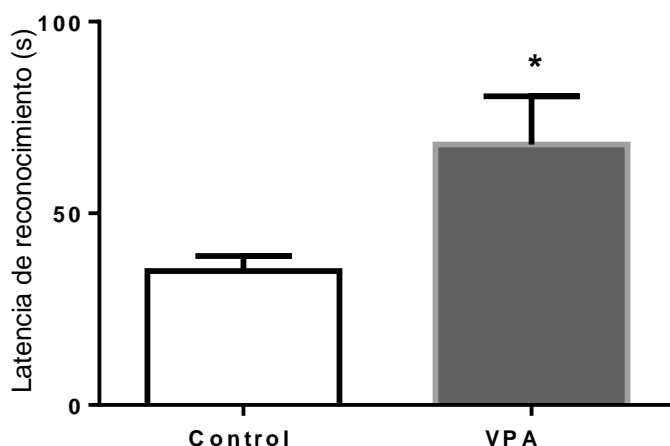


Figura 6. Latencia de reconocimiento de nido en los grupos control (N=13, 8 camadas) y tratado con VPA (N=15, 8 camadas). Los datos son el promedio \pm S.E.M. * $p<0.05$.

7.4 La exposición postnatal a VPA reduce la extensión de la onda de calcio

En esta serie experimental se utilizaron cinco camadas para cada grupo experimental. La extensión de la onda en respuesta a un estímulo eléctrico se estimó para el grupo control ($355 \pm 38.80 \mu\text{m}$; $n= 10$; $N=6$) (Figura 7A), la cual se vio reducida en el grupo tratado con VPA en un 34 % [$233 \pm 12.60 \mu\text{m}$; $n=10$; $N=6$; $F_{(10,10)}= 2.86$; $p < 0.01$] (Figura 7B). De igual manera, se investigó si los astrocitos, identificados por la incorporación de Sulforodamina B (SRB), participaban en la onda de calcio. Los resultados mostraron que el 9% de las células reclutadas en la onda de calcio eran SRB+ tanto en el grupo control (5 ± 1 células SRB+; $n=11$; $N=5$) como en el grupo tratado con VPA (3 ± 1 células SRB+; $n=13$; $N=6$) (Figura 7C). Finalmente se cuantificó el número de células reclutadas en la onda de calcio, que fue menor en el grupo tratado con VPA (-36%; 37 ± 10 ; $n= 10$; $N=6$; $p=0.03$) respecto al control (58 ± 6 ; $n= 10$; $N=6$; $p=0.02$) (Figura 7D). Por otra parte, la velocidad de propagación de la onda de calcio no presentó diferencias significativas entre los grupos control ($16 \pm 2 \mu\text{m/s}$; $n=10$; $N=6$) y VPA ($15 \pm 1 \mu\text{m/s}$ $n=10$; $N=6$; $p=0.9$).

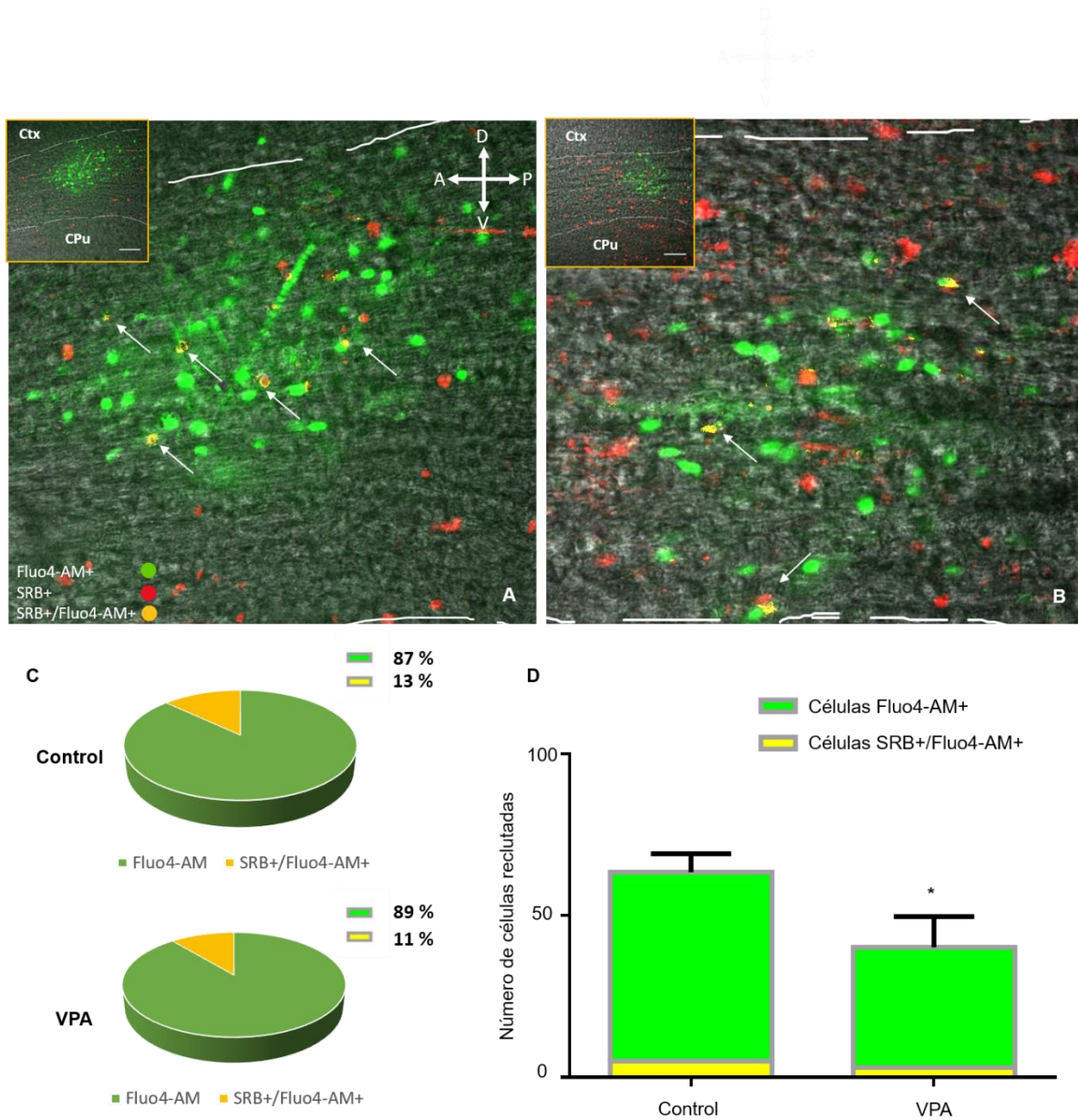


Figura 7. La extensión funcional de la onda de calcio se reduce en el modelo VPA.

(A, B) Imagen representativa de la extensión funcional de la onda de calcio en los grupos control (A) y tratado con VPA. (B) La colocalización de las señales fluorescente que corresponden a SRB (rojo) y Fluo4-AM (verde) se indica en color amarillo. El recuadro superior izquierdo muestra la imagen panorámica que incluye el CC, la barra de calibración indica 100 μ m. La esquina superior derecha indica la localización en el plano de la rebanada.

(C) Porcentaje de co-localización promedio SRB/Fluo4-AM para los grupos control y tratados con VPA.

(D) Promedio de células reclutadas en la onda de calcio y la fracción de células que incorporaron SRB. Los datos son el promedio \pm el error estándar. * indica $p < 0.05$.

7.5 La extensión funcional de la onda de calcio decae linealmente y es independiente de la actividad neuronal

En esta serie experimental se estimó la tasa de decaimiento de la extensión funcional de la onda de calcio con cinco estimulaciones consecutivas en el área del genu, en intervalos de cinco minutos interestímulo. Se confirmó que la extensión de la red glial se reduce significativamente en el grupo tratado con VPA respecto al control (Figura 8A, Tabla 4). Los resultados mostraron un decaimiento lineal tanto para el grupo control ($r = 0.96$; $n=5$ rebanadas, $N= 5$) como para el tratado con VPA ($r = 0.91$; $n=5$ rebanadas, $N= 5$) (Figura 8B). El siguiente objetivo fue determinar si la extensión de la onda de calcio se reducía al bloquear la actividad neuronal con lidocaína. Nuestros resultados mostraron que la extensión de la onda de calcio no se modificaba en presencia de lidocaína tanto en el grupo control como en el grupo tratado con VPA (Figura 8C). Los valores de las pendientes obtenidas para los experimentos sin lidocaína (Control: $- 60.5 \pm 1.67$; VPA: $- 44.3 \pm 4.68$; $p= 0.002$) y con lidocaína [Control: -56.6 ± 2.76 ; VPA: $- 40.7 \pm 4.07$; $F_{(1,16)}= 21.02$; $p= 0.003$] representan la tasa de decaimiento inmediata en función de la cantidad de estímulos (Figura 8D). Las diferencias entre las pendientes mostradas en la figura ilustran un decaimiento generalizado e inmediato durante los cinco estímulos del experimento para los grupos control y VPA.

Tabla 4. La extensión funcional de la red glial y su decaimiento en estímulos despolarizantes consecutivos. Los experimentos se realizaron sin lidocaína o en presencia de este inhibidor de la actividad neuronal.

Estímulo	Extensión control (μm)		Extensión VPA (μm)	
	Sin lidocaína	Con lidocaína	Sin lidocaína	Con lidocaína
1	355 \pm 38.80	333 \pm 29.49	233 \pm 12.60	226 \pm 12.08
2	260 \pm 25.74	253 \pm 13.56	188 \pm 7.34	161 \pm 8.71
3	215 \pm 22.83	211 \pm 10.04	121 \pm 7.14	103 \pm 6.63
4	145 \pm 18.80	137 \pm 9.69	81 \pm 6.78	74 \pm 6.96
5	110 \pm 12.79	108 \pm 7.34	65 \pm 9.74	66 \pm 5.33
pendiente	- 60.5 \pm 1.67	- 56.6 \pm 2.76	- 44.3 \pm 4.68	- 40.7 \pm 4.07
p	0.42		0.59	

En la figura 8A se presentan cuatro imágenes, en dirección hacia la derecha y hacia abajo: Control, VPA, Control + Lidocaína, VPA + Lidocaína. Los resultados obtenidos muestran que no existe un efecto de la lidocaína sobre la extensión de la onda de calcio asociada a células gliales ($p_{\text{Control}} = 0.42$; $p_{\text{VPA}} = 0.59$; $N_{\text{Control}} = 5$, $N_{\text{VPA}} = 5$, $N_{\text{rebanadasControl}} = 5$, $N_{\text{rebanadasVPA}} = 5$).

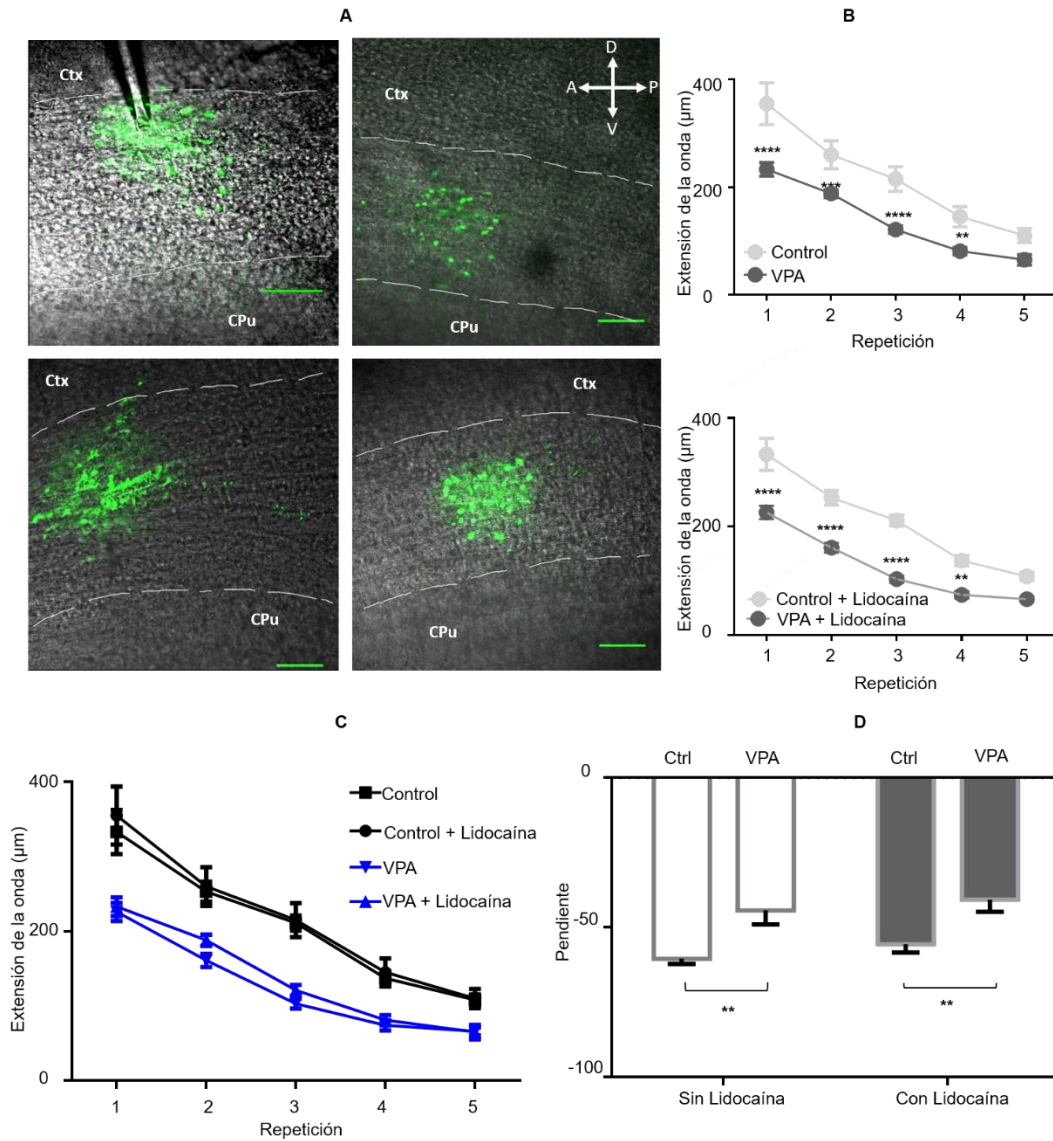


Figura 8. Tasa de decaimiento de la extensión funcional de la onda de calcio.

- (A) Imágenes representativas de la extensión funcional de la onda de calcio para los grupos control y tratado con VPA sin lidocaína y con lidocaína (1mM). Barra de calibración = 100 μm . La esquina superior derecha indica la localización en el plano de la rebanada.
- (B) Gráficas del decaimiento de la extensión funcional de la onda de calcio para los grupos control y VPA sin lidocaína y con lidocaína (1mM). Los valores representan el promedio \pm el error estándar. Los valores indican ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.
- (C) Gráfico comparativo entre los grupos control y VPA, indicando la extensión promedio de la onda de calcio en cada estímulo.
- (D) Tasa de decaimiento de la extensión funcional de la onda de calcio para los grupos control (N=5) y VPA (N=5) sin lidocaína y con lidocaína (control: N=5; VPA: N=5). La tasa de decaimiento se calculó con base en las pendientes de los grupos control y VPA con y sin lidocaína. Las barras indican los valores promedio \pm el error estándar. Los asteriscos indican ** $p < 0.01$.

7.6 La excitabilidad de las células reclutadas en la onda de calcio se incrementa en el grupo tratado con VPA.

La excitabilidad de las células gliales se determinó con base en la estimación del área bajo la curva de los transitorios de calcio intracelular de las células reclutadas en la onda de calcio. Los resultados mostraron que la excitabilidad promedio se incrementó 230% en el grupo tratado con VPA [315,744 ± 38105 u.a.; n= 788; N= 16; $F_{(7,7)}= 50.14$; $p < 0.001$] respecto al control (136,561 ± 17,329 u.a.; n= 801; N= 13) (Figura 9A, 9B). También se estimó la excitabilidad de las células reclutadas en función de la distancia del estímulo. Los resultados mostraron un aumento significativo en la excitabilidad a 150 µm [Control: 201,362 ± 35,227 u.a.; VPA: 494,248 ± 64649 u.a.; $F_{(4,4)}= 1.455$; $p= 0.04$] y a 200 µm [Control: 134,142 ± 40,990 u.a.; VPA: 497,013 ± 53515 u.a.; $F_{(4,4)}= 2.680$; $p= 0.02$] de distancia (Figura 9C, 9D). Por último, se cuantificó el número de células reclutadas en función del origen del estímulo, en intervalos de 50 µm, encontrando diferencias en el número de células reclutadas a 100 µm [Control: 14 ± 1.14 células; VPA: 9.8 ± 1.06 células; $F_{(4,4)}= 1.140$; $p= 0.02$]; 150 µm [Control: 19 ± 1.5 células; VPA: 8.6 ± 0.81 células; $F_{(4,4)}= 3.485$; $p= 0.0003$]; 250 µm [Control: 6.2 ± 0.8 células; VPA: 3.8 ± 0.66 células; $F_{(4,4)}= 1.455$; $p= 0.04$]; 300 µm [Control: 5.8 ± 1.15 células; VPA: 2 ± 0.7 células; $F_{(4,4)}= 2.680$; $p= 0.02$] (Figura 9E).

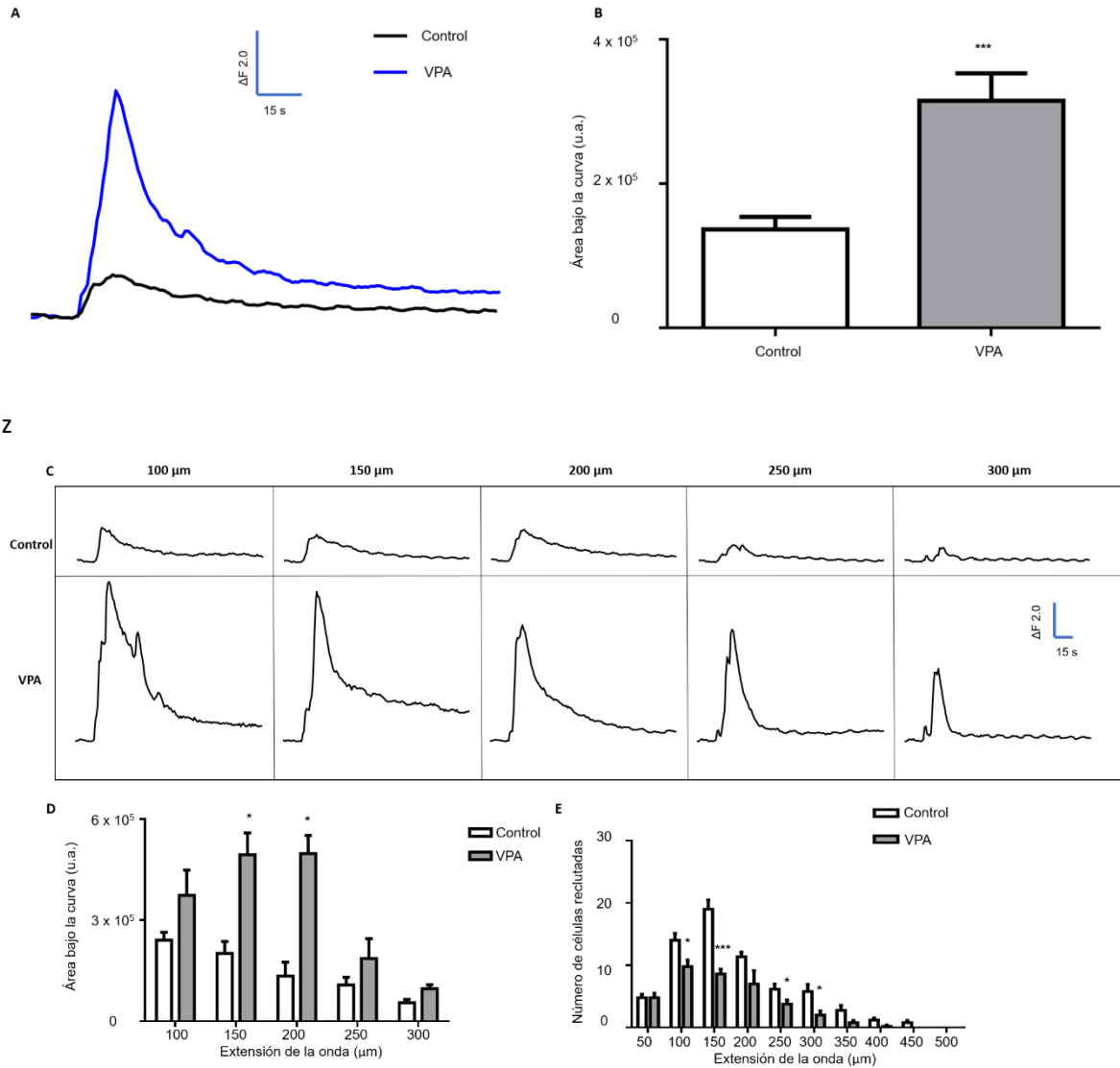


Figura 9. La respuesta celular promedio aumenta en el grupo VPA

- (A) Trazo promedio normalizado representativo para los grupos control y tratados con VPA (Número de capas:4, Rebanadas Control:13; Rebanadas VPA: 16).
- (B) Área bajo la curva promedio en unidades arbitrarias (u.a.) para los grupos control y tratado con VPA. Los valores representan el promedio \pm el error estándar. Los asteriscos indican *** $p < 0.001$.
- (C) Trazos promedios normalizados representativos para la respuesta celular promedio a diferentes distancias de los grupos control y tratados con VPA.
- (D) Área bajo la curva promedio en función de la distancia desde el punto del estímulo para los grupos control y tratado con VPA. Los valores representan el promedio \pm el error estándar. Los asteriscos indican * $p < 0.05$.
- (E) Número de células reclutadas por la onda de calcio evocada en función de la distancia desde el punto de estímulo para los grupos control y tratado con VPA. Los valores representan el promedio \pm el error estándar. Los asteriscos indican * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

8 DISCUSIÓN

En el presente trabajo nos hemos centrado en el estudio de la administración de VPÄ postnatal en rata y su efecto en la replicación de las características sensoriomotoras asociadas al TEA en este modelo murino, además de investigar los posibles efectos del VPA postnatal en la magnitud del transiente de calcio y la extensión funcional de la red glial.

8.1 Déficit sensoriomotores por exposición postnatal al VPA

No se reportó alteración en la ganancia de peso de las crías expuestas a la administración de VPA postnatal entre los días P2 a P8. Existen diversos trabajos previos donde la concentración administrada de VPA es variable en un modelo de rata: 500 mg/kg (Favre et al., 2013), 600 mg/kg (Schneider & Przewłocki, 2005; Wagner et al., 2006) y 300 mg/kg (Lee et al., 2016) para un modelo prenatal, mientras que para un modelo postnatal se han trabajado con concentraciones de 400 mg/kg (Wagner et al., 2006) y 300 mg/kg (Lee et al., 2016); este último resulta ser un modelo adecuado para la comparación de nuestros resultados ya que los periodos de exposición y los periodos de exposición al fármaco son similares. Además de la concentración, la ventana de tiempo para la administración de VPA es crítica para observar los efectos conductuales y motores en un modelo murino similar al TEA; al parecer, esta ventana se encuentra entre los días embrionarios E11 a E12.5 en los roedores (Ingram, et al., 2000; Kim et al., 2011), ya que para el diagnóstico de estos trastornos del neurodesarrollo solo se evalúan cambios en la sociabilidad y la motricidad. Existe un antecedente que refiere a la alteración de la ganancia de peso en un modelo postnatal de rata (Wagner et al., 2006), sin embargo la administración se realiza únicamente en el día P14. En la gran mayoría de modelos prenatales, la cuantificación del peso corporal arroja diferencias entre los controles y el modelo VPA, se observa principalmente un aletargamiento y un mayor tiempo de respuesta en las crías, por lo que se vuelven menos competitivos por la comida y son fácilmente desplazados por otras crías, lo que se traduce en una menor ganancia de peso.

En cuanto a la prueba de reflejo de enderezamiento, se encontraron afectaciones posiblemente adjudicadas a la administración postnatal de VPA en el día P5, sin embargo en los días posteriores no se observó efecto alguno; lo que sugiere que a pesar de que hay un ligero retardo en esta habilidad motriz, se compensa rápidamente, ya que no existen diferencias en los días posteriores (Kazlauskas., 2016). La variación en los tiempos de latencia de enderezamiento en los primeros 3 días de la prueba puede explicarse como un fenómeno de resistencia a la dosis de VPA administrada. Algunas crías tendrán mayor capacidad de tolerancia al fármaco que podría estar en función de la relación entre la ingesta de alimento y la ganancia de peso. Los fenómenos de proliferación y diferenciación celular en el CC también pueden ser responsables de estas diferencias (Sturrock, 1976), ya que posterior al día P5, las latencias de enderezamiento entre las crías controles y las administradas con VPA se homogeneizan. A pesar de que el desarrollo del CC de rata no ha finalizado en los primeros 5 días postnatales, los fenómenos proliferativos más importantes ya han ocurrido, además que el número de axones se ha aumentado de 4.5 millones en P0 hasta 11.5 millones en P5, y este número se mantendrá hasta la edad adulta (Gravel et al., 1990).

En la latencia de reconocimiento del nido, la administración de VPA tuvo un efecto significativo en el día P8, sin embargo, no se evaluaron otros periodos para identificar anomalías. En otros trabajos se evaluó este parámetro en los días P9, P10 y P11, con el fin de determinar si existía alguna anomalía y si esta se corregía en los días consecuentes. Para el día P9, se encontró un retraso en las crías administradas con VPA, con una recuperación en los días P10 y P11 en ratas (Schneider & Przewlocki, 2005) y hasta el día P11 en ratones (Roullet et al., 2010). Para la edad postnatal en la que se midió este parámetro en el presente trabajo, puede ser un indicador sobre lo que sucede en días posteriores; aproximadamente en el día P12 comienza la mielinización de los axones del CC, lo que genera una mejor comunicación entre los hemisferios cerebrales, que podría propiciar una “corrección” en las alteraciones motoras de los animales (Bjartmar et al., 1994) . La principal justificación de esta prueba refiere a la interacción social. Recordemos que, en los roedores, el olfato es el sentido más importante y utilizado para la

discriminación de olores, del peligro, reproducción, entre otros; por lo tanto, una afectación en este sentido implicaría problemas de interacción con otros de su especie. Este rasgo es característico de los niños diagnosticados con TEA, al presentar un déficit de interacción social. Se ha reportado un mecanismo entre la olfacción y el TEA. Se encontró que los infantes diagnosticados previamente con TEA, realizan una aspiración odorífica más larga que los controles, además que ante un estímulo oloroso no placentero, no modifican el tiempo ni la fuerza de aspiración, caso contrario a los controles (Rozenkrantz et al., 2015).

8.2 La exposición postnatal al VPA disminuye la extensión funcional de la red glial.

Los resultados de las mediciones para la extensión de la onda de calcio asociada a células gliales muestran una clara disminución debido a la administración postnatal de VPA, sin embargo, el área bajo la curva es mayor en el grupo VPA. Se puede aseverar que la onda de calcio evocada es propia de células gliales, ya que al trabajar en sustancia blanca en las edades postnatales P7-P11, el porcentaje de cuerpos neuronales es menor al 1% (Sturrock, 1976). Los transitorios de calcio intracelular en las células gliales pueden propagarse a células vecinas a través de las uniones comunicantes tipo gap o bien por la liberación de ATP (Fam et al., 2018; Giaume & Venance, 1998). Estudios previos en el CC mostraron que la propagación de la onda de calcio requiere la activación de receptores purinérgicos tipo P2Y (Schipke et al., 2002); mientras que la suramina (un antagonista de receptores purinérgicos) demostró antagonizar la propagación de la onda de calcio durante el desarrollo embrionario cortical (Weissman et al., 2004). Nuestros resultados mostraron que la extensión funcional de la onda de calcio se reduce 34% en el grupo VPA respecto al control, por lo que la disminución en la extensión funcional de la onda de calcio observada en el genu del CC podría reflejar una deficiencia en la transmisión purinérgica. El VPA puede modificar la expresión de receptores a neurotransmisores (Brill et al., 2006), por lo que la expresión de receptores purinérgicos P2Y o de las ectonucleotidasas, enzimas que degradan el ATP podría estar alterada (Weissman et al., 2004). Por otra parte, la expresión de GFAP se

reduce por la administración de VPA, lo que reduce la densidad de los astrocitos (Kim et al., 2007). Nuestros datos sobre la extensión funcional de la red glial revelaron que el porcentaje de astrocitos reclutados no se modifica, sin embargo, el número total de células reclutadas se reduce en el grupo VPA, lo que indica que la administración de VPA reduciría la proliferación celular de los glioblastos del cuerpo calloso o bien la eficiencia de señalización de la red glial estaría disminuida.

Referente a la velocidad de propagación de la onda de calcio se reportaron valores de $15.79 \pm 2.24 \mu\text{m/s}$ para los controles, y para el grupo VPA fue de $15.49 \pm 1.18 \mu\text{m/s}$. Schipke y colaboradores (2002) reportan la velocidad de propagación en cuerpo calloso en $13.9 \pm 1.8 \mu\text{m/s}$ (Apéndice III). Al comparar los experimentos no se observa un cambio aparente en la velocidad de propagación, por lo que se presume que no está modificada por la administración postnatal de VPA.

El número de células reclutadas por la onda de calcio disminuyó significativamente en el modelo VPA (Figura 7), lo que es consistente con una menor extensión de la onda de calcio, esto puede atribuirse a una afectación en los mecanismos de liberación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el CC. Dicho lo anterior, podríamos sugerir una alteración en proliferación celular normal de los glioblastos se redujo por acción del VPA, o que la extensión funcional de la red glial es menor porque el mecanismo de señalización purinérgico está alterado; recordemos que las ondas de calcio evocadas y asociadas a astrocitos tienen 3 componentes principales: un incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células estimuladas, una rápida propagación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las regiones proximales al estímulo mediada por uniones gap, y una lenta propagación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las regiones más distales, esta mediada por ATP extracelular (Fujii et al., 2017); sin embargo en el CC las uniones gap no tienen participación con la liberación de calcio al espacio extracelular (Schipke et al., 2002), por lo que el VPA puede estar interviniendo en la señalización purinérgica, principalmente el receptor P2Y. Este receptor tiene al menos 8 subtipos conocidos. En experimentos previos utilizando análogos de ATP como Adenosín Difosfato (ADP), cloroadenosín trifosfato (2Cl-ATP) y agonistas como adenosín y guanósín trifosfato (GTP) estos demostraron tener respuestas agonistas y antagonistas, respectivamente, además de estar

ligadas al receptor 1 del receptor metabotrópico (P2Y₁R) (Ralevic & Burnstock, 1998; Weissman et al., 2004).

En cuanto a la identidad celular de la onda de calcio asociada a células gliales, se utilizó el marcador Sulforodamina B (SRB), que se ha propuesto como una molécula que marca astrocitos (Appaix et al., 2012; Nimmerjahn et al., 2004; Vérant et al., 2008). No se encontraron diferencias significativas entre la contribución de astrocitos a la onda evocada por despolarización (Figura 7A); se conoce que la astrocitogénesis es el proceso celular que más ocurrencia tiene a P4 (Ganat et al., 2006; Levison & Goldman, 1993), por lo que se puede presumir que la administración de VPA postnatal no altera los procesos de diferenciación de astrocitos, a diferencia de los trabajos de Lee y colaboradores (2016), quienes observaron una mayor proliferación de precursores de astrocitos en la corteza frontal mediante la administración postnatal de VPA. El porcentaje de astrocitos obtenido en este trabajo (~11 %) es similar al estimado previamente por estudios de inmunofluorescencia (P6, 15%) en el CC (Reyes-Haro et al., 2013). Algunos autores contrastan en la opinión sobre la acción de la SRB en astrocitos; aseveran que existen otros tipos gliales como oligodendrocitos que también incorporan sulforodamina en sus variantes (B, 101), por lo que se asumiría que no es un marcador específico para astrocitos, y que los oligodendrocitos también lo incorporan, posiblemente mediante transportadores de aniones orgánicos (OATP) (Hagos & Hülsmann, 2016), o mediante sus uniones comunicantes con los astrocitos, que si bien en el CC no participan en la liberación de $[Ca^{+2}]_i$ (Schipke et al., 2002), podrían mediar este mecanismo para la difusión y marcaje de oligodendrocitos con SRB. Esto tiene sentido y se puede corroborar con el bajo porcentaje de colocalización (Figura 7C, 7D), ya que la población más abundante en el CC son los oligodendrocitos (Sturrock, 1976). En el modelo del presente estudio no se encontró una diferencia significativa en el número de astrocitos (marcados con SRB) por la administración postnatal de VPA (Control: 119 ± 18 células; VPA: 161 ± 31 células), además que este resultado tampoco indica si hay mayor proliferación debido a que no se usó un marcador específico para este fin, como el 2-bromo deoxiuridina (BrdU).

8.3 La lidocaína no afecta la extensión de la onda de calcio.

La lidocaína es un anestésico local que difunde rápidamente en los tractos axonales, bloqueando los canales de Na^+ , lo que resulta en la inhibición del potencial de acción (Ellfolk & Hultsch, 2014). Las células gliales no producen potenciales de acción por lo que la acción de la lidocaína se restringe a inhibir la actividad neuronal. La extensión funcional de la red glial del CC se estimó al despolarizar el CC y evocar una onda de calcio. La lidocaína se utilizó para determinar si la onda de calcio evocada dependía de la actividad neuronal o no. Los resultados mostraron que la onda de calcio evocada es independiente de la actividad neuronal pues la lidocaína no modificó su extensión. En apoyo a estos resultados, estudios previos también reportaron que la tetrodotoxina (bloqueador selectivo de canales de sodio) tampoco inhiben las ondas de calcio evocadas por despolarización lo que indica que esta respuesta es independiente de la actividad neuronal (Schipke et al., 2002). A pesar de que los astrocitos expresan canales de Na^+ , su número es insuficiente para generar respuestas eléctricas como potenciales de acción, y muestran respuestas pasivas debido a las concentraciones de K^+ extracelular por efecto de la actividad neuronal (Perea & Araque, 2003), por lo que su uso no compromete la excitabilidad de los astrocitos.

El uso de fármacos inhibidores y bloqueadores de transportadores y/o receptores podría brindar más información sobre la excitabilidad mediada por calcio en la glía del CC.

8.4 Relación entre la extensión de la onda de calcio y el transiente de calcio en el CC

Es conocido que las diferentes poblaciones de astrocitos en el SNC poseen diversos mecanismos de comunicación, dependiendo principalmente de su localización y la expresión de receptores y/o transportadores (Haas et al., 2006; Israel et al., 2003). En este trabajo, se observó una disminución del número de células reclutadas por la onda de calcio en el modelo VPA (-34 %), además de una menor extensión de esta (35 %); en contraste, el área bajo la curva del transiente de calcio se incrementó (57 %) significativamente en el grupo VPA. Se han reportado disminuciones en

volumen y tamaño del cerebro durante la administración prenatal de VPA en diferentes zonas del circuito cerebro-cerebelar (Spisák et al., 2019), además que la administración prenatal de VPA retrasa el desarrollo del “switch” excitatorio/inhibitorio de GABA durante el desarrollo embrionario y los primeros días de vida de las crías provenientes de madres inyectadas con VPA (Roux et al., 2018). Este desbalance también se ha observado en astrocitos, donde la administración de VPA modula el balance excitatorio/inhibitorio a través de la regulación de los niveles de ARN mensajero (mRNA) de moléculas de adhesión en células post sinápticas (neuroigina-1 y neuregulina-1) (Wang et al., 2012). Conociendo lo anterior, podemos establecer una relación entre la administración de VPA postnatal y el incremento de los transientes; ya que el fenómeno del retraso en el balance excitatorio/inhibitorio de GABA en los astrocitos podría indicar una mayor presencia de glutamato y/o GABA en los primeros días postnatales, que a su vez incrementa los niveles de Ca^{+2} citosólicos y al ser liberados por la estimulación eléctrica mediante la onda de calcio se traducen en un incremento de la magnitud del transiente de calcio en los astrocitos del CC.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que existe un efecto directo de la administración del VPA postnatal en ratas y algunas alteraciones sensoriomotoras como el reflejo de enderezamiento, que son similares a los reportados anteriormente (Schneider & Przewłocki, 2005). Otras observaciones como la nula participación del componente neuronal en la dinámica de $[Ca^{+2}]_i$ fueron comparados con resultados previos (Schipke et al., 2002) demostrando similitudes. La importancia de nuestro trabajo se encuentra en la disminución en la extensión de la onda de calcio evocada por despolarización en el CC así como el número de células reclutadas por la onda de calcio, que contrasta con un incremento en la magnitud del transiente de calcio. Esto, aunado a que no existe un aumento en la extensión de la red glial causado por la administración del VPA comparado con modelos en la misma edad postnatal sin fármaco (Reyes-Haro et al., 2013) nos genera nuevas preguntas sobre la participación de la astroglía dentro de la dinámica de calcio, así como una posible contribución de la oligodendroglía y la alteración de los receptores/transportadores de GABA en el modelo tratado con VPA.

9 CONCLUSIONES

- Las latencias de enderezamiento y reconocimiento del nido se incrementan en el grupo tratado con VPA respecto al control; mientras que la ganancia de peso corporal no se modifica.
- La onda de calcio evocada por despolarización en el CC es independiente de la actividad neuronal y el 9% de las células reclutadas son astrocitos.
- La extensión de la onda de calcio y el número de células reclutadas en el CC se reducen (34 % y 36 %) en el grupo tratado con VPA respecto al control.
- El transiente de calcio promedio por despolarización en el CC es mayor en el grupo tratado con VPA respecto al control (~ 57 %).

10 PRESPECTIVAS

- Determinar si la administración de fármacos bloqueadores de transportadores de GABA afectan la extensión de la onda de calcio asociada a células gliales y la frecuencia de oscilaciones espontáneas en el CC.
- Investigar el papel de los receptores GABA-A implicados en la extensión de la onda de calcio asociada a células gliales, así como la frecuencia de oscilaciones espontáneas en el CC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aboitiz, F., & Montiel, J. (2003). One hundred million years of interhemispheric communication: The history of the corpus callosum. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol. 36, pp. 409–420. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000400002>
2. Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image processing with imageJ. *Biophotonics International*. <https://doi.org/10.1201/9781420005615.ax4>
3. Akhtar, M. W., Raingo, J., Nelson, E. D., Montgomery, R. L., Olson, E. N., Kavalali, E. T., & Monteggia, L. M. (2009). Histone Deacetylases 1 and 2 Form a Developmental Switch That Controls Excitatory Synapse Maturation and Function. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0097-09.2009>
4. Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia — more than just brain glue. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/457675a>
5. Amaral, D. G., Schumann, C. M., & Nordahl, C. W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends in Neurosciences*, Vol. 31, pp. 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.12.005>
6. Antunez, L. L. (1979). *Anatomía funcional del sistema nervioso*. Editorial Limusa SA De CV.
7. 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*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035169>
8. Asconapé, J. J., Penry, J. K., Dreifuss, F. E., Riela, A., & Mirza, W. (1993). Valproate-Associated Pancreatitis. *Epilepsia*. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1993.tb02395.x>
9. Balasubramaniyan, V., Boddeke, E., Bakels, R., Küst, B., Kooistra, S., Veneman, A., & Copray, S. (2006). Effects of histone deacetylation inhibition on neuronal differentiation of embryonic mouse neural stem cells. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.082>

10. Bergles, D. E., & Jahr, C. E. (1997). Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80420-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80420-1)
11. Berry, M., Ibrahim, M., Carlile, J., Ruge, F., Duncan, A., & Butt, A. M. (1995). Axon-glia relationships in the anterior medullary velum of the adult rat. *Journal of Neurocytology*. <https://doi.org/10.1007/BF01215646>
12. Bezprozvanny, I. (2005). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*, Vol. 38, pp. 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.030>
13. Bjartmar, C., Hildebrand, C., & Loinder, K. (1994). Morphological heterogeneity of rat oligodendrocytes: Oligodendrocytes: Electron microscopic studies on serial sections. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.440110304>
14. Blay-Beltrán, J., E., C., Fernández-Ruiz, C. P., García-Martínez, E., Jiménez-Restrepo, D. H., & Poyatos-Ruipérez, C. (2012). La encrucijada: historia del cuerpo calloso (U. de Valencia, Ed.). *Sociedad Española de Radiología Médica*. SERAM 2012.
15. Bogdanik, L., & Lutz, C. (2011). *Behavioral Phenotyping for neonates: Righting reflex*.
16. Brill, J., Lee, M., Zhao, S., Fernald, R. D., & Huguenard, J. R. (2006). Chronic valproic acid treatment triggers increased neuropeptide Y expression and signaling in rat nucleus reticularis thalami. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5320-05.2006>
17. Butt, A. M., Ibrahim, M., & Berry, M. (1998). Axon-myelin sheath relations of oligodendrocyte unit phenotypes in the adult rat anterior medullary velum. *Journal of Neurocytology*. <https://doi.org/10.1023/A:1006984915230>
18. Charles, A. (1998). Intercellular calcium waves in glia. *GLIA*. [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)
19. Chomiak, T., Turner, N., & Hu, B. (2013). What We Have Learned about Autism Spectrum Disorder from Valproic Acid. *Pathology Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/712758>

20. Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., & Smith, S. J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: Long-range glial signaling. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1967852>
21. De Castro, P., Aranguren, A., Arteche, E., & Otano, M. (2009). Deterioro cognitivo en la esclerosis múltiple. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 25(2), 167–178. Retrieved from <http://arsenopirita.boumort.cesca.cat/index.php/ASSN/article/view/5790>
22. DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, L., & Arellano, J. I. (2002). Microstructure of the neocortex: Comparative aspects. *Journal of Neurocytology*. <https://doi.org/10.1023/A:1024130211265>
23. Dimou, L., Simon, C., Kirchhoff, F., Takebayashi, H., & Gotz, M. (2008). Progeny of Olig2-Expressing Progenitors in the Gray and White Matter of the Adult Mouse Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2831-08.2008>
24. Dreifuss, F. E., Santilli, N., Langer, D. H., Sweeney, K. P., Moline, K. A., & Menander, K. B. (1987). Valproic acid hepatic fatalities: A retrospective review. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/wnl.37.3.379>
25. Dupont, G. (2014). Modeling the intracellular organization of calcium signaling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1261>
26. Ellfolk, M., & Hultzsch, S. (2014). Analgesics, antiphlogistics and anesthetics. In *Drugs During Pregnancy and Lactation: Treatment Options and Risk Assessment: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408078-2.00026-3>
27. Eymard, P., Simiand, J., Teoule, R., Polverelli, M., Werbenec, J. P., & Broil, M. (1971). Etude de la repartition et de la resorption du dipropylacetate de sodium marque au ^{14}C chez le rat. *J Pharmacol (Paris)*, 2, 359–368.
28. Fam, S. R., Gallagher, C. J., & Salter, M. W. (2018). P2Y₁ Purinoceptor-Mediated Ca²⁺ Signaling and Ca²⁺ Wave Propagation in Dorsal Spinal Cord Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-08-02800.2000>

29. 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*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00088>
30. Francis, M., Qian, X., Charbel, C., Ledoux, J., Parker, J. C., & Taylor, M. S. (2012). Automated region of interest analysis of dynamic Ca²⁺ signals in image sequences. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00016.2012>
31. 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). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13243-0>
32. 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*. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.05.002>
33. Ganat, Y. M., Silbereis, J., Cave, C., Ngu, H., Anderson, G. M., Ohkubo, Y., ... Vaccarino, F. M. (2006). Early Postnatal Astroglial Cells Produce Multilineage Precursors and Neural Stem Cells In Vivo. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2532-06.2006>
34. Gehrmann, J., Matsumoto, Y., & Kreutzberg, G. W. (1995). Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Research Reviews*, 20(3), 269–287.
35. Genton, P. (2005). Progress in pharmaceutical development presentation with improved pharmacokinetics: A new formulation for valproate. *Acta Neurologica Scandinavica, Supplement*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2005.00524.x>
36. Giaume, C., & Venance, L. (1998). Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *GLIA*. <https://doi.org/10.1007/s00417-006-0441-0>
37. Go, H. S., Kim, K. C., Choi, C. S., Jeon, S. J., Kwon, K. J., Han, S. H., ...

- Shin, C. Y. (2012). Prenatal exposure to valproic acid increases the neural progenitor cell pool and induces macrocephaly in rat brain via a mechanism involving the GSK-3 β / β -catenin pathway. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.028>
- 38.** Goldstein, A., & Mesfin, F. B. (2017). Neuroanatomy, Corpus Callosum. In *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846239>
- 39.** Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krömer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., ... Heinzel, T. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO Journal*, *20*(24), 6969–6978. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969>
- 40.** Gravel, C., Sasseville, R., & Hawkes, R. (1990a). Maturation of the corpus callosum of the rat: II. Influence of thyroid hormones on the number and maturation of axons. *Journal of Comparative Neurology*, *291*(1), 147–161. <https://doi.org/10.1002/cne.902910110>
- 41.** Gravel, C., Sasseville, R., & Hawkes, R. (1990b). Maturation of the corpus callosum of the rat: II. Influence of thyroid hormones on the number and maturation of axons. *Journal of Comparative Neurology*, *291*(1), 147–161. <https://doi.org/10.1002/cne.902910110>
- 42.** 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*. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi101>
- 43.** 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*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.08.010>
- 44.** Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., & Haydon, P. G. (2007). Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1419-07.2007>
- 45.** Hamilton, S. L. (2005). Ryanodine receptors. *Cell Calcium*, Vol. 38, pp. 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.037>

46. Hillman, H., & Hillman, H. (2012). The Fine Structure of the Nervous System. In *The Cellular Structure of the Mammalian Nervous System*. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4922-5_10
47. Hofer, S., & Frahm, J. (2006). Topography of the human corpus callosum revisited-Comprehensive fiber tractography using diffusion tensor magnetic resonance imaging. *NeuroImage*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.05.044>
48. Hsieh, J., & Gage, F. H. (2005). Chromatin remodeling in neural development and plasticity. *Current Opinion in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.09.002>
49. Huang, H.-S., Matevosian, A., Whittle, C., Kim, S. Y., Schumacher, A., Baker, S. P., & Akbarian, S. (2007). Prefrontal Dysfunction in Schizophrenia Involves Mixed-Lineage Leukemia 1-Regulated Histone Methylation at GABAergic Gene Promoters. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3272-07.2007>
50. Ingram, J. L., Peckham, S. M., Tisdale, B., & Rodier, P. M. (2000). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicology and Teratology*. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00083-5)
51. Innocenti, G M. (1994). Some new trends in the study of the corpus callosum. *Behavioural Brain Research*, 64(1–2), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90113-9](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90113-9)
52. Innocenti, Giorgio M. (1986). General Organization of Callosal Connections in the Cerebral Cortex. In *Sensory-Motor Areas and Aspects of Cortical Connectivity. Cerebral Cortex*. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2149-1_9
53. Israel, J. M., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Theodosis, D. T., & Kettenmann, H. (2003). GABAA Receptor-Expressing Astrocytes in the Supraoptic Nucleus Lack Glutamate Uptake and Receptor Currents. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.10272>
54. Jea, A., Vachhrajani, S., Widjaja, E., Nilsson, D., Raybaud, C., Shroff, M., & Rutka, J. T. (2008). Corpus callosotomy in children and the disconnection

- syndromes: A review. *Child's Nervous System*.
<https://doi.org/10.1007/s00381-008-0626-4>
55. Jeng, J. M. (2002). Ricardo Miledi and the calcium hypothesis of neurotransmitter release. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(1), 71–76.
<https://doi.org/10.1038/nrn706>
56. Jovanov-Milosevic, N. (2009). Growth of the human corpus callosum: modular and laminar morphogenetic zones. *Frontiers in Neuroanatomy*.
<https://doi.org/10.3389/neuro.05.006.2009>
57. 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*.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.06.001>
58. Kim, H. J., Rowe, M., Ren, M., Hong, J.-S., Chen, P.-S., & Chuang, D.-M. (2007). Histone Deacetylase Inhibitors Exhibit Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects in a Rat Permanent Ischemic Model of Stroke: Multiple Mechanisms of Action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.120188>
59. Kim, K. C., Kim, P., Go, H. S., Choi, C. S., Yang, S. II, Cheong, J. H., ... Ko, K. H. (2011). The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. *Toxicology Letters*.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.018>
60. Kimelberg, H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry International*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.08.015>
61. Kimelberg, H. K. (2010). Functions of mature mammalian astrocytes: A current view. *Neuroscientist*. <https://doi.org/10.1177/1073858409342593>
62. Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., & Inoue, K. (2003). Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), 11023–11028.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1834448100>
63. Kolozsi, E., Mackenzie, R. N., Rouillet, 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*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.021>
64. 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>
65. Lenz, K. M., Nugent, B. M., Haliyur, R., & McCarthy, M. M. (2013). Microglia Are Essential to Masculinization of Brain and Behavior. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1268-12.2013>
66. Levison, S. W., & Goldman, J. E. (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90311-E](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90311-E)
67. Löscher, W. (1999). Valproate: A reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Progress in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00075-6)
68. Loscher, W., & Esenwein, H. (1978). Pharmacokinetics of sodium valproate in dog and mouse. *Arzneimittelforschung*, 28(5), 782–787. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/373773>
69. Ludwin, S. K. (1984). The function of perineuronal satellite oligodendrocytes: an immunohistochemical study. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1984.tb00345.x>
70. Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., & Götz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*.
71. Miller, R., & Raff, M. (2018). Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *The Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.04-02-00585.1984>
72. Nalivaeva, N. N., Belyaev, N. D., & Turner, A. J. (2009). Sodium valproate: an old drug with new roles. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(10), 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.07.002>

73. Nedergaard, M. (1994). Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science*, 263(5154), 1768–1771. <https://doi.org/10.1126/science.8134839>
74. 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*. <https://doi.org/10.1038/nmeth706>
75. Nishiyama, A., Chang, A., & Trapp, B. D. (1999). NG2+ glial cells: A novel glial cell population in the adult brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1097/00005072-199911000-00001>
76. Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., & Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): Multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2495>
77. Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H. C., Wang, F., ... Nedergaard, M. (2009). Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>
78. Ojemann, J. G. (2008). Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp.s1-13.51.273-a>
79. Oliet, S. H. R., Piet, R., & Poulain, D. A. (2001). Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1059162>
80. Ornoy, A. (2009). Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? *Reproductive Toxicology*, Vol. 28, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.02.014>
81. Owens, D. F., & Kriegstein, A. R. (1998). Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*.
82. Pannasch, U., & Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: From synapse to behavior. *Trends in Neurosciences*,

- Vol. 36, pp. 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>
- 83.** Parpura, V., & Haydon, P. G. (2009). Astrocytes in (patho)physiology of the nervous system. In *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-79492-1>
- 84.** Parpura, V., & Zorec, R. (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Reviews*, Vol. 63, pp. 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.008>
- 85.** Payne, B. R. (1994). Neuronal interactions in cat visual cortex mediated by the corpus callosum. *Behavioural Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90118-X)
- 86.** Pekny, M., & Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013>
- 87.** Perea, G., & Araque, A. (2003). Nuevas vías de información en el sistema nervioso: Comunicación entre astrocitos y neuronas. *Revista de Neurología*.
- 88.** Peterson, G. M., & Naunton, M. (2005). Valproate: A simple chemical with so much to offer. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, Vol. 30, pp. 417–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2005.00671.x>
- 89.** Piel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., & Klein, P. S. (2001). Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101287200>
- 90.** Quijada, C. (2008). Espectro autista. *Revista Chilena de Pediatría*, 79, 86–91.
- 91.** Quintero-Gallego, E., Manaut, E., Rodríguez, E., Pérez-Santamaría, J., & Gómez, C. M. (2003). Desarrollo diferencial del cuerpo calloso en relación con el hemisferio cerebral. *Revista Española de Neuropsicología*, 5(1), 49–64.
- 92.** Rakic, P., & Yakovlev, P. I. (1968). Development of the corpus callosum and cavum septi in man. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.901320103>

93. Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*.
94. Reyes-Haro, D., Mora-Loyola, E., Soria-Ortiz, B., & García-Colunga, J. (2013). Regional density of glial cells in the rat corpus callosum. *Biological Research*, Vol. 46, pp. 27–32. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000100004>
95. Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
96. Rogel-Ortiz, F. J. (2005). Autismo. *Gaceta Médica de México*, 141(2), 143–147.
97. Roulet, F. I., Wollaston, L., deCatanzaro, D., & Foster, J. A. (2010). Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.069>
98. Roux, S., Lohof, A., Ben-Ari, Y., Poulain, B., & Bossu, J. L. (2018). Maturation of GABAergic transmission in cerebellar purkinje cells is sex dependent and altered in the valproate model of autism. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00232>
99. Rozenkrantz, L., Zachor, D., Heller, I., Plotkin, A., Weissbrod, A., Snitz, K., ... Sobel, N. (2015). A Mechanistic Link between Olfaction and Autism Spectrum Disorder. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.048>
100. Schipke, C. G., Boucsein, C., Ohlemeyer, C., Kirchhoff, F., & Kettenmann, H. (2002). Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0514fje>
101. Schneider, T., & Przewlocki, R. (2005). Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>

- 102.** Schobben, F., van der Kleijn, E., & Gabreëls, F. J. M. (1975). Pharmacokinetics of di-n-propylacetate in epileptic patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 8(2), 97–105. <https://doi.org/10.1007/BF00561557>
- 103.** Scolding, N. J. (2010). Oligodendrocytes and disease: Repair, remyelination and stem cells. In *The Biology of Oligodendrocytes* (pp. 137–153). <https://doi.org/10.1017/CBO9780511782121.008>
- 104.** Simons, M., & Trajkovic, K. (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.03242>
- 105.** Spisák, T., Román, V., Papp, E., Kedves, R., Sághy, K., Csölle, C. K., ... Czurkó, A. (2019). Purkinje cell number-correlated cerebrocerebellar circuit anomaly in the valproate model of autism. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45667-1>
- 106.** Sturrock, R. R. (1976). Light microscopic identification of immature glial cells in semithin sections of the developing mouse corpus callosum. *Journal of Anatomy*, 122(Pt 3), 521.
- 107.** Tabata, H. (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00114>
- 108.** Takano, T., Tian, G. F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., & Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn1623>
- 109.** Tomson, T., Battino, D., Bonizzoni, E., Craig, J., Lindhout, D., Sabers, A., ... Vajda, F. (2011). Dose-dependent risk of malformations with antiepileptic drugs: An analysis of data from the EURAP epilepsy and pregnancy registry. *The Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70107-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70107-7)
- 110.** Toth, A. B., Shum, A. K., & Prakriya, M. (2016). Regulation of neurogenesis by calcium signaling. *Cell Calcium*, Vol. 59, pp. 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.02.011>

111. Tsuji, A. (2005). Small molecular drug transfer across the blood-brain barrier via carrier-mediated transport systems. *NeuroRx*. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.54>
112. Utoguchi, N., & Audus, K. L. (2000). Carrier-mediated transport of valproic acid in BeWo cells, a human trophoblast cell line. *International Journal of Pharmaceutics*. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00398-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00398-1)
113. Uwechue, N. M., Marx, M. C., Chevy, Q., & Billups, B. (2012). Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.226605>
114. Valentino, K. L., & Jones, E. G. (1982). The early formation of the corpus callosum: a light and electron microscopic study in foetal and neonatal rats. *Journal of Neurocytology*, 11(4), 583–609. <https://doi.org/10.1007/BF01262426>
115. Vélez-Domínguez, L. C. (1998). Trastornos de migración neuronal. *Gaceta Médica de México*, 134(2), 207–215.
116. 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*. <https://doi.org/10.1117/1.3041163>
117. Verkhratsky, a, & Kettenmann, H. (1996). Calcium signalling in glial cells. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 346–352. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10048-5](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10048-5)
118. Verkhratsky, Alexei, & Butt, A. (2013). Glial Physiology and Pathophysiology. In *Glial Physiology and Pathophysiology*. <https://doi.org/10.1002/9781118402061>
119. Verkhratsky, Alexej, 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>
120. 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*. <https://doi.org/10.1007/s10803-006-0117-y>
- 121.** 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*. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.01.017>
- 122.** 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*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.015>
- 123.** Wolff, J. J., Gerig, G., Lewis, J. D., Soda, T., Styner, M. A., Vachet, C., ... Piven, J. (2015). Altered corpus callosum morphology associated with autism over the first 2 years of life. *Brain*, *138*(7), 2046–2058. <https://doi.org/10.1093/brain/awv118>
- 124.** Wolpert, L., Tickle, C., & Arias, A. M. (2015). *Principles of development*. Oxford University Press, USA.
- 125.** Yang, E.-J., Ahn, S., Lee, K., Mahmood, U., & Kim, H.-S. (2016). Early behavioral abnormalities and perinatal alterations of PTEN/AKT pathway in valproic acid autism model mice. *PLoS One*, *11*(4), e0153298.

APÉNDICES

I. Estandarización del pulso de corriente para estimulación eléctrica.

Para la determinación del pulso de corriente utilizado en la metodología experimental para la onda de calcio asociada a células gliales, se diseñó un experimento utilizando 5 intensidades de corriente distintas (200 300, 400, 500 y 600 μA), evocando una onda de calcio mediante estimulación eléctrica. El criterio de decisión fue la máxima extensión de la onda restringiéndose en el área de interés (genu CC). Con una $N= 7$ animales y $n= 20$ rebanadas, se estableció el pulso de corriente en 300 μA .

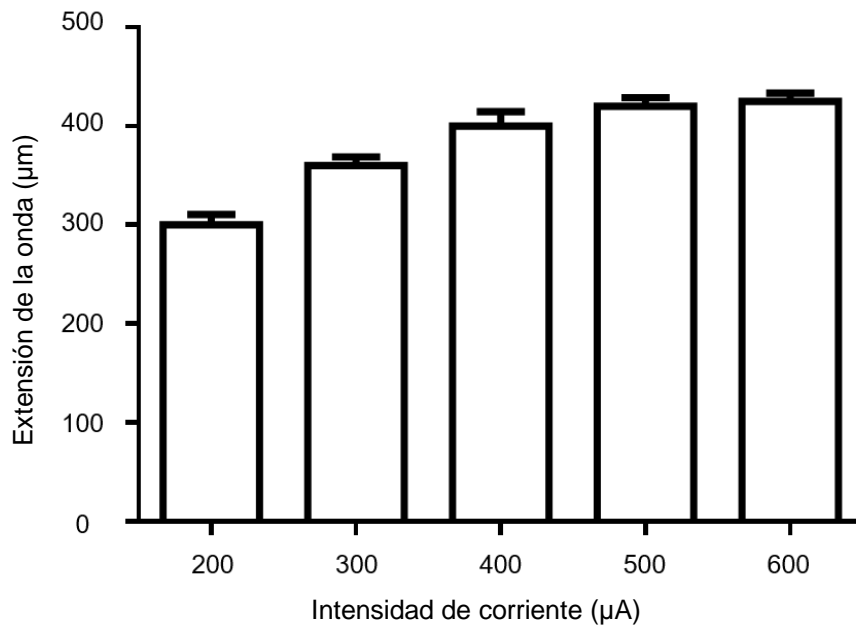


Figura 10. Arreglo experimental para la selección del pulso de corriente. En 300 μA , la onda de calcio evocada alcanza su extensión máxima sin sobrepasar el área de interés.

II. Análisis de videos de onda de calcio.

El análisis de los videos para los experimentos de onda de calcio se realizó con base en la bibliografía (Abràmoff et al., 2004; Francis et al., 2012). El objetivo fue identificar aquellas células que mostraban incrementos de calcio. Una vez obtenido el video de 300 s, se realizó un análisis en el software ImageJ®. Este software muestra el video por stacks (imágenes por segundo), y al video se le resta la primera imagen, esto con la finalidad de eliminar el ruido del mismo. Posteriormente, con la opción de “subtract background”, se elimina todo el brillo de fondo del video, es decir, aquel que puede ser causado por un artefacto, o brillo de algunas células que incide sobre la superficie de la rebanada. Se ajustó también el brillo y contraste y por último se realizó la proyección en el eje Z del video; esto nos arrojó una imagen de calidad, con la menor cantidad de ruido y mostrando todas las células que tienen oscilaciones de calcio durante el video.

III. Cálculo de la velocidad de propagación de la onda de calcio

Se estimó la velocidad de la onda de calcio evocada por despolarización utilizando el método descrito por Schipke (2002), el cual consiste en realizar un cálculo teórico de la distancia, partiendo desde el punto donde se dio el estímulo eléctrico hasta la última célula que incrementa su concentración de $[Ca^{+2}]_i$ en un tiempo aproximado de 15 s, que es el intervalo estándar en los videos adquiridos para onda de calcio. La distancia se calculó con el programa ImageJ® utilizando el factor de conversión $1 \mu m = 3.08$ pixeles. Las unidades de velocidad fueron expresadas en $\mu m/s$.

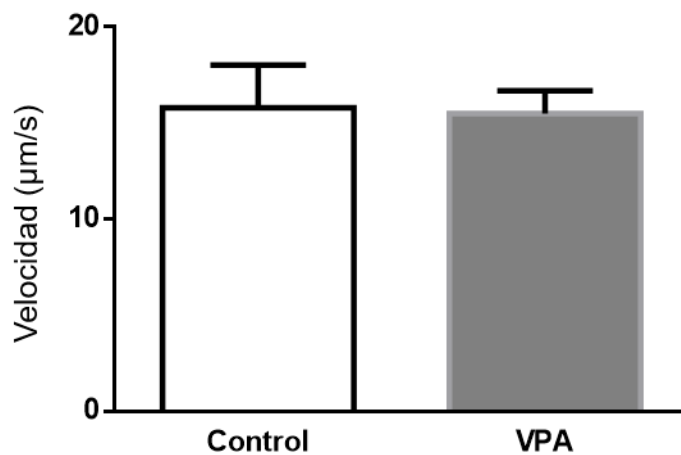


Figura 11. Velocidades estimadas de propagación de la onda de calcio evocada por despolarización. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas entre el control y el grupo tratado con VPA.