



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ENSAMBLES GLIO-NEURONALES EN LA CAPA GRANULAR INTERNA DEL
CEREBELO: EVIDENCIA DE UN MODELO PRECLÍNICO DE AUTISMO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARÍA BERENICE SORIA ORTIZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. DANIEL REYES HARO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR
DRA. ROCÍO BRENDA ANGUIANO SERRANO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA, UNAM
DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

QUERÉTARO, QRO., JULIO 2023



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.

I. RESUMEN

El trastorno del espectro autista (TEA) agrupa una serie de condiciones vinculadas al neurodesarrollo que son detectadas en la niñez, con retrasos en el lenguaje que afectan la comunicación y con un comportamiento social reducido. Los niños diagnosticados con TEA presentan deficiencias sensoriomotoras asociadas con frecuencia al cerebelo, lo que uno de los factores que median las alteraciones conductuales es la disfunción de los circuitos sinápticos. En este contexto la astrogliía toma relevancia, ya que es parte integral de la sinapsis tripartita y en estudios post mortem en el cerebelo de pacientes diagnosticados con TEA han reportado un aumento en la expresión de la proteína ácida gliofibrilar (GFAP), específica de estas células. La astrogliía responde a la actividad neuronal con transitorios intracelulares de calcio (Ca^{2+}) que se propagan a células vecinas, lo que conlleva una respuesta funcional conocida como onda de calcio. Esta forma de señalización intercelular está implicada en la proliferación, migración y diferenciación de los precursores neuronales. La exposición prenatal al valproato (VPA) es un modelo preclínico de TEA en el cual ocurre una migración prematura y un exceso de apoptosis en la capa granular interna (IGL) del cerebelo durante el periodo postnatal temprano. En este estudio se investigó la dinámica de propagación de la onda de calcio en la IGL de ratones expuestos prenatalmente al VPA. A nivel conductual, los resultados mostraron deficiencias sensoriomotoras y a nivel celular, la despolarización de la IGL evocó una onda de calcio que reclutó astrocitos en el modelo VPA. La máxima extensión en la propagación de la onda de calcio, el reclutamiento inicial de astrocitos y neuronas; y la amplitud promedio del transitorio de Ca^{2+} incrementaron significativamente en el modelo VPA respecto al grupo control. El reclutamiento de los astrocitos aumentó significativamente en el modelo VPA, pero no se observaron cambios en la amplitud promedio del transitorio de Ca^{2+} . Los estudios de contenido de proteína e histológicos mostraron un incremento en la expresión de GFAP, así como una mayor densidad y complejidad morfológica de los astrocitos en el modelo VPA respecto al grupo control. Con base en estos resultados se concluyó que la respuesta funcional de los ensamblajes glio-neuronales está notablemente aumentada en el modelo preclínico de autismo.

II. SUMMARY

Autism spectrum disorders (ASD) are pervasive neurodevelopmental conditions detected during childhood when delayed language onset and social deficits are observed. Children diagnosed with ASD frequently display sensorimotor deficits associated with the cerebellum, suggesting a dysfunction of synaptic circuits. Astroglia is part of the tripartite synapses and *postmortem* studies reported an increased expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the cerebellum of ASD patients, a specific protein of these cells. Astroglia responds to neuronal activity with intracellular Ca^{2+} transients that propagate to neighboring cells, resulting in a functional response known as a calcium wave. This form of intercellular signaling is implicated in proliferation, migration, and differentiation of neural precursors. Prenatal exposure to valproate (VPA) is a preclinical model of ASD in which premature migration and excess of apoptosis occur in the internal granular layer (IGL) of the cerebellum during the early postnatal period. In this study we investigate the dynamic of the calcium wave in the IGL of mice prenatally exposed to VPA. A behavioral approach showed sensorimotor deficits, and cellular approaches showed that the IGL depolarization evoked a calcium wave with astrocyte recruitment in the model of VPA. The maximum length of the calcium wave, initial recruitment of astrocytes and neurons, and mean amplitude of the Ca^{2+} transients increased significantly in VPA-exposed mice compared to the control group. Astrocyte recruitment was significantly increased in the VPA model, but the mean amplitude of the calcium transients was unchanged. Western blot and histological studies revealed an increased expression of GFAP, higher astroglial density and augmented morphological complexity. We conclude that the functional signature of the IGL is remarkably augmented in the preclinical model of autism.

III. DEDICATORIA

Para Melisa e Iker, éste también es su logro, los amo.

Para mis padres que siempre me apoyan, me guían y me exigen exigirme.

IV. AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por los servicios de alta calidad y las oportunidades que nos brinda como estudiantes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada número 175835.

Agradezco a E. N. Hernández – Ríos, M. L. Lara – Ayala (q. e. p. d.), A. Castilla, L. Casanova, N. Arandas, E. Espino, M. García – Servín por su apoyo técnico y a A. Martínez – Torres y R. Arellano por permitirnos utilizar equipo y espacio en sus laboratorios.

A mi tutor y miembros de mi comité tutor, por su apoyo y guía a lo largo de mi desarrollo profesional.

A mis compañeros de laboratorio por brindarme su amistad, por asesorarme y por compartir tantas experiencias conmigo.

Este trabajo se desarrolló con donativos PAPIIT-UNAM y CONACyT – Fronteras otorgados al Dr. Daniel Reyes Haro (IN205718, IN209121, IN201913, IN201915 y 319209).

ÍNDICE	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Trastorno del espectro autista	3
2.2 Ácido valproico en el TEA	6
2.3 Cerebelo	9
2.3.1 Estructura del cerebelo	9
2.3.2 Desarrollo embrionario y postnatal del cerebelo	13
2.3.3 El cerebelo en el TEA	17
2.4 Astroglía	19
2.4.1 Los astrocitos cerebelosos en el TEA	26
3 JUSTIFICACIÓN	27
4 HIPÓTESIS	27
5 OBJETIVOS	28
5.1 GENERAL	28
5.2 PARTICULARES	28
6 METODOLOGÍA	29
6.1 Cuidado y mantenimiento de animales	29
6.2 Modelo del Trastorno del espectro autista en el ratón	29
6.3 Pruebas conductuales	30
6.3.1 Evaluación sensoriomotora en la identificación del nido	30
6.3.2 Reflejo de enderezamiento	31
6.3.3 Interacción social	31
6.4 Western blot	32
6.5 Histología	34
6.6 Inmunofluorescencia	34

6.7	Conteo celular	35
6.8	Análisis morfológico	36
6.9	Preparación de rebanadas	37
6.10	Ondas de calcio evocadas	37
6.11	Marcaje de astrocitos con sulforodamina B	39
6.12	Análisis estadístico	40
7	RESULTADOS	41
7.1	El tamaño de la camada disminuye en el modelo VPA	41
7.2	Disminución del peso del cerebro durante las primeras semanas postnatales en el modelo VPA	42
7.3	Aumento de la latencia para el reconocimiento del nido en el modelo VPA	44
7.4	Aumento de la latencia del reflejo de enderezamiento en el modelo VPA	44
7.5	La latencia de aproximación social es mayor en el modelo VPA	44
7.6	La expresión de calbindina está reducida en el modelo VPA	45
7.7	La densidad de las células de Purkinje se reduce en el modelo VPA	47
7.8	La expresión de GFAP se incrementa en el modelo VPA	48
7.9	La densidad de los astrocitos de la IGL aumenta en el modelo VPA	50
7.10	La extensión de la onda de calcio se incrementa en el modelo VPA	52
7.11	El reclutamiento de astrocitos aumenta en la onda de calcio en el VPA	54
8	DISCUSIÓN	57
8.1	Tasa de natalidad	57
8.2	Peso corporal	58
8.3	Peso del cerebro	58
8.4	Conducta social y habilidades sensoriomotoras	59
8.5	Expresión de calbindina y densidad de las células de Purkinje	60
8.6	Expresión de GFAP	61
8.7	Densidad y morfología de los astrocitos	62
8.8	Onda de calcio	63
9	CONCLUSIÓN	67
	BIBLIOGRAFÍA	68
	LISTA DE FIGURAS	83

LISTA DE TABLAS	84
APÉNDICE I. Genes asociados al TEA	85
APÉNDICE II. Análisis fenotípico de los modelos animales con aportaciones relevantes al TEA	86
APÉNDICE III. Expresión del receptor GABA ρ 3 en PCs y células gliales ependimarias del cerebelo	87
APÉNDICE IV. Expresión del receptor GABA ρ 3 en el cerebelo durante el primer mes postnatal	88
APÉNDICE V. Análisis morfológico de astrocitos	89
APÉNDICE VI. Análisis de detección de células y propagación de la señal de calcio	90
APÉNDICE VII. Análisis del área bajo la curva	91

1. INTRODUCCIÓN

El Trastorno del espectro autista (TEA) es un conjunto de neuropatologías del desarrollo que se diagnostican a partir de los 3 años. En México se ha reportado una prevalencia del 0.87% (Fombonne et al., 2016), aunque de manera global alcanza el 1% (Zeidan et al., 2022), con mayor frecuencia en varones (4:1), (Fombonne et al., 2016). Los individuos diagnosticados con TEA presentan un deterioro en la comunicación social recíproca e interacción social, además de un patrón de conductas repetitivas o intereses restringidos (Pennington, et al., 2014). Adicionalmente, estudios de imagen por resonancia magnética reportaron que el tamaño del cerebro de niños diagnosticados con TEA (2-5 años de edad) estaba incrementado y posteriormente se normalizaba e incluso disminuía hacia la edad adulta (Courchesne et al., 2007). El cerebelo es una de las regiones frecuentemente alteradas en el TEA (Amaral et al., 2008). La parte anterior del cerebelo ejecuta funciones de control motor (lóbulos I-V) y la parte posterior cumple funciones cognitivas (lóbulos VI-X); (D'Mello et al., 2015). Estudios morfoanatómicos con imagen por resonancia magnética (MRI) en niños de 10 años diagnosticados con TEA, demostraron una disminución en el volumen de la sustancia gris o corteza cerebelosa de las regiones Crus I y II ubicadas en el lóbulo VII implicadas en el lenguaje, procesamiento emocional, procesamiento de estímulos faciales y vocales, imitación y praxis (D'Mello et al., 2015; Stoodley et al., 2012).

La corteza cerebelosa contiene las capas molecular, de Purkinje y granular, pero además el cerebelo también contiene sustancia blanca y 4 eferentes llamados núcleos profundos (Butts et al., 2014). Las capas de la corteza están constituidas por neuronas GABAérgicas, neuronas glutamatérgicas y células gliales (astrocitos, oligodendrocitos, NG2 y microglía), (Buffo y Rossi, 2013; Butts et al., 2014). Estudios *post mortem* de individuos diagnosticados con autismo muestran consistentemente una pérdida de células de Purkinje (PCs) y un incremento en la expresión de la proteína ácida gliofibrilar (GFAP) proteína específica de astrocitos (Skefos et al., 2014). Además, se ha reportado una disminución de la expresión de relina, una glicoproteína relacionada con la migración

de las células granulares (GCs) durante el desarrollo del cerebelo (Fatemi et al., 2001; Laurence & Fatemi, 2005).

En el cerebelo existen tres tipos de astrocitos morfológicamente distintos, la glía de Bergman ubicada en la capa de Purkinje, astrocitos velados de la capa granular y astrocitos fibrosos de la sustancia blanca (Buffo y Rossi, 2013). Además, en el lóbulo X residen las células endimarias, un tipo de astrogía especializada que también expresa GFAP (Reyes-Haro et al., 2013). La astrogía es fundamental durante el neurodesarrollo del cerebelo pues está implicada en la neurogénesis y la migración de los precursores neuronales, lo que permite su correcta laminación y maduración (Buffo y Rossi, 2013). En el cerebelo maduro, la astrogía forma redes funcionales y sus procesos mantienen contacto con las PCs y las GCs, cubriendo los requerimientos metabólicos y sinápticos de estas neuronas (Hoogland y Kuhn, 2010; Houades et al., 2006).

Para el estudio del TEA se han generado diversos modelos murinos (genéticos y farmacológicos) que reproducen conductas para el diagnóstico del trastorno y otras alteraciones importantes, como la hipersensibilidad a los sonidos y deficiencias en la motricidad fina. Dentro de los modelos farmacológicos está el de exposición prenatal al ácido valproico (VPA), un fármaco que inhibe la enzima desacetilasa de la histona H3 y produce cambios epigenéticos que incluyen alteraciones sobre el sistema GABAérgico (Lagace et al., 2004). La exposición prenatal a este fármaco incrementa el riesgo de desarrollar TEA (Christianson et al., 1994; Moore et al., 2000), tanto en humanos como en roedores. En los murinos, el VPA provoca una disminución en el número de exploraciones o aproximaciones con roedores extraños, acicalamientos prolongados, hiperactividad y disminuye las vocalizaciones, los cuales son correlatos del diagnóstico del trastorno. Además, provoca alteraciones sensoriomotoras como disminución de la sensibilidad al dolor, hipersensibilidad al sonido, discriminación olfatoria deficiente, retraso en la maduración motora y reflejo de enderezamiento deficiente, principalmente asociadas a la función del cerebelo (Al Sagheer et al., 2018; Favre et al., 2013; Kazlauskas et al., 2016; Mony et al., 2016; Roullet et al., 2010; Schneider y Przewłocki, 2005). Asimismo, produce alteraciones morfoanatómicas en el cerebelo que incluyen una disminución del volumen de la capa granular (D'Mello et al., 2005), un incremento en el

número de células glutamatérgicas del núcleo profundo (Mowery et al., 2015) y la pérdida de PCs (Bailey et al., 1998; Kemper y Bauman, 1988). En su conjunto, estos hallazgos sugieren que en el autismo, tanto neuronas como astrocitos del cerebelo se encuentran alterados, resultando posiblemente en la función incorrecta del cerebelo, específicamente en la capa granular de las regiones Crus I/II, que pudieran tener origen en la maduración incorrecta del cerebelo. Por esto, resulta importante analizar si la densidad y la funcionalidad de los astrocitos de la capa granular y en su conjunto con las neuronas, se encuentran alterados en este trastorno del neurodesarrollo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Trastorno del espectro autista

El TEA, se define como un conjunto de neuropatologías del desarrollo que incluyen el trastorno autista, el síndrome de Asperger, el trastorno desintegrativo de la infancia y el trastorno del desarrollo generalizado no especificado. El TEA se manifiesta de distintas maneras en los individuos; sin embargo, su etiología incluye conductas estereotipadas y repetitivas, además de deficiencias persistentes en la capacidad de iniciar y sostener la interacción social y la comunicación social (CIE-11, 2023; DSM-5, 2014; Pennington et al., 2014)

En el libro de Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-11, 2023) y en el Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales (DSM-5, 2014), el TEA se clasifica en trastornos generalizados del desarrollo como: F84.0 trastorno autista, F84.3 trastorno desintegrativo infantil y F84.5 síndrome de Asperger y en estos se detallan los tres principales síntomas de diagnóstico. Sin embargo, los individuos con TEA normalmente presentan otras dificultades concomitantes como son trastornos del lenguaje, deficiencias cognitivas, alteraciones sensoriales, deficiencias motoras y deficiencias en

la integración visual. El TEA puede diagnosticarse desde los 3 a 7 años (DSM-5, 2014; Mandell et al., 2005).

Fombonne et al. (2016) en colaboración con la Clínica Mexicana de Autismo A. C. (CLIMA) regional ubicada en León, Guanajuato, reportó una prevalencia promedio de 0.87% (1 cada 115 niños) en su estudio realizado con niños de 8 años que asistían a escuelas regulares o educación especial entre los años 2011 y 2012. De acuerdo con CLIMA, existe un incremento del 17% en la incidencia anual; colocando al TEA como una condición más frecuente que la diabetes, el cáncer o el Síndrome de Down en México. En el mismo estudio, se encontró que el 81% de los casos confirmados fueron varones, lo cual concuerda a la razón 4:1 reportada internacionalmente (Pennington et al., 2014).

La causa principal del TEA se desconoce, pero se sabe que tiene bases genéticas y ambientales (ver tabla 1). Existe una desregulación de cientos de genes (mutación, fusión) en el autismo, genes implicados en la migración celular, laminación, sinaptogénesis y en la propia estructura sináptica (Apéndice I). Sin embargo, la prevalencia del autismo con bases genéticas representa sólo del 5 - 15% de los casos de autismo (Roulet et al., 2013).

Por otro lado, existen otros factores de riesgo que representan el 40% de la casuística del autismo como son los factores ambientales presentes durante la gestación, tales como infecciones virales, exposición al alcohol, o exposición prenatal a fármacos como a talidomida y el ácido valproico (Schneider y Przewlocki, 2005). Otros factores secundarios que incrementan la probabilidad de que un infante desarrolle autismo son la salud mental de la madre en el periodo gestante o la historia clínica familiar. Es decir, patologías como la esquizofrenia, depresión o alguna otra enfermedad psiquiátrica en la historia familiar incrementa la probabilidad de desarrollar este trastorno, incluso la conducta de la madre hacia el infante predispuesto puede afectar seriamente (IMSS, 2012; Pennington et al., 2014).

Tabla 1. Ejemplos del riesgo relativo del TEA con respecto a factores genéticos y ambientales (modificado de Wang et al., 2014).

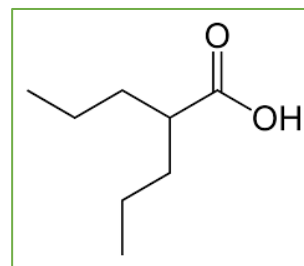
Factor de riesgo	RR
Población general	1x
Edad de los padres > 35	1.3x
Padres con enfermedades mentales	2x
Tener un hermano autista	2x
Estrés materno*	2-3x
Intervalo entre nacimientos < 1 año*	3.4x
Nacimientos prematuros*	7.3x
Privación social y sensorial postnatal*	8x
Exposición prenatal a medicamentos	8x
Tener un mellizo autista	10x
Lesiones cerebelares al nacimiento*	36x
Tener un gemelo idéntico autista	>50x

Factores ambientales*

Por lo anterior, los factores ambientales cobran mayor importancia. Específicamente los dos factores con mayor riesgo son: 1) las alteraciones histológicas y genéticas en el cerebelo, las cuales incrementan hasta 36 veces el riesgo de desarrollar autismo (Wang et al., 2014); y 2) la exposición prenatal a medicamentos como el ácido valproico o valproato de magnesio (Christensen et al., 2013; Moore et al., 2000). El incremento en la prevalencia del TEA se ha relacionado fuertemente con la exposición prenatal al ácido valproico, ya que es un fármaco que se usa frecuentemente en el mundo para el tratamiento de diversos tipos de epilepsia y trastornos afectivos. Es importante resaltar que la prescripción de este fármaco continúa siendo de primera elección, incluso en mujeres embarazadas, provocando que más niños se vean afectados.

2.2 Ácido valproico en el TEA

El ácido valproico (VPA) es un ácido graso de cadena corta que incrementa los niveles extracelulares del principal neurotransmisor inhibitorio, el ácido γ -aminobutírico (GABA) controlando la actividad excitadora en diferentes regiones del cerebro; sin embargo, el mecanismo que subyace este evento aún no es claro. Algunos estudios demuestran que el VPA inhibe



la enzima succinil semialdehído deshidrogenasa (SSA-DH, que degrada a SSA en ácido succínico) y se propone que el nivel endógeno de GABA se incrementa debido a que la acumulación de SSA inhibe a la enzima GABA-transaminasa evitando la degradación de GABA (Johannessen, 2000; Lagace et al., 2004). Otros estudios sugieren que la actividad de la enzima glutamato descarboxilasa se incrementa; sin embargo, esto no se ha logrado demostrar *in vivo* (Mesdjian et al., 1982).

El VPA también es inhibidor de las enzimas desacetilasas de histonas y como tal, tiene efecto directamente sobre la regulación de la expresión de diversos genes, como los enlistados en el apéndice I (Fukuchi et al., 2009; Lagace et al., 2004; Terbach y Williams, 2009; Wagner et al., 2006). De manera general, las histonas son proteínas en las que se enrolla el ADN y lo mantiene compactado en unidades llamadas nucleosomas. Cuando se requiere la transcripción de algún gen, las histonas se acetilan por la acción de enzimas acetiltransferasas y la cadena de ADN se suelta permitiendo la unión de factores de transcripción; mientras que en la fase en donde no se requiere la transcripción de genes, las desacetilasas de histonas quitan los grupos acetilo, provocando que el ADN vuelva a su configuración cerrada o compactada en las histonas (Gurvich et al., 2004). Así, cuando el VPA inhibe las desacetilasas de histonas, provoca que decenas de genes se transcriban sin ser requeridos y otros se encuentren a la baja (Kowalski et al., 2022). Este es uno de los mecanismos de acción del VPA, que se hipotetiza, propician el desarrollo del TEA.

El metanálisis de transcriptoma realizado por Kowalski et al. (2022) mostró que el VPA altera la expresión de 115 genes en células madre embrionarias humanas, tanto al alza como a la baja. La mayoría de estos genes están involucrados en procesos biológicos del neurodesarrollo y neuroinflamación. Otro análisis de secuenciación de ARN realizado en el cerebelo de roedores con exposición prenatal a VPA, mostró que durante el desarrollo postnatal del cerebelo existen genes asociados al TEA con una expresión desregulada durante las primeras tres semanas postnatales y que están involucrados en los procesos de maduración sináptica entre las fibras paralelas y las células de Purkinje (Guerra et al., 2023).

Con el objetivo de comprender mejor algunos de los eventos fisiopatológicos asociados al TEA, se han generado modelos animales que incluyen primates no humanos, roedores y pez cebra; sin embargo, se han utilizado *D. melanogaster* y *C. elegans*, para el estudio de genes particularmente involucrados con el trastorno (Apéndice II). Hasta ahora los modelos de autismo en el roedor son los más utilizados, por ejemplo, el ratón transgénico deficiente del gen que codifica para neuroligina (NL3), una proteína de adhesión presente en la membrana plasmática postsináptica que mantiene la unión con la membrana de la presinápsis. Otro ejemplo es el ratón Black and Tan BRarchyury (BTBR) el cual presenta agenesia del cuerpo calloso y de la comisura hipocampal y muestra sintomatología del TEA, tales como interacción social deficiente, alteraciones en la conducta exploratoria y de juego, vocalizaciones inusuales y ansiedad (McFarlane et al., 2008).

El modelo de exposición prenatal a VPA es particularmente robusto ya que tanto en humanos como en roedores, 1) el mecanismo etiológico incluye cambios epigenéticos, cambios en el nivel de expresión de genes específicos y alteraciones estructurales del SNC; 2) el fenotipo incluye los signos conductuales característicos, el desequilibrio entre la señalización excitadora-inhibidora y la alteración en el nivel de metabolitos y neurotransmisores; y 3) existen similitudes en la respuesta a tratamientos para aliviar algunos síntomas tanto en el TEA como el modelo animal. Asimismo, el modelo proporciona confiabilidad debido a su alta reproducibilidad (Mabunga et al., 2015).

El fenotipo conductual de los roedores expuestos a VPA ha sido evaluado mediante la aplicación de pruebas conductuales que tienen correlatos con los tres signos diagnósticos del TEA, que son: 1) falta de interés por la exploración o aproximación a roedores desconocidos, en la que se mide la latencia de aproximación y el número de olfateos de inspección ano-genital y aseo hacia otros roedores; 2) conductas de acicalamiento repetitivas y prolongadas o búsqueda de objetos enterrados por tiempos prolongados; y 3) disminución en la emisión de vocalizaciones (Gandal et al., 2010; Kataoka et al., 2013; Rouillet et al., 2010). Además, en el modelo del VPA se presentan marcadores biológicos descritos en individuos autistas como macrocefalea en etapas tempranas del desarrollo asociado al incremento de neuronas glutamatérgicas y alteraciones en la estructura y función de neuronas GABAérgicas (Fukuchi et al., 2009; Kim et al., 2013, 2014). Mientras que, en etapas posteriores, se ha observado una disminución en el volumen del cerebro en individuos autistas, pero no se ha analizado en el modelo del VPA (Courchesne et al., 2011).

Otros síntomas importantes presentes en los pacientes diagnosticados con TEA que se han reproducido en el modelo del VPA por varios grupos de investigación, incluyen alteraciones sensoriales y motoras, como hipersensibilidad al sonido, disminución de la sensibilidad al dolor, deficiencias en la motricidad fina, discriminación olfatoria deficiente, reflejo de enderezamiento deficiente y retraso en el desarrollo motor (Al Sagheer et al., 2018; Favre et al., 2013; Kazlauskas et al., 2016; Mony et al., 2016; Rouillet et al., 2010; Schneider y Przewłocki, 2005). Además, Al Sagheer et al. (2018) observaron que las deficiencias sensoriomotoras presentes en la etapa postnatal y adulta en el modelo del VPA, se deben a la pérdida de neuronas en regiones específicas del cerebelo y en la corteza motora. Demostraron que las alteraciones sensoriomotoras tienen una correlación directa con el desarrollo de deficiencias sociales, por lo que sugieren que se deben incluir en el diagnóstico del trastorno.

En individuos autistas se ha encontrado que el volumen total del cerebro está aumentado en regiones específicas como las cortezas frontal, temporal y parietal; también algunos estudios reportan un incremento de la densidad en la sustancia gris de la amígdala izquierda, un volumen reducido del hipocampo y amígdala, agrandamiento de los ventrículos III y IV y un volumen reducido en el cuerpo calloso. En el cerebelo, nuestra región de interés, se ha reportado principalmente la reducción de volumen en diferentes áreas del vermis y hemisferios, los cuales se detallan más adelante (Bauman & Kemper, 2005; Brambilla et al., 2003; Casanova, 2015; Crippa et al., 2016), (ver figura 1).

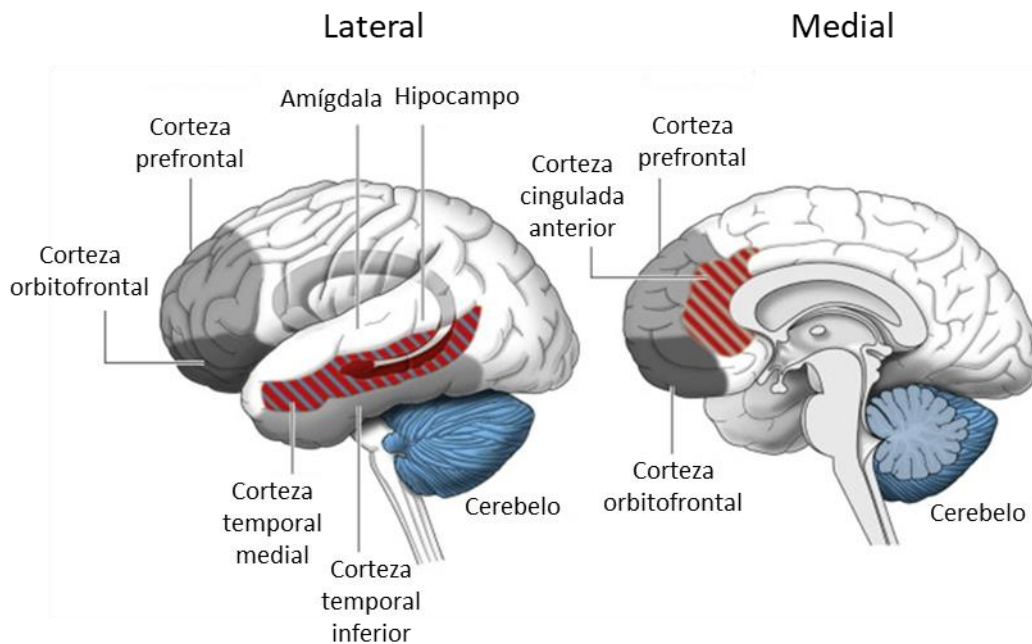


Figura 1. Estructuras cerebrales asociadas al TEA (modificada de Wang et al., 2014).

2.3 Cerebelo

2.3.1 Estructura y conexiones del cerebelo

El cerebelo está localizado en la cavidad craneal posterior y es crucial para la coordinación motora, funciones cognitivas y emocionales (Stoodley et al., 2012). El cerebelo maduro está constituido por el vermis en su parte central y dos hemisferios

laterales, formados por 10 lóbulos (I - X). El cerebelo se divide en tres grandes lóbulos: 1) el cerebelo anterior o paleocerebelo (lóbulos I - V) separado por la fisura primaria del 2) cerebelo posterior o neocerebelo (lóbulos VI - X), que contiene las regiones Crus I y II separadas por la fisura horizontal; y 3) lóbulo floculonodular o arquicerebelo (lóbulo X), (ver figura 2a).

La corteza cerebelosa, consta de tres capas de sustancia gris (corteza cerebelar), alternadas con sustancia blanca: 1) La capa molecular (ML, por sus siglas en inglés) contiene células en cesta, células estrelladas, las dendritas de las células de Purkinje (PCs, por sus siglas en inglés) y las ramificaciones de la **glía de Bergman**, siendo aquí donde se integra toda la información que recibe tanto de las fibras trepadoras como de las fibras paralelas de las células granulares (GCs, por sus siglas en inglés) de la capa granular interna IGL (por sus siglas en inglés). 2) La capa de Purkinje (PL, por sus siglas en inglés), en donde se encuentran alineados los somas de las PCs rodeados por los somas de la glía de Bergman. 3) La IGL contiene las terminales tipo roseta de las fibras musgosas por donde ingresa la información multisensorial, y contiene también células de Golgi, células de Lúgaro y las GCs, constituyendo el glomérulo cerebeloso que está envuelto por las ramificaciones de **astrocitos velados** (ver figura 2b).

El cerebelo tiene cuatro núcleos profundos: fastigio, globoso, emboliforme y dentado, representados en las regiones f, g, e y d en la figura 2a. Estos están ubicados dentro de la sustancia blanca cerebelosa que, a su vez, contiene los axones neuronales y los **astrocitos fibrosos** con sus ramificaciones en paralelo. Los núcleos son pequeñas regiones que contienen neuronas de proyección e interneuronas, que reciben los axones de las PCs y proyectan hacia el tálamo, el núcleo pontino y los núcleos vestibulares; y que proyectan hasta la corteza cerebral y a la médula (Marzban et al., 2015; Schmähmann, 2019; Suzuki et al., 2012).

Todas las células de la corteza cerebelosa son GABAérgicas, excepto las GCs y las células unipolares en cepillo (UBc, por sus siglas en inglés) que son glutamatérgicas (ver

figura 2b). Además de los astrocitos fibrosos, velados y glía de Bergmann, residen otras células gliales tales como la microglía, los oligodendrocitos y las células ependimarias; tanto en la sustancia blanca, como en la sustancia gris (Butts et al., 2014).

La información que recibe el cerebelo se procesa de manera organizada en pequeños módulos anatómicos de acuerdo con el origen de sus aferencias y eferencias (Stoodley et al., 2012). La sustancia blanca, contiene tres vías aferentes: 1) Las fibras trepadoras (CF) glutamatérgicas que provienen del complejo olivar inferior y proyectan directamente hacia la capa molecular haciendo sinapsis con las PCs, células estrelladas (Sc) y en cesta (Bc), sin hacer sinapsis en la IGL. 2) Las fibras musgosas (MF) también glutamatérgicas que provienen de la médula espinal, núcleos vestibulares y núcleo pontino, proyectan hacia las GCs. De aquí, los axones de las GCs proyectan hacia la ML y se dividen en dos axones que proyectan en direcciones opuestas, llamados fibras paralelas; estas activan a las PCs, las Bc y Sc (Farini et al., 2021), (ver figura 2b, c). 3) Las fibras multilaminadas de origen hipotalámico, núcleos de rafe, locus coeruleus y núcleos mesencefálicos, son serotoninérgicas, dopaminérgicas o noradrenérgicas (Bloedel, 1973).

En cuanto a sus vías eferentes, se encuentran: 1) la vía dento-talámica, que recibe información del cerebelo posterior a través del núcleo dentado; 2) la vía globoso-rubral y emboliforme-rubral, que recibe información del cerebelo anterior a través de los núcleos globoso y emboliforme; y 3) la vía fastigio-vestibular, que recibe información del arquicerebelo a través del núcleo fastigio. Como se mencionó anteriormente, la información del cerebelo se recibe en estos núcleos y proyectan hacia la médula, puente, mesencéfalo, tálamo y corteza cerebral (ver figura 2c).

Brevemente, un microcircuito cerebeloso se activa por las fibras trepadoras (glutamatérgicas) que hacen sinapsis con las células de Purkinje (GABAérgicas). Por su parte, las fibras musgosas (glutamatérgicas) activan a las células granulares (glutamatérgicas) y hacen sinapsis con las células de Purkinje a través de sus fibras

paralelas. Las colaterales de ambas fibras paralelas y fibras trepadoras, en la capa molecular, también activan células estrelladas (GABAérgicas) y en cepillo (GABAérgicas) que controlan la salida de las células de Purkinje hacia los núcleos cerebelosos. Mientras que las células de Golgi (GoC, GABAérgicas) controlan la salida de las células granulares, tanto en la capa granular interna como en la molecular (Farini et al., 2021). Asimismo, las colaterales de las fibras trepadoras y musgosas hacen sinapsis con las neuronas de los núcleos cerebelosos (ver figura 2b), (Miterko et al., 2019).

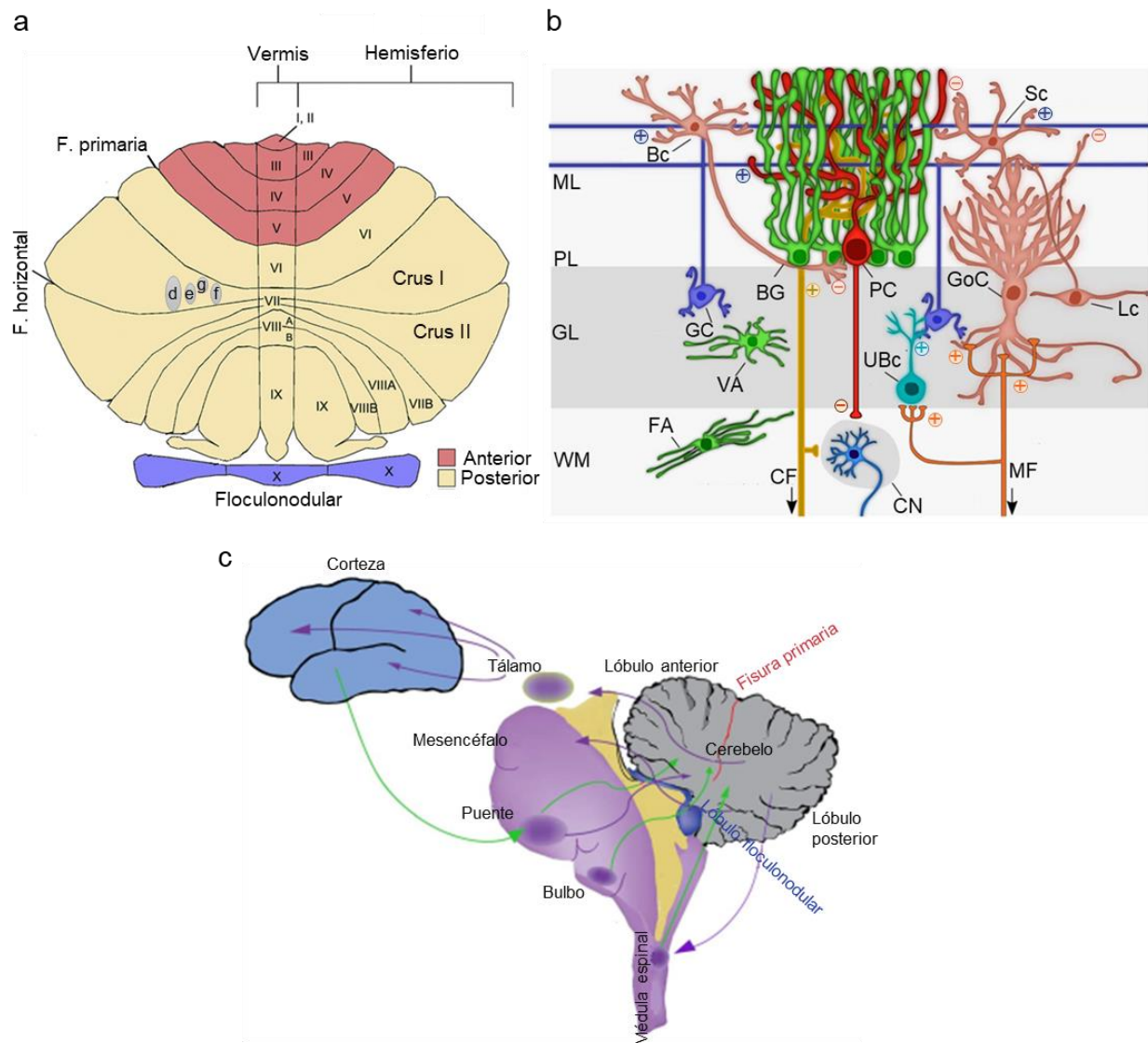


Figura 2. Estructura y conexiones del cerebelo. (a) Cerebelo en configuración de libro abierto (lóbulo I – X), agrupados en tres grandes lóbulos: lóbulo anterior (rosa), lóbulo posterior (beige) y lóbulo floculonodular (azul). Núcleos profundos (gris): f, fastigio; g, globoso; e, emboliforme; y d, dentado (modificada de

Schmahmann, 2018). (b) Capas cerebelosas y composición celular. ML, capa molecular; PL, capa de Purkinje; GL, capa granular; WM, sustancia blanca. Células GABAérgicas (-): Bc, células en cesta; Sc, células estrelladas; PC, células de Purkinje; GoC, células de Golgi; Lc, células de Lugaro. Células glutamatérgicas (+): GC, células granulares; UBc, células unipolares en cepillo. Células gliales: BG, glía de Bergmann; VA, astrocitos velados; FA, astrocitos fibrosos. Aferencias: CF, fibras trepadoras; MF, fibras musgosas. Eferencias: CN, núcleos cerebelosos (modificada de Cerrato, 2020). (c) Conexiones de vías aferentes (verde) y eferentes (morado). Se incluye la aferencia cortico-pontino y la eferencia talamocortical, mostrando la conexión entre el cerebelo y diferentes regiones de la corteza cerebral, como la prefrontal (modificada de Farini et al., 2021).

2.3.2 Desarrollo embrionario y postnatal del cerebelo

Diversos estudios genéticos, moleculares, histológicos y anatómicos, en tejidos *post mortem* o en modelos animales, han mostrado que las alteraciones neurológicas observadas en el TEA ocurren en diferentes etapas del desarrollo prenatal y postnatal, comenzando entre el primero y segundo trimestre prenatal (Courchesne et al., 2019). Por lo que es importante, describir el desarrollo normal del cerebelo para ubicar las etapas importantes de proliferación, diferenciación y migración de las células que lo constituyen y posteriormente describir esos hallazgos reportados con relación al TEA.

El cerebelo se origina del rombencéfalo justo en el límite con el mesencéfalo, el neuroepitelio del techo del cuarto ventrículo. El origen y las etapas de su desarrollo se conservan entre diversas especies. En el roedor, comienza a formarse al final de la primera semana prenatal (día embrionario 8.5, E8.5) y sus células se originan a partir de la **glía radial**. Existen dos zonas germinales primarias: el labio rómbico (rl), que da origen a las células glutamatérgicas; y la zona ventricular (VZ) que da origen a las neuronas GABAérgicas de proyección e interneuronas, a los **astrocitos** y al resto de la glía (ver figura 3). Los precursores celulares comienzan a proliferar en el día E10.5, siendo los precursores de las PCs y de las GCs los que se diferencian primero (E12.5). Ambos se distribuyen en las diferentes capas del cerebelo en una secuencia espacio-temporal bien definida, lo que constituye la base para la formación de la circuitería entre PCs y GCs (Wang et al., 2005). La fase de migración y laminación de la corteza cerebelosa se

extiende hasta las primeras 3 semanas postnatales (Butts et al., 2014; Farini et al., 2021). A continuación, se detallan estos procesos.

Los precursores de las GCs inician su proliferación (E12.5 - E17.5) y migran tangencialmente como células precursoras hacia la capa granular externa transitoria (EGL), hasta el día E21. Algunas de estas neuronas continúan migrando fuera del primordio cerebeloso (MacHold y Fishell, 2005). Los precursores de las GCs se diferencian (E17.5) y migran radialmente (P0 - P21) a través de las ramificaciones de la **glía de Bergmann** para poblar la IGL (ver figura 4). Los precursores se diferencian en UBc y GCs, sus ramificaciones crecen y maduran dando lugar a las GCs provistas de sus fibras paralelas. En este proceso, la proteína de matriz extracelular llamada relina, es crucial para detener la migración de las GCs en la IGL, logrando una correcta laminación del cerebelo (Butts et al., 2014).

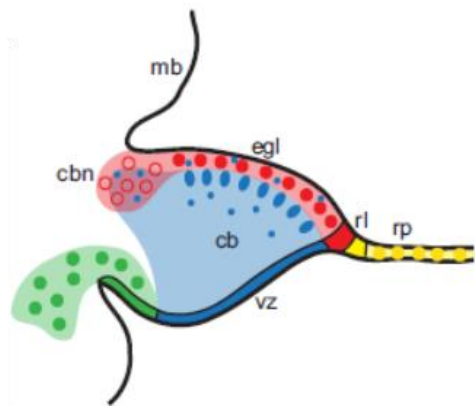


Figura 3. Esquema sagital del cerebelo (cb) en el desarrollo embrionario. El área coloreada de azul indica la zona de proliferación (zona ventricular, vz) y migración radial de neuronas GABAérgicas y células gliales, el área coloreada de rojo indica el origen (labio róbico, rl) y migración tangencial de precursores de neuronas glutamatérgicas (capa granular externa, egl) y el área coloreada verde indica un origen extracerebeloso de interneuronas. mb, mesencéfalo; cbn, núcleo cerebeloso; rp, techo del IV ventrículo (modificado de Butts et al., 2014).

Por su parte, las PCs inician su proliferación el día E12.5 y el resto de las interneuronas (GoC, Lc, Sc, Bc, de la figura 2) en el día E13.5-16.5; mientras que la glía (AV, AF, BG y

oligodendrocitos) tiene dos momentos de proliferación en E13.5 y durante las primeras semanas postnatales (ver la figura 4). Las PCs migran en grupos, primero de forma tangencial hacia la sustancia blanca y luego, radialmente hacia la futura capa de Purkinje, a través de las proyecciones de la glía radial. Para el día E21, las PCs están perfectamente alineadas formando una monocapa con ramificaciones simples (ver figura 3) y durante las 3 primeras semanas postnatales sus ramificaciones crecen y se hacen más densas. Mientras que las interneuronas migran postnatalmente desde la sustancia blanca hacia la capa molecular (Butts et al., 2014; Silbereis et al., 2009).

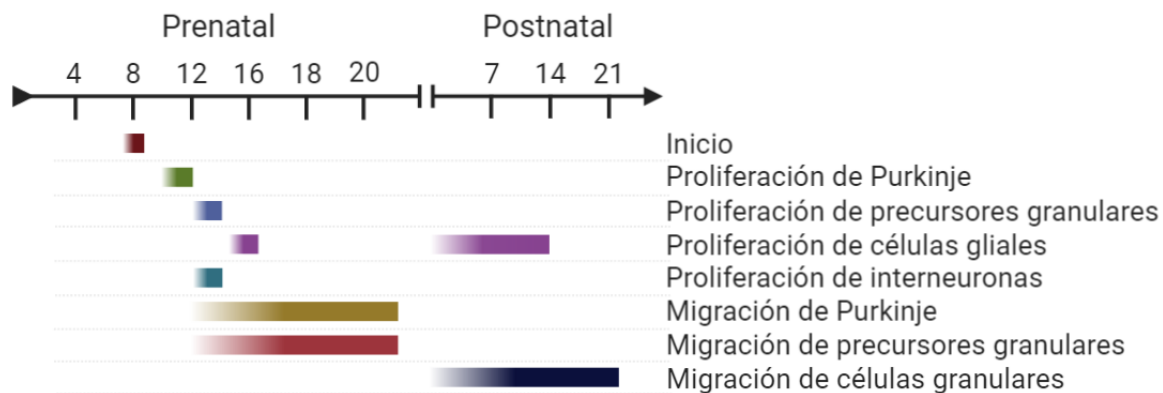


Figura 4. Esquema cronológico del desarrollo del cerebelo del roedor. La flecha discontinua es una línea de tiempo (días) mostrando los procesos celulares que ocurren durante el desarrollo prenatal y postnatal del cerebelo. En el primer segmento se indica el desarrollo embrionario desde el día E0 al E21 (ó P0) que corresponde al nacimiento. Mientras que el segundo segmento a la derecha, indica el desarrollo postnatal del día P0 al P21. Los procesos más importantes que ocurren durante la etapa embrionaria son el desarrollo de la capa de Purkinje y en la etapa postnatal, el desarrollo de la capa granular.

Los tres tipos de astrocitos cerebelosos; astrocitos fibrosos (AF) de la sustancia blanca, la glía de Bergmann (BG) de la capa de Purkinje y molecular y los astrocitos velados (AV) de la IGL, se originan de la glía radial en la VZ y de precursores gliales que residen en la sustancia blanca, en diferentes momentos entre E13.5 – P14 (ver figura 5). De manera específica, la proliferación de la BG, que se origina directamente de la glía radial, inicia en el día E13.5 y migra hacia la PL hasta el día P7. Posteriormente, sus somas se alinean con los de las PCs y sus ramificaciones crecen y se hacen más densas hacia el día P21. Mientras que los astrocitos AV y AF se originan por precursores locales en la sustancia

blanca entre E14.5 – P7. Cabe mencionar que los oligodendrocitos comparten su precursor celular con los AF y AV (Buffo y Rossi et al., 2013; Farini et al., 2021).

Además, existen subpoblaciones de precursores gliales (E14.5 – P5), tanto en la VZ como en la sustancia blanca, que pueden diferenciarse también en interneuronas de la ML (ver figura 5), mientras que otras subpoblaciones solo se diferencian en astrocitos (Buffo y Rossi et al., 2013). De manera interesante, existen subpoblaciones de células GFAP⁺ (específico de astrocitos) de la EGL que pueden dar lugar a GCs, durante la primera semana postnatal (Silbereis et al., 2009; Silbereis et al., 2010). A partir de P12 los precursores gliales solo se diferencian en astrocitos.

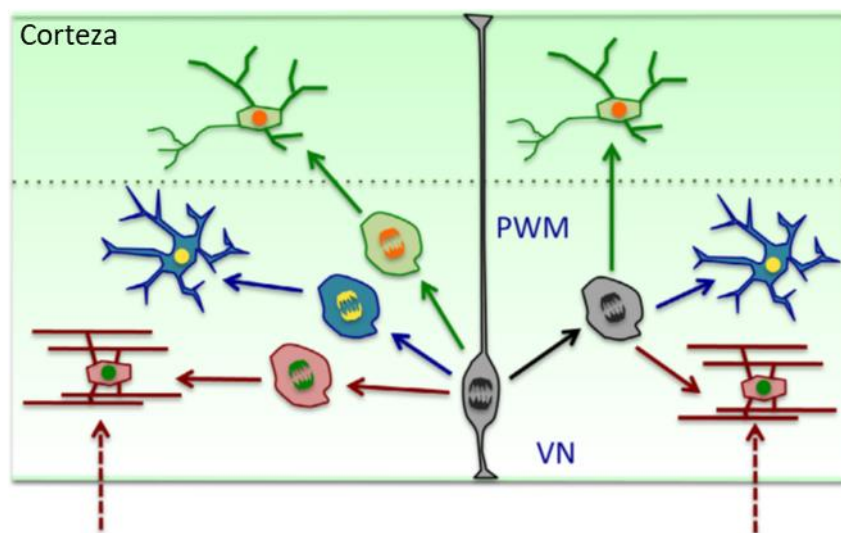


Figura 5. Posibles mecanismos de proliferación glial del cerebelo. En la izquierda se propone que la glía radial (gris) del neuroepitelio ventricular (VN) genera astrocitos (azul), interneuronas (verde) y oligodendrocitos (rojo). En la derecha se propone que existe una célula totipotencial (PWM, gris) en la futura sustancia blanca, que genera los tres fenotipos celulares. Las flechas punteadas rojas proponen que los oligodendrocitos provienen de sitios extra-cerebelosos (modificada de Buffo y Rossi, 2013).

A lo largo de esta sección se ha descrito que la astrogía tiene un papel importante durante el desarrollo de la estructura del cerebelo, ya que guían la migración neuronal tanto de las PCs (por la glía radial) como de las GCs (por la BG), además de tener una

potencial función neurogénica en la EGL y en la sustancia blanca (AF, AV). Más adelante se describen otras funciones de los astrocitos cerebelosos y su papel en el TEA.

2.3.3 El cerebelo en el TEA

El cerebelo es una de las regiones frecuentemente alteradas en el TEA (Amaral et al., 2008). El cerebelo proyecta fibras eferentes hacia distintas regiones de la corteza que incluyen áreas cognitivas, afectivas y sensoriomotoras (Wang et al., 2014, ver figura 6). La parte anterior del cerebelo ejecuta funciones de control motor (lóbulos I-V) y la parte posterior cumple funciones cognitivas (lóbulos VI-X), (Stoodley et al., 2012). Las áreas cerebelosas mayormente afectadas en el TEA son las regiones Crus I y II ubicadas en el lóbulo VII y están implicadas en el lenguaje, procesamiento emocional, procesamiento de estímulos faciales y vocales, imitación y praxis (D'Mello et al., 2015; Stoodley et al., 2012). El circuito que involucra Crus II, sale por el núcleo dentado hacia el tálamo y el núcleo pontino para conectar con la corteza motora M1, corteza prefrontal dorsolateral y la neocorteza.

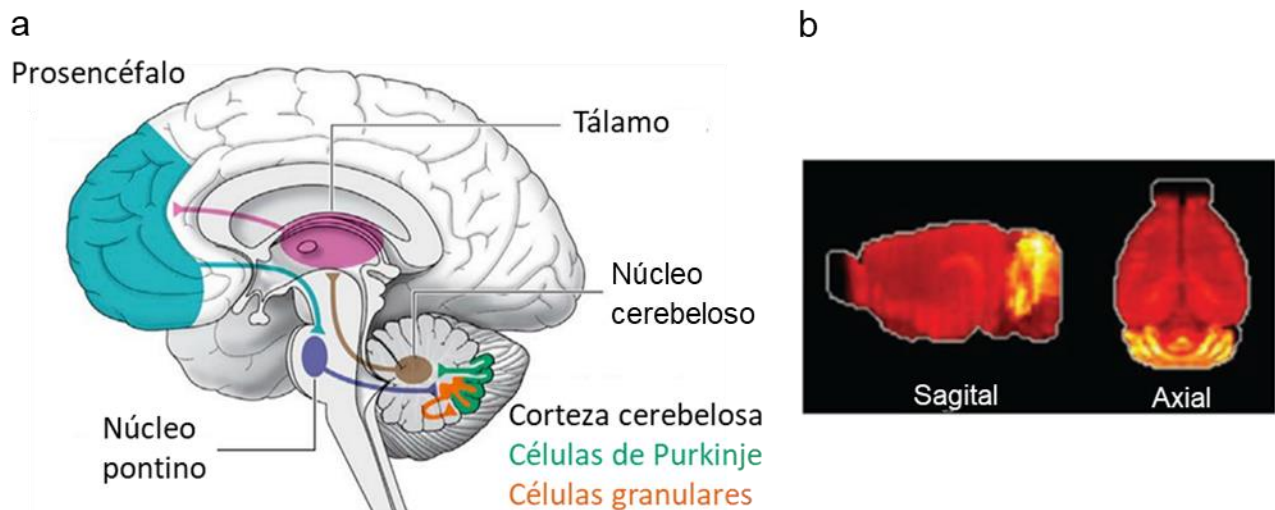


Figura 6. Circuitos cerebelosos y expresión genética involucrados en el TEA. (a) La información proveniente de la corteza prefrontal pasa por el núcleo pontino hacia las células granulares, allí la información es procesada por las células de Purkinje y envía información por el núcleo cerebeloso a la vía

tálamo cortical, imagen de un cerebro de humanos (modificada de Wang et al., 2014). (b) Marcadores genéticos del TEA (ej. *Rims3*, *Astn2*) altamente expresados en el cerebelo de roedores, principalmente en la IGL. Se muestra la proyección de máxima intensidad de la suma de expresión génica en el cerebelo, el mapa de calor muestra sobre-expresión en amarillo (1) y mínima en negro (0), (modificada de Menashe et al., 2013).

En un estudio donde se analizó el perfil de co-expresión de genes asociados al TEA en el cerebro de ratones se identificaron genes sobre-expresados en la corteza cerebelosa co-expresados con genes de TEA, específicamente en la IGL; entre ellos *Rims3*, un transportador glutamatérgico; *Astn2*, asociado con migración neuronal; *Ptchd1*, receptor de Sonic Hedgehog; *Dpp6*, proteasa de serina de unión a canales de potasio activados por voltaje y *Galnt13*, asociado con el metabolismo de proteínas. Algunos de estos genes están asociados a los tipos celulares del cerebelo, tales como Sc, Bc, PCs, oligodendrocitos, pero principalmente a GCs (Menashe et al., 2013).

Por otra parte, la densidad de las PCs se encuentra disminuida en el cerebelo de individuos autistas y en ratas prenatalmente expuestas a VPA (Bailey et al., 1998; Ingram et al., 2000; Skefos et al., 2014; Whitney et al., 2008). Estudios previos reportaron una disminución en la expresión del ARNm de la calbindina, marcador específico de las PCs, en las ratas que fueron prenatalmente expuestas al VPA (Ge et al., 2004). Además, la disminución de la densidad de las PCs no es homogénea, sino que existe un efecto mayor en el vermis cerebelar (Ingram et al., 2000).

Como se mencionó anteriormente, la proteína relina indica el lugar donde las GCs detendrán su migración, por lo que es fundamental para la laminación y maduración de la corteza cerebelosa. Bajos niveles o la ausencia de esta proteína provocan el incremento de la expresión de marcadores para muerte celular programada en las PCs; y esto a su vez, desencadena la muerte de otras células como las GCs y las neuronas olivares (Biamonte et al., 2009; Fatemi et al., 2001; Magliaro et al., 2016). Y de manera interesante, en individuos autistas también se han detectado bajos niveles en la

expresión de relina, sugiriendo un posible mecanismo para la pérdida de PCs en el autismo.

Algunos estudios con imagen por resonancia magnética demostraron alteraciones morfofuncionales en el individuo autista y en el ratón BTBR (Wang et al., 2014). Uno de estos estudios mostró que la materia gris del hemisferio derecho cerebelar, específicamente las regiones Crus I y II, tiene menor volumen en individuos autistas y que esto correlaciona con los principales síntomas del TEA (D'Mello et al., 2015; Dodero et al., 2013).

2.4. Astroglía

Los astrocitos están distribuidos en todo el sistema nervioso, representando hasta el 50% del total de células. En general tienen morfología estrellada, alrededor del soma emanan procesos primarios de hasta 100 μm de largo (Verkhatsky & Nedergaard, 2018), se ramifican para formar elaboradas arborizaciones que se extienden para hacer contacto con otros astrocitos, con sinapsis o con vasos sanguíneos. Existen subtipos de astrocitos morfológicamente distintos, dependiendo de la región a la que pertenecen.

La mayoría de los astrocitos contienen la proteína GFAP en los filamentos intermedios de su citoesqueleto (hasta un 80% en el hipocampo y el cerebelo), por lo que frecuentemente se usa como marcador específico, pero también expresan selectivamente vimentina, S100b, transportadores de glutamato 1 (GLAST) y 2 (GLT-1), glutamina sintetasa, aldehído-deshidrogenasa (ALDH1L1), conexina 43 y 30, aquaporina 4 (AQP4) y al factor transcripcional SOX9 (Verkhatsky & Nedergaard, 2018). La presencia de determinadas isoformas de GFAP y otros marcadores gliales, controla su morfología, el arreglo de sus ramificaciones y su adhesión local (Moeton et al., 2016). Las isoformas de GFAP se encargan de la elongación o retracción de las ramificaciones

en el cerebro sano o en respuesta a distintos tipos de daño neuronal (Yang & Wang, 2015).

Como se mencionó anteriormente, en el cerebelo se encuentran 3 subtipos de astrogliá: astrocitos fibrosos, velados y glía de Bergmann; que pueden identificarse por la presencia de GFAP. Los astrocitos fibrosos residen en la sustancia blanca, del pequeño soma emanan de 3-5 procesos principales que pueden medir hasta 100 μm de largo, son paralelos a los axones neuronales y poco ramificados.

Los astrocitos velados de la IGL del cerebelo son un subtipo de astrocitos protoplasmáticos característicos de la sustancia gris, su soma llega a medir $\sim 10 \mu\text{m}$ y proyecta de 5-10 procesos principales de $\sim 50 \mu\text{m}$ de largo. Los procesos de los astrocitos velados se ramifican varias veces hasta tener una morfología esponjiforme, llegan a cubrir grandes territorios y solo las puntas de los procesos más finos pueden hacer contacto con astrocitos adyacentes, a lo que se le conoce como dominios no traslapados. De manera particular, los astrocitos velados tienen procesos principales que envuelven grupos de GCs y sus dendritas en el glomérulo, en forma de “velo” (Chan-Palay y Palay, 1972). Debido a este arreglo, se especula que los procesos aíslan estas sinapsis y separan grupos de fibras musgosas con diferente información (Hoogland y Kuhn, 2010).

Finalmente, la glía de Bergmann es un tipo de astrocito radial, su soma está alineado con los somas de las PCs y proyectan de 3-6 procesos que se extienden hacia la pía madre, atravesando la ML. Sus procesos se ramifican y se traslapan con las dendritas de las PCs y otras interneuronas, cubriendo de 6,000 – 8,000 sinapsis. Cada PC está rodeada por ~ 8 BG en forma de rosetas (Hoogland & Kuhn, 2010; Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

Los astrocitos están interconectados mediante uniones comunicantes, hemicanales proteicos que permiten la conexión entre sus citoplasmas. En los astrocitos cerebelosos las uniones están constituidas específicamente por las conexinas 43 y 32. Cada par de células se conecta por uniones comunicantes ensambladas por 200 hemicanales aproximadamente. A este tipo de ensamble celular se le conoce como red funcional astrocítica, en la que pueden estar interconectados ~100 astrocitos dependiendo la región. Las uniones comunicantes se pueden activar eléctrica o metabólicamente, permitiendo el paso de iones, metabolitos (ej. ATP) y segundos mensajeros (ej. IP₃), entre otras moléculas pequeñas (<1000 Da), permitiendo la comunicación intercelular (Totland et al., 2020).

Las conexinas 43 son las más abundantes en los astrocitos, especialmente en las BG; mientras que, las conexinas 32 son más abundantes en astrocitos velados del cerebelo (De Vuyst et al., 2006; Tanaka, 2008). A diferencia de las conexinas 43, las conexinas 32 tienen sitios de unión a Ca²⁺, que permiten su apertura a través de cambios en la [Ca²⁺] extracelular (De Vuyst et al., 2006).

El tamaño y forma de las redes astrocíticas se pueden estudiar gracias a la propiedad de difusión de las uniones comunicantes. En diversos trabajos se han inyectado moléculas fluorescentes como el amarillo de lucifer en la BG (Tanaka et al., 2008) y biocitina en astrocitos protoplásmicos de la neocorteza cerebral y del hipocampo; y en astrocitos fibrosos del cuerpo calloso (Haas et al., 2005, Schipke et al., 2008). Los resultados muestran que, en la sustancia blanca, la biocitina permanece en el astrocito fibroso que se inyecta, indicando que los astrocitos no están acoplados. Por otra parte, el amarillo de Lucifer se difunde entre 7-8 BGs; mientras que en la neocorteza, la red astrocítica incluye hasta 180 células dentro de un radio de 600 μm (Haas et al., 2005).

De manera general, los astrocitos regulan el flujo sanguíneo, el metabolismo oxidativo de la glucosa, la homeostasis del agua, amortiguación de K⁺, defensa inmunológica,

producción de factores de crecimiento, neurogénesis, sinaptogénesis y síntesis, liberación y remoción de neurotransmisores en la sinapsis (Verkhratsky & Nedergaard, 2018), constituyendo la sinapsis tripartita. Se ha demostrado que, en esta configuración sináptica, los astrocitos participan activamente gracias a su dinámica de Ca^{2+} (Nedergaard et al., 2010; Zorec et al., 2012).

Los astrocitos poseen un gran repertorio de proteínas de membrana para ejercer estas funciones; tales como, receptores acoplados a proteínas G (de glutamato, acetilcolina, ATP, serotonina, dopamina, histamina, cannabinoide, muscarínicos, adrenérgicos, etc.), canal iónicos activados por ligando (de glutamato, ATP, GABA, glicina, nicotina, acetilcolina), transportadores para transmisores (de ATP, glutamato, glicina, GABA), bombas y transportadores de Na^+ y Ca^{2+} , canales activados por voltaje (permeables a K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-), acuaporinas, canales termosensibles (TRP) y canales intracelulares especializados para regular la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular (receptores de rianodina tipo 3, receptores a IP_3 tipo 2, bomba SERCA de Ca^{2+}) desde la membrana del retículo endoplásmico, principal reservorio de Ca^{2+} (Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

Los astrocitos se caracterizan por tener un potencial de membrana hiperpolarizado, su membrana plasmática tiene una baja resistencia y no producen potenciales de acción; por lo que, la excitabilidad de los astrocitos se basa en cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular, conocida como señalización de Ca^{2+} . Esta forma de activación está codificada espacial y temporalmente; y puede ocurrir de manera espontánea o tras la estimulación eléctrica, mecánica o química de la membrana plasmática, activándose una cascada de señalización que incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citoplasma. Este proceso involucra algunos de los mecanismos extracelulares (receptores acoplados a proteínas G, receptores canal, canales activados por Ca^{2+} , bombas de Ca^{2+} y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) e intracelulares (receptores de rianodina, receptores de IP_3 , bomba SERCA, proteínas citoplasmáticas de unión a Ca^{2+}), mencionados anteriormente. Un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular puede ocurrir de manera transitoria en diferentes regiones de la célula (soma o ramificaciones) y propagarse hacia otras regiones de la célula, a estos eventos se les

llama transitorios de Ca^{2+} . Asimismo, estos transitorios pueden propagarse hacia otras células formándose ondas de calcio (Fujii et al., 2017; Verkhratsky et al., 2012).

La señalización de Ca^{2+} se puede estudiar en diferentes preparaciones *in vitro* e *in vivo* registrando los transitorios de Ca^{2+} en tiempo real, mediante indicadores de Ca^{2+} sintéticos (verde fluorescente) como el Fluo4-AM, Fluo5F-AM y oregon green BAPTA-1-AM que se internalizan principalmente en astrocitos gracias a su alta permeabilidad de membrana (Ikegaya et al., 2005; Reeves et al., 2011). Sin embargo, para distinguir a los astrocitos de las neuronas, es necesario el uso de otros marcadores específicos de astrocitos (rojo fluorescente) como las sulforodaminas SR-101 o SR-B (Appaix et al., 2012; Nimmerjahn et al., 2004). También se pueden usar marcadores genéticos (G-CaMP2) que se activan bajo el promotor de GFAP o GLAST, la señal puede durar días; sin embargo, tienen la desventaja de tener baja afinidad por el Ca^{2+} (Hoogland & Kuhn, 2010).

Los **transitorios de Ca^{2+}** en los procesos tienen una cinética distinta a los transitorios de los somas, ya que en los procesos tienen mayor frecuencia y ocurren tanto de la entrada de Ca^{2+} extracelular mediada por TRPA1, mGluR2, mGluR3, bomba Na^+ , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ como de la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico mediada por IP_3 -R2. Mientras que en el soma dependen solo de la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. Este tipo de eventos también pueden ocurrir espontáneamente en microdominios intracelulares; es decir, en sitios específicos de los procesos o del soma y también pueden propagarse hacia otro sitio intracelular en forma de onda. El transitorio de Ca^{2+} provoca la liberación vesicular de transmisores como el ATP, GABA y glutamato, produce la expresión de transportadores transmembranales, modifica la $[\text{Na}^+]$ y $[\text{K}^+]$ aumentando la probabilidad de que ocurran potenciales de acción en las neuronas adyacentes y la consiguiente liberación de neurotransmisores. La liberación de ATP, tras la activación de receptores P2X o P2Y, provoca la propagación de una onda de calcio a lo largo de la célula (Bazargani & Attwell, 2016).

La cinética de las **ondas de calcio** depende de la región cerebral, se requiere un tipo de estimulación específico para su activación, puede ser eléctrico, mecánico o químico. A diferencia de los transitorios, la duración es mayor e involucra decenas o cientos de astrocitos interconectados por uniones comunicantes, pero las ondas están espacialmente delimitadas (Schipke et al., 2008, Hoogland et al., 2009). Se han reportado dos vías de propagación de la onda de calcio tras la activación de un astrocito: 1) el aumento de la $[IP_3]$ intracelular en el astrocito activado produce la liberación de Ca^{2+} intracelular desde el retículo endoplásmico; y a su vez, el IP_3 se difunde a los astrocitos vecinos por uniones comunicantes, incrementando la $[Ca^{2+}]$ intracelular en esas células adyacentes; 2) el aumento de la $[Ca^{2+}]$ intracelular del astrocito activado provoca la liberación vesicular de ATP al espacio extracelular, activando los receptores purinérgicos de las células vecinas; estos a su vez incrementan su $[Ca^{2+}]$, $[IP_3]$ y liberan más ATP, activando más células, incluyendo la activación de receptores neuronales cercanos (Haas et al., 2006).

En la onda de calcio, los astrocitos se activan con un retraso de 1 – 2 s después de un estímulo eléctrico, alcanza el 50% de su amplitud máxima entre 2 – 7 s (Schipke et al., 2008). Generalmente, la onda de calcio en la sustancia gris (neocorteza e hipocampo) se propaga hacia cientos de astrocitos de manera circular a partir de la zona del estímulo, dentro de un área de 400 – 600 μm y a una velocidad de 10 – 20 $\mu m/s$ (en roedores de P10-P14). Esta forma de propagación es congruente con la forma y tamaño de los ensambles astrocíticos de uniones comunicantes reportados en la neocorteza, sugiriendo que la onda de calcio se propaga mediante las uniones comunicantes (Haas et al., 2006, Peters y Kettenmann, 2003, Schipke et al., 2008). Además, los astrocitos que se encuentran a más de 100 μm de la zona de estímulo dejan de presentar ondas de calcio en presencia de bloqueadores de conexasinas, indicando que las uniones comunicantes son cruciales para la propagación de la onda de calcio de larga distancia (Haas et al., 2006).

De manera interesante, en la corteza cerebelosa se observa un patrón elíptico inusual. Un estudio reportó transitorios de Ca^{2+} espontáneos que inician en un punto subcelular de las BG (soma o procesos), este se propaga radialmente y luego hacia otros procesos, en dirección a la pía madre. Esta propagación ocurre en un área de $\sim 40 \mu\text{m}$ en forma elipsoidal, tanto en un eje paralelo a las fibras paralelas (involucrando ~ 3 BG), como en un eje paralelo al eje pia-GL (involucrando ~ 18 BG). Mientras que los registrados en astrocitos velados alcanzan el 50% de la máxima extensión ($\sim 50 \mu\text{m}$) en 2-3 s, con una duración de ~ 10 s y también son elipsoidales. Esta actividad espontánea se bloqueó con antagonistas de receptores purinérgicos hasta un 12% de la amplitud, indicando que dependen de la señalización de ATP (Hoogland et al., 2009). El mismo grupo reportó que las ondas de calcio activadas localmente por ATP en la pía, en la ML y en la PL, producen una onda de calcio elipsoidal en las mismas direcciones y son bloqueadas por antagonistas de receptores purinérgicos hasta un 53% de la amplitud, indicando también la participación del sistema purinérgico en la producción de la onda de calcio.

Existen pocos estudios que analicen la función de la señalización de calcio en la corteza cerebelosa. Sin embargo, se sabe que la BG expresa receptores a GABA tipo A, transportadores GLAST y receptores AMPA, que se activan por elevaciones de glutamato en el espacio sináptico debido a la estimulación de fibras musgosas o trepadoras, provocando plasticidad de corta duración. Los receptores AMPA regulan el crecimiento de las ramificaciones radiales de la BG en contacto con las sinapsis de las PCs y también asegura el correcto ensamble entre PCs y fibras trepadoras. La liberación de glutamato en el espacio sináptico y la activación de receptores metabotrópicos activa la señalización de Ca^{2+} en la BG. Se ha demostrado que la señalización de Ca^{2+} regula el flujo sanguíneo, la excitabilidad neuronal y la neuroprotección. Existen 3 tipos de señalización de Ca^{2+} en la BG que involucran interacción sináptica, altamente compartimentalizada (pocas), ondas radiales (decenas) y activación simultánea a gran escala (cientos). Por otra parte, se sabe muy poco sobre la función de los astrocitos velados, se especula que su participación en la sinapsis tripartita de los glomérulos incluye la remoción de glutamato, liberación de transmisores y dinámica estructural

(revisado en Hoogland y Kuhn, 2010). Asimismo, se determinó que la disminución de los transitorios de Ca^{2+} en el cerebelo es necesario para completar la migración de GCs (Kumada y Komurom 2004).

2.4.1 Los astrocitos cerebelosos en el TEA

Los estudios *post mortem* sobre la expresión de marcadores gliales en el TEA demostraron una expresión elevada, tanto del ARNm como de la proteína ácido gliofibrilar (GFAP) en el cerebelo adulto (Bailey et al., 1998; Edmonson et al., 2014; Laurence & Fatemi, 2005; Pacey et al., 2015; Vargas et al., 2005); también se han reportado niveles elevados de citocinas proinflamatorias liberadas por astrocitos en el cerebelo y en otras preparaciones como el líquido cefalorraquídeo y el plasma sanguíneo de niños autistas que demuestran un proceso inflamatorio (Vargas et al., 2005). El aumento en la expresión de la GFAP se asocia al aumento del número o tamaño de los astrocitos ya sea del soma o de sus ramificaciones, mismo que se ha observado en pacientes con TEA y en modelos animales (Bronzouli et al., 2018; Vargas et al., 2005).

La evidencia experimental sobre la relevancia de los astrocitos cerebelosos en la etiología del TEA es limitada en las etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, en otras regiones del cerebro de roedores se ha demostrado que las alteraciones en la proliferación de astrocitos, en la síntesis de transportadores y receptores en los astrocitos producen conductas similares a las del TEA. Tal es el caso de la deficiencia del transportador de glutamato GLT-1 y del receptor $\text{IP}_3\text{R}2$ en la corteza prefrontal, los cuales provocan conductas repetitivas y problemas de interacción social. Asimismo, en el ratón transgénico deficiente de $\text{IP}_3\text{R}2$ se observó una disminución en la liberación y un incremento en degradación de ATP en la corteza prefrontal de roedores, probablemente mediante receptores P2X2 o de la transmisión sináptica GABAérgica en la corteza prefrontal, que produce conductas similares a las del TEA (Wang et al., 2021). Las alteraciones cerebrales asociadas a los astrocitos en los periodos cruciales de la neuro y gliogénesis puede tener consecuencias graves en su propio desarrollo.

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El TEA es un trastorno del neurodesarrollo en el que se presentan deficiencias en la conducta social y habilidades sensoriomotoras que están asociadas a cambios estructurales y funcionales del cerebelo; tales como una disminución de la densidad de células de Purkinje y sus arborizaciones dendríticas, deficiencias en la transmisión sináptica de las células de Purkinje y la migración prematura y apoptosis aumentada de los precursores de células granulares. Durante la etapa postnatal, la astrogliía permite la migración de estos precursores neuronales (células de Purkinje y células granulares), participa en la sinaptogénesis y en el mantenimiento de las sinapsis mediante su señalización de calcio. Sin embargo, se desconoce si la señalización de calcio en redes glio-neuronales del cerebelo se encuentra modificada, basados en el aumento de los niveles de la proteína GFAP reportados en esta región. La actividad de calcio en la red glio-neuronal podría representar un marcador biológico para las deficiencias en la transmisión neuronal en el TEA.

4. HIPÓTESIS

En la capa granular interna del cerebelo de ratones prenatalmente expuestos a ácido valproico, el aumento de la densidad y complejidad morfológica de los astrocitos origina ondas de calcio de mayor extensión debido a un mayor reclutamiento celular y una mayor amplitud de los transitorios de Ca^{2+} individuales.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Investigar si la densidad y complejidad morfológica de los astrocitos, la extensión funcional de la onda de calcio evocada, el número de células reclutadas y la amplitud promedio de los transitorios de calcio, aumentan en los ensambles glio-neuronales de la capa granular interna del cerebelo en las crías prenatalmente expuestas a VPA.

5.2 PARTICULARES

- Determinar si las crías expuestas prenatalmente a VPA presentan deficiencias sensoriomotoras y una menor densidad de células de Purkinje.
- Investigar el efecto de la exposición prenatal a VPA sobre la expresión de GFAP, la densidad y la morfología de los astrocitos en la capa granular del cerebelo en P8.
- Estudiar la extensión funcional de las ondas de calcio tras la activación eléctrica de la capa granular interna del cerebelo de ratones tratados prenatalmente con VPA.
- Estimar el número y la fracción de las células reclutadas que corresponde a la astrogía en la onda de calcio evocada.
- Estimar la amplitud promedio de los transitorios de Ca^{2+} en las células reclutadas.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cuidado y mantenimiento de animales

Los animales se manipularon de acuerdo con la Guía de Salud del Instituto Nacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y del Comité Institucional sobre el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del INB, UNAM; el proyecto se registró con el número 86.A y se cumple con la NOM-062-ZOO-1999. Todos los animales se mantuvieron a temperatura controlada, con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad y con agua y comida *ad libitum*. Los ratones hembra de ambas cepas, CD-1 y transgénicas GFAP-eGFP (la proteína verde fluorescente se expresa bajo el promotor de GFAP; Nolte et al., 2001), se mantuvieron separadas individualmente a partir del día embrionario 0 (E0), el cual fue confirmado mediante la presencia del tapón vaginal y el aumento de peso.

6.2 Modelo del Trastorno del espectro autista en el ratón

El VPA (Sigma-Aldrich) se diluyó en solución salina esterilizada al 0.9% (vehículo) a una concentración de 100 mg/mL. Las ratonas preñadas se inyectaron intraperitonealmente con una solución salina (0.9%; grupo control = CTL) o de VPA (grupo VPA: 500 mg/kg para la cepa CD1 y 300 mg/kg para la cepa GFAP-eGFP) en una dosis única suministrada en el día E12.5.

El día de nacimiento de las crías se consideró como día postnatal 0 (P0) y se registró el número de crías por camada de cada grupo experimental (CTL y VPA). Las crías se destetaron en el día postnatal 21 (P21). Adicionalmente se registró el peso corporal y del cerebro en tres etapas del desarrollo postnatal (P1, P8 y P18). En el desarrollo de este estudio solo se utilizaron las crías macho, ya que el TEA tiene una prevalencia masculina (4:1), además las alteraciones en la conducta social son más notables en los machos

prenatalmente expuestos a VPA en comparación con las hembras (Kim et al., 2013; Melancia et al., 2018; Perez-Pouchoulen et al., 2016).

6.3 Pruebas conductuales

6.3.1 Evaluación sensoriomotora en la identificación del nido

La prueba de reconocimiento del nido evalúa el desempeño sensoriomotor (Gregory y Pfaff, 1971; Mony et al., 2016; Favre et al., 2013; Kazlauskas et al., 2016; Al Sagheer et al., 2018; Schneider y Przewlocki, 2005). La cama de aserrín con el nido se mantuvo sin cambio desde el día del nacimiento hasta el día de la prueba (P8).

Para esta prueba se utilizaron 10 y 13 camadas para los grupos CTL ($n_{CTL} = 35$) y VPA ($n_{VPA} = 47$), respectivamente. En una caja de 18x32 cm con una vista horizontal, se colocó en un extremo aserrín del nido sobre un área de 5x20 cm² y en el otro extremo se colocó una cantidad igual de aserrín limpio quedando una distancia de 20 cm entre ambas camas. La cría se colocó justo en medio quedando a 10 cm de distancia hacia cada cama de aserrín (ver figura 7). Se midió el tiempo que tardan las crías en llegar al aserrín del nido (latencia), considerando que las patas delanteras y/o la cabeza cruzarán el límite del aserrín. La caja se limpió con alcohol, agua destilada y fue secada antes de repetir la prueba con otro individuo (Favre et al., 2013).

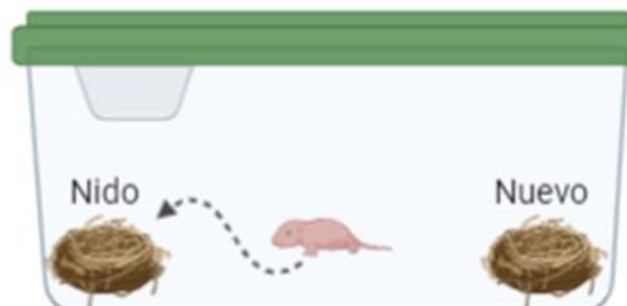


Figura 7. Reconocimiento del nido. La imagen muestra la prueba de sensoriomotora del reconocimiento del nido, en donde se colocan aserrín del nido y aserrín limpio a 10 cm del sujeto que se está analizando, todo dentro de una caja de acrílico comúnmente utilizada para mantener ratas.

6.3.2 Reflejo de enderezamiento

Para evaluar habilidades motoras por medio de la prueba de enderezamiento, se utilizaron 4 y 3 camadas CTL ($n_{CTL} = 16$) y VPA ($n_{VPA} = 12$), respectivamente. Esta prueba se realizó de P5 a P10. Cada ratón se colocó suavemente en posición supina (boca arriba) sobre una mesa lisa, extendiendo y sujetando sus cuatro patas para mantener una postura estable (la parte dorsal en completo contacto con la superficie), inmediatamente después se registró el tiempo (latencia) que tarda en enderezarse y ponerse en cuatro patas (Didonato y Bodganik, 2011). El procedimiento se repitió tres veces para cada individuo, con intervalos de 5 min (ver figura 8).

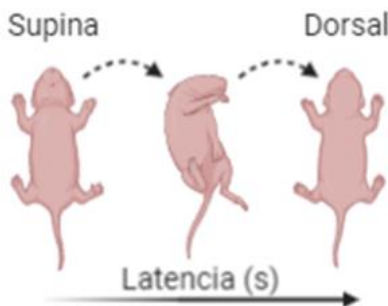


Figura 8. Reflejo de enderezamiento. Imagen que muestra la prueba de reflejo de enderezamiento en donde se coloca al sujeto de prueba en posición supina y se mide la latencia para ponerse en posición dorsal.

6.3.3 Interacción Social

La prueba de interacción social se realizó en un ambiente nuevo e involucra al ratón de prueba (P18-P21), un ratón de la misma camada (familiar) y otro de una camada distinta (extraño). En esta prueba se utilizaron 5 camadas para cada grupo experimental CTL ($n_{CTL} = 15$) y VPA ($n_{VPA} = 18$), algunos de los ratones que obtuvieron latencias mayores

a 100 s en la prueba de identificación del nido, fueron utilizados para esta prueba. Con esta prueba se determina si el sujeto tiene dificultades en la interacción social al presentar una mayor latencia en la aproximación social con un sujeto extraño.

Se utilizó una caja rectangular de acrílico dividida en tres compartimientos comunicados, el ratón de prueba se colocó en el compartimiento central por un periodo de habituación de 10 min, seguido de 1 min de exploración libre en los compartimientos laterales. Inmediatamente después de este tiempo, el ratón se regresó a la parte central y en cada compartimiento lateral se colocaron los ratones familiar y extraño, cada uno dentro de una jaula de acrílico de $5 \times 5 \times 15 \text{ cm}^3$ (ver figura 9). En el periodo experimental, se tomó el tiempo que el ratón de prueba tardó en aproximarse al sujeto extraño. El tiempo máximo de la prueba fue de 8 min, considerándose en el análisis estadístico.



Figura 9. Aproximación social. Imagen que muestra la prueba de aproximación social en donde se utilizó una caja de 3 cámaras para evaluar la latencia de aproximación a un sujeto extraño *versus* uno familiar.

6.4 Western blot

Para evaluar el nivel de las proteínas calbindina y GFAP, los cerebelos completos de las crías macho P8 de los grupos CTL y VPA, se extrajeron rápidamente en nitrógeno líquido. Los cerebelos fueron homogenizados (4 cerebelos cada uno, $n = 16$ de 4 camadas) en $300 \mu\text{L}$ del buffer de lisis (150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl a un $\text{pH} = 7.5$, 5 mM de EDTA, 0.1% v/v NP-40, 1 DTT, 0.2 mM de Ortovanadato de sodio y 0.23 mM de PMSF) adicionando $10 \mu\text{L}/\text{mL}$ de un concentrado de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, USA). El homogenado se centrifugó a $12,000 \text{ xg}$ por 15 min a 4°C . Los sobrenadantes

se separaron en alícuotas y se mantuvieron a -80°C . La concentración de proteína para cada muestra se determinó por el método de Bradford, se cuantificó midiendo la absorbancia a 595 nm usando un espectrofotómetro Varioskan™ Flash Multimode Reader.

Un volumen equivalente a 15 μg de proteína por cada muestra se mezcló con el buffer de carga (100% de glicerol, 125 mM Tris-HCl a un pH = 6.8, 4% SDS, 0.006% azul de bromofenol y 2% de mercaptoetanol), se calentó por 5 min y se corrió en un gel de 10% de poliacrilamida con dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) a 60-80 V por 3 h. El gel con las proteínas separadas se transfirió electroforéticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) usando un mini-trans blot de transferencia electroforética (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a 100 V por 1 h. Las membranas fueron bloqueadas con un buffer Tris-salino (TBS: 10 mM de Tris-Base de pH = 7.5, 150 mM de NaCl; adicionando 5% de leche seca sin grasas y 0.1% de tween 20) durante 3 h a 4°C .

Las soluciones de bloqueo se descartaron y las membranas se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-Calbindina generado en cabra (Calbindina-D28K (C-20), Santacruz) 1:2000, con el anticuerpo policlonal anti-GFAP generado en conejo 1:2000 (DakoCytomation) y con el anticuerpo policlonal anti-Actina 1:2000 (Sigma Aldrich), el cual fue utilizado como control interno para cada muestra. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS por 5 min cada uno. Posteriormente, se incubaron 3 h con los anticuerpos secundarios anti-conejo generado en cabra (Santacruz) y anti-cabra generado en conejo (Santacruz), ambos a una dilución de 1:3000, adicionando fosfatasa alcalina conjugada con los anticuerpos secundarios para cada membrana (ver tabla 2). Después de los lavados, la actividad de la fosfatasa alcalina se detectó con fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil disódico/cloruro de nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT, por sus siglas en inglés). El nivel de expresión se calculó en unidades arbitrarias utilizando actina como control (Varman et al., 2018).

6.5 Histología

Con el objetivo de medir la densidad de PCs y astrocitos mediante inmunofluorescencia se montaron cortes histológicos del cerebelo. Las crías macho P8 de ambos grupos experimentales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital y fijados con paraformaldehído (PFA, por sus siglas en inglés) al 4% en solución amortiguadora de fosfatos al 0.1 M (PBS, por sus siglas en inglés). Los cerebros se crioprotegieron en sacarosa al 30%. Se obtuvieron cortes horizontales del cerebelo de 40 μm de grosor con un criostato (Leica CM1850), las secciones se recolectaron en una solución anticongelante (30% etilenglicol – 30% sacarosa en PBS) y se almacenaron a -20° C hasta su procesamiento (Reyes-Haro et al., 2015).

6.6 Inmunofluorescencia

En este estudio se siguió la técnica de inmunofluorescencia por flotación para analizar la densidad celular. Se utilizaron 3 camadas de los ratones de la cepa CD-1 de ambos grupos experimentales ($n_{\text{CTL}} = 6$, $n_{\text{VPA}} = 6$). De cada animal, se seleccionaron 3 tejidos que contenían las regiones cerebelares de interés (Crus I/II) y se lavaron 3 veces con PBS (mM: 138 NaCl, 3 KCl, 8.1 Na_2HPO_4 , 1.5 KH_2PO_4 , pH 7.4) durante 10 min cada uno. Posteriormente se incubaron durante 1 h en solución bloqueadora (suero de albumina de burro a una dilución de 1:50 y Tween-20 al 0.2% en PBS) a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron durante 24 h en agitación continua (50 rpm) con los anticuerpos primarios.

De manera independiente, se usó anti-GFAP monoclonal (DAKO) generado en conejo a una dilución de 1:1000, anti-calbindina D-28K policlonal (Santacruz, Dallas, TX, EU) generado en cabra a una dilución de 1:800. Para cada anticuerpo primario se utilizaron los correspondientes anticuerpos secundarios, Alexa 488 anti-conejo o Alexa 594 anti-cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA, EU), cada uno a una dilución de 1:1000 durante 2 h a temperatura ambiente. Los tejidos se lavaron 3 veces de 10 min cada una con PBS.

Finalmente, para marcar los núcleos, se incubaron 30 min con 4' 6-diamino-2-fenil-indol (DAPI, por sus siglas en inglés; de Molecular Probes) a una dilución de 1:15000. Los cortes se montaron sobre portaobjetos previamente gelatinizados y para proteger la fluorescencia se usó Vectashield H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EU).

Para los ratones transgénicos GFAP-eGFP ($n_{CTL} = 3$, $n_{VPA} = 4$; 3 camadas para cada grupo) se siguió la misma técnica histológica, se seleccionaron por triplicado los tejidos que contenían las regiones Crus I y II, posteriormente se lavaron 3 veces de 10 min cada una y se incubaron con DAPI usando la dilución antes mencionada, cuando no se utilizó anticuerpo primario para los ratones transgénicos eGFP-GFAP (ver tabla 2).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia y western blot.

Anticuerpos	Dilución	Núm. Cat.	Marca
Anti-Calbindina D28K policlonal purificado de cabra	1:2000 WB 1:800 IF	C2715	Santacruz
Anti-GFAP policlonal purificado de conejo	1:2000 WB 1:1000 IF	N1506	DakoCytomation
Anti-Actina policlonal purificado de conejo	1:2000 WB 1:1000 IF	A2066	Sigma Aldrich
Anti-Relina monoclonal purificado de ratón	1:800 IF	MAB5364	Milipore
Anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado con fosfatasa alcalina	1:3000 WB	SC2057	Santacruz
Anti-IgG de cabra hecho en conejo conjugado con fosfatasa alcalina	1:3000 WB	SC2771	Santacruz
Alexa Fluor 488 anti-IgG de conejo	1:1000	A-21206	Invitrogen
Alexa Fluor 594 anti-IgG de ratón	1:1000	A-21203	Invitrogen
Alexa Fluor 594 anti-IgG de cabra	1:1000	A-11058	Invitrogen
4' 6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI)	1:15000	D1306	Molecular Probes

Western blot (WB), Inmunofluorescencia (IF).

6.7 Conteo celular

Para determinar la densidad de PCs y astrocitos en los cortes histológicos, se utilizó un método automatizado previamente reportado (Varman et al., 2018). Brevemente, se

adquirieron tres imágenes por corte de la capa granular de las regiones Crus I, Crus II y el vermis del lóbulo VII ($n_{CTL} = 3$, $n_{VPA} = 4$, en muestras triplicadas) con un microscopio de epifluorescencia Axio Imager Z1 acoplado a una cámara digital AxioCam y un microscopio confocal Zeiss LSM 780 (Zeiss, Germany) y objetivos de 40x. Las imágenes se editaron con el programa Zen2012 Blue Edition y se procesaron con ImageJ. Los campos visuales tenían una dimensión de 50 x 200 μm sobre la IGL, que fue identificada por encontrarse delimitada por sustancia blanca y somas de la PL. Los somas celulares se contaron automáticamente con el programa CellProfiler 2.1.1, discriminando el tamaño, la forma y separación de las células. Los datos se presentan como el número de células inmunorreactivas para calbindina o células GFP⁺, en un área total de 50 x 200 μm .

6.8 Análisis morfológico tridimensional de astrocitos

El análisis morfológico de los astrocitos se realizó siguiendo un protocolo automatizado previamente reportado (ver apéndice V), en cortes histológicos horizontales de 40 μm (Reyes-Ortega et al., 2020). Brevemente, se utilizó un microscopio confocal LSM 780 de Zeiss (Zeiss, Germany) y una amplificación de 63x, para adquirir 3 imágenes con proyección en Z de astrocitos de la IGL de las regiones Crus I y II en muestras triplicadas por región y por grupo experimental ($n = 4$). Con el programa image J, las imágenes se cortaron digitalmente para obtener cubos con la señal de un solo astrocito en los 3 ejes dimensionales. Así, estas imágenes se analizaron con la secuencia de comandos 3DMorph basado en MATLAB (York et al., 2018). Las células individuales ($\text{Células}_{CTL} = 426$ and $\text{Células}_{VPA} = 445$) se procesaron en una configuración de esqueleto 3D, manteniendo todas las ramificaciones. Se estimó el volumen celular, el número de puntos de ramificación y longitud de las ramificaciones para cada célula. En las gráficas, el tamaño de la muestra (n) representa el promedio del número de células por animal (ver apéndice V).

6.9 Preparación de rebanadas

Con el objetivo de caracterizar la onda de calcio en la IGL se obtuvieron rebanadas *in vivo*. Los cerebros de ratones macho de la cepa CD-1 de P7-P9 de ambos grupos experimentales se obtuvieron por decapitación. Las rebanadas se obtuvieron siguiendo un protocolo previamente reportado (Reyes-Haro et al., 2013). Brevemente, los cerebelos se cortaron con un vibratomo (VT1000s, Leica) en rebanadas coronales de 250 μm de grosor en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF, por sus siglas en inglés); su composición en mM: 134 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.25 K₂HPO₄, 10 glucosa, pH = 7.4. Por cada cerebelo se obtuvieron de dos a tres rebanadas que incluían las regiones Crus I y Crus II, estas fueron mantenidas en aCSF oxigenado, a temperatura ambiente, por al menos 30 min para permitir la recuperación de daño mecánico. Posteriormente se incubaron con 10 μM del indicador de Ca²⁺ Fluo4-AM (AAT Bioquest) por 30-45 min a 37° C, seguido de 30-40 min en aCSF oxigenado a temperatura ambiente.

Se colocó una rebanada en una cámara de perfusión en un microscopio vertical (BX51WI, Olympus) y se inmovilizó con un anillo de platino con hilos de nylon transversales con el fin de evitar cualquier movimiento durante el registro. Las rebanadas se perfundieron con aCSF oxigenado (2 mL/min) a temperatura ambiente (20 – 22° C). Los fluoróforos Fluo4-AM y sulforodamina B (SRB), se excitaron con un módulo LED para microscopio de luz (X-Cite X-LED1 lumen Dynamics) BDX (450-495 nm) y GYX (540-600 nm), respectivamente. Los registros de Ca²⁺ se adquirieron con un objetivo de 20x/0.35 (X LUMPlan FLN, Japan), una cámara con sistema de enfriamiento rápido SensiCam-sCMOS, pco.edge 4.2 y el programa Micro Manager 1.4.

6.10 Ondas de calcio evocadas

La evocación de las ondas de calcio por despolarización se realizó siguiendo un protocolo previamente reportado (Labrada-Moncada et al., 2020). Brevemente, se utilizaron micropipetas de borosilicato con un diámetro de apertura de ~20 μm (1 – 2 M Ω) que se

obtuvo con un estirador de pipetas (P97, Sutter Instruments Company, Novato, CA). La micropipeta de estimulación se cargó con aCSF y la punta se colocó suavemente sobre la superficie de la IGL en la rebanada cerebelosa. La onda de calcio se evocó aplicando 20 pulsos de 200 μ A por dos segundos (10 Hz). Los pulsos se generaron con un amplificador para patch-clamp (HEKA Elektronik) y un estimulador de corriente constante (DAGE-MTI). La amplitud de corriente se seleccionó con base en una curva de calibración (cinco amplitudes de corriente de 200 a 600 μ A con incrementos de 100 μ A) en la que se estimó la extensión máxima de la onda de calcio (ver tabla 3). La onda de Ca^{2+} se reprodujo varias veces dentro de la misma región, con un tiempo de recuperación entre estimulaciones de 5 min.

Tabla 3. Estandarización de la amplitud de corriente.

Amplitud (mA)	Extensión máxima \pm SEM (μ m)	Número de rebanadas	Valor p
200	370 \pm 58	5	
300	271 \pm 24	7	0.12
400	240 \pm 24	5	0.17
500	283 \pm 60	3	0.23
600	150 \pm 76	3	0.02*

Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar de la muestra. El tamaño de la muestra fue $n_{\text{CTL}} = 23$ en total. El análisis estadístico aplicado fue Shapiro-Wilk y ANOVA de una vía seguido de una comparación múltiple de Holm-Sidak con respecto a la amplitud de 200 mV. * $p < 0.05$.

Para identificar las células reclutadas durante la propagación de la onda de calcio, los valores de los píxeles de la primera imagen se restaron del resto de las imágenes del video, se ajustó el brillo y el contraste, el ruido de fondo se eliminó digitalmente y se aplicó un filtro de promedios a todas las imágenes del video. Posteriormente se realizó una proyección en z para visualizar la longitud máxima de la extensión de la onda y se sobrepuso una capa de círculos concéntricos con incrementos de 50 μ m de radio, donde la punta de la pipeta sería el epicentro (Haas et al., 2006; Peters et al., 2018; Schipke et al., 2008). La velocidad de propagación se definió como la longitud máxima dividida por la

diferencia de tiempo ($t_1 - t_0$), donde t_0 fue el tiempo en el que las primeras células fueron activadas inmediatamente después del estímulo y t_1 fue el tiempo cuando las células más lejanas se activaron (ver apéndice VI).

Los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se presentaron como el porcentaje del incremento relativo de la fluorescencia $\Delta F = \Delta F/F_b$, donde ΔF es el cambio relativo de la fluorescencia sobre la fluorescencia basal F_b . F_b se calculó promediando la fluorescencia de los primeros 15 s de registro, donde no había incrementos de la fluorescencia en respuesta al estímulo eléctrico. El área bajo la curva se calculó usando la regla trapezoidal, la cual es un método de integración numérica que considera varios trapecios pequeños bajo la curva, donde las unidades arbitrarias representan el porcentaje de ΔF en función del tiempo en segundos, describiendo tanto la amplitud como la duración de la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ver apéndice VII).

6.11 Marcaje de astrocitos con sulforodamina B

La SRB es un marcador rojo fluorescente que no se traslapa con la señal verde del indicador de calcio. Es una molécula pequeña y altamente polar, que cruza la barrera hematoencefálica después de ser introducida al torrente sanguíneo, por medio de una inyección intravenosa. Se sugiere que la SRB, se acumula en el espacio perivascular entre la membrana de las puntas de las ramificaciones astrocíticas y la lámina basal; y se internaliza a los astrocitos a través de conexinas 43, después de 2 h post-inyección. Además, la SRB también se difunde por uniones comunicantes que tienen con otros astrocitos de una red funcional y la señal se mantiene más de 5 h (Appaix et al., 2012).

Para determinar si la SRB es selectiva para los astrocitos, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con SRB (20 mg/kg) 3 - 4 h antes de la obtención de rebanadas (Appaix et al., 2012; Nimmerjahn, et al., 2004). La selectividad de la SRB por los astrocitos se comprobó con los ratones transgénicos GFAP-eGFP. Nuestros resultados mostraron que el $84 \pm 2\%$ de las células GFAP-eGFP⁺ incorporaron SRB en la IGL de las regiones Crus I y II del cerebelo ($n = 12$, $N = 3$, muestras triplicadas). Corroboramos

que la SRB marca la mayoría de las células astrocíticas (ver figura 10); por lo que este marcador se utilizó para identificar a los astrocitos reclutados en la onda de calcio.

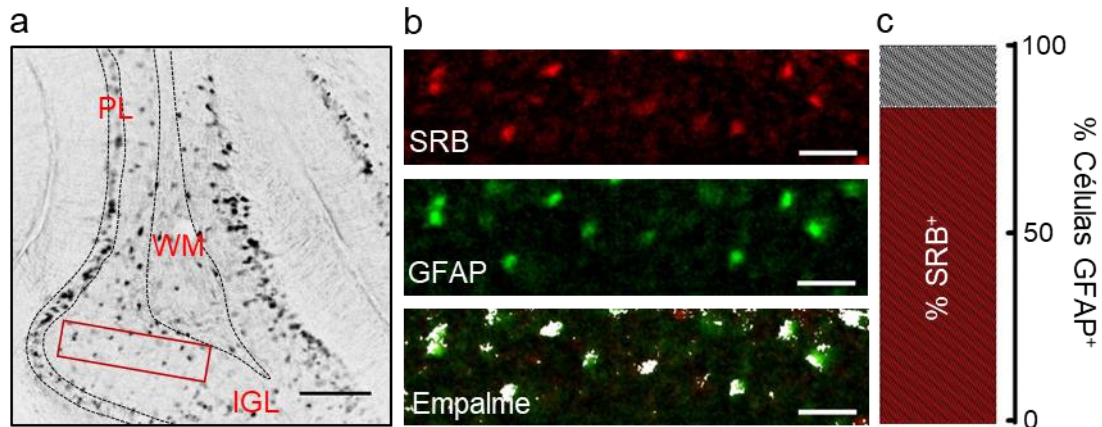


Figura 10. La sulforodamina B (SRB) marca células GFP⁺ del ratón transgénico GFAP-eGFP. (a) Imagen de la señal de SRB en la region Crus II, el rectángulo rojo muestra la capa granular interna (IGL). Barra de calibración 100 mm. (b) Acercamiento de la IGL en (a), mostrando células SRB⁺ y GFAP⁺ y el empalme de ambas señales. (c) Gráfica que muestra el porcentaje promedio de células GFAP⁺ (~80%) que colocalizan con SRB (n = 8, N = 3). PL, capa de Purkinje; WM, sustancia blanca.

6.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Origin Lab 8.0 (Origin Laboratories, Northampton, MA, USA) e incluyó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar una distribución normal, las pruebas de t-Student o Mann-Whitney para analizar diferencias entre los grupos CTL y VPA en poblaciones con distribución normal y no normal, respectivamente. Los valores de p menores a 0.05 se consideraron significativos. Los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar. Para los experimentos conductuales e histológicos, el tamaño de la muestra (n) representa el número de animales usados, mientras que N representa el número de camadas. Por otro lado, para los experimentos de imagen de calcio, n representa el número de rebanadas, mientras que N es el número de animales usados.

7. RESULTADOS

7.1 El tamaño de la camada disminuye en el modelo VPA

Primero se registró el número de crías nacidas por camada en los 3 primeros días postnatales, ya que se sabe que el VPA tiene un efecto teratogénico. El número de crías disminuyó significativamente (20%, $p = 0.04$) en el grupo VPA con respecto al grupo CTL (ver figura 11). En el grupo control se tuvieron en promedio 13.1 ± 0.6 crías por camada ($N = 10$), mientras que en el grupo VPA solo 10.5 ± 0.9 crías por camada ($N = 12$). Algunas de las crías tratadas con VPA nacieron con la cola torcida, sin otros signos de teratogenicidad. Estos datos sugieren que el VPA disminuye el tamaño de la camada (ver figura 11).

Adicionalmente, se registró el sexo de las crías por camada para determinar si la proporción hembras/machos cambiaba por la exposición prenatal al VPA en comparación con el grupo control. Los datos no presentaron diferencias en el número de hembras y machos nacidos por camada ($p = 0.9$), manteniendo una relación de 1:1 en ambos grupos (datos no mostrados).

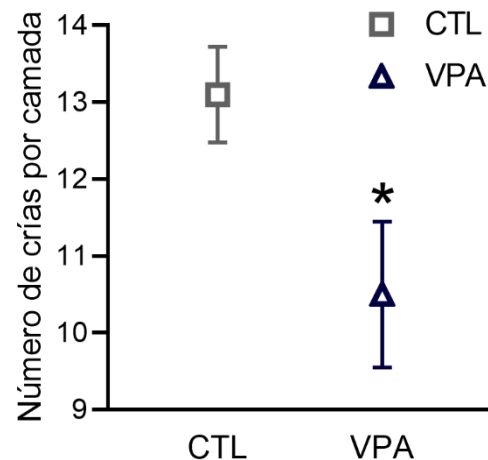


Figura 11. Tamaño de la camada. La gráfica muestra el número de crías por camada en el modelo VPA y en el grupo CTL ($N_{CTL} = 10$, $N_{VPA} = 12$). Los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar. Las pruebas estadísticas usadas fueron Shapiro-Wilk y t-Student. * $p < 0.05$.

7.2 Disminución del peso del cerebro durante las primeras semanas postnatales en el modelo VPA.

El desarrollo físico de las crías nacidas fue monitoreado, registrando el peso corporal durante las 3 primeras semanas postnatales en P1, P8 y P18 (ver figura 12a y tabla 4). Para evaluar este parámetro se utilizaron 12 camadas para cada grupo experimental y un total de 58 animales. Los resultados mostraron que el peso de las crías VPA no presentó cambios significativos respecto al grupo CTL durante las distintas etapas del desarrollo postnatal registradas: P1 (1.62 ± 0.09 g, $n_{CTL} = 7$; 1.65 ± 0.13 g, $n_{VPA} = 9$), P8 (3.73 ± 0.24 g, $n_{CTL} = 17$, 3.99 ± 0.39 g, $n_{VPA} = 13$) y p18 (9.27 ± 0.9 g, $n_{CTL} = 5$, 9.6 ± 1.5 g, $n_{VPA} = 7$).

Por otro lado, el peso del cerebro de las crías nacidas fue registrado en los días P1, P8 y P18 (ver figura 12b y tabla 4), ya que estudios previos en individuos autistas demostraron cambios en el volumen cerebral. Para este estudio se utilizaron un total de 86 animales de 31 camadas. En el día P1 el peso de los cerebros de las crías fue similar en ambos grupos experimentales (0.099 ± 0.007 g, $n_{CTL} = 10$; 0.116 ± 0.008 g, $n_{VPA} = 18$; $p = 0.16$). En el día P8 se registró un incremento significativo del 12.2% en el peso del cerebro en crías VPA en comparación con el grupo CTL (0.216 ± 0.01 g, $n_{CTL} = 18$; 0.256 ± 0.009 g, $n_{VPA} = 17$, $p = 0.015$). Mientras que en el día P18 se encontró una disminución significativa del 29.73 % en el peso del cerebro del grupo VPA en comparación con el grupo CTL (0.397 ± 0.008 g, $n_{CTL} = 6$; 0.359 ± 0.007 g, $n_{VPA} = 17$; $p = 0.006$).

Tabla 4. Peso corporal y del cerebro

Peso	Edad	CTL (g)	n	VPA (g)	n	Valor p
Corporal	P1	1.62 ± 0.09	7	1.65 ± 0.13	9	0.9
	P8	3.73 ± 0.24	17	3.99 ± 0.39	13	0.9
	P18	9.27 ± 0.9	5	9.6 ± 1.5	7	0.9
Cerebro	P1	0.099 ± 0.007	10	0.116 ± 0.008	18	0.16
	P8	0.216 ± 0.01	18	0.256 ± 0.009	17	0.015*
	P18	0.397 ± 0.008	6	0.359 ± 0.007	17	0.006**

Los datos se presentan como el promedio ± error estándar de la muestra. Se utilizó la prueba estadística Shapiro-Wilk y Mann-Whitney. *p < 0.05, **p < 0.01.

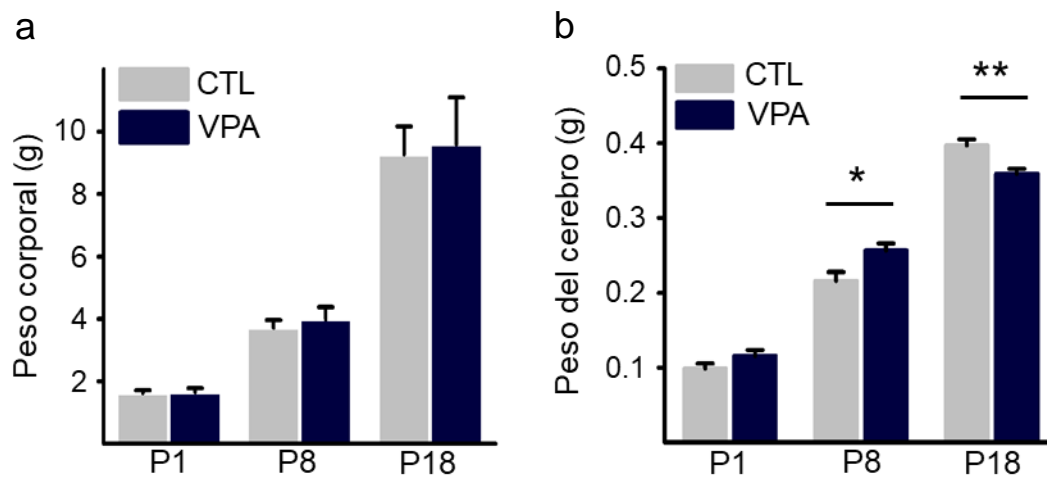


Figura 12. El peso del cerebro se incrementa durante el desarrollo postnatal P1, P8 y P18. (a) El peso promedio corporal de las crías macho en P1, P8 y p18 no presentó cambios significativos entre ambos grupos ($p > 0.05$). (b) El peso promedio del cerebro no presentó cambios significativos en P1 entre ambos grupos ($p = 0.16$), mientras que en P8 se presentó un aumento significativo de 18.5% ($n_{CTL} = 18$, $n_{VPA} = 17$, $p = 0.015$) y en P18 se presentó una disminución significativa de -9.6% ($n_{CTL} = 6$, $n_{VPA} = 17$, $p = 0.006$) en el modelo VPA con respecto al grupo CTL. Los datos se presentan como el promedio ± el error estándar de la muestra. Las pruebas estadísticas usadas fueron Shapiro-Wilk y t-Student. *p < 0.05, **p < 0.01.

7.3 Aumento de la latencia para el reconocimiento del nido en el modelo VPA

La prueba de reconocimiento del nido se llevó a cabo en P8 con el objetivo de evaluar la capacidad sensoriomotora. Para medir este parámetro se utilizó un total de 82 animales de 23 camadas para ambos grupos experimentales. La prueba de reconocimiento del nido muestra una mayor latencia (+170%) en los ratones expuestos prenatalmente a VPA (127.7 ± 14.9 s, $n_{VPA} = 47$, $N_{VPA} = 13$, $p = 3E-7$) que en los ratones del grupo CTL (51.2 ± 5.5 s, $n_{CTL} = 35$, $N_{CTL} = 10$, ver figura 13a). Estos resultados sugieren una deficiencia sensoriomotora en los ratones prenatalmente expuestos a VPA.

7.4 Aumento de la latencia en el reflejo de enderezamiento en el modelo VPA

La prueba del reflejo de enderezamiento es una evaluación motriz adicional que nos permitió investigar si hay una latencia mayor en los individuos prenatalmente expuestos al VPA. Para esta prueba se utilizó un total de 28 ratones macho de 7 camadas, los cuales fueron analizados por 5 días, de P5 a P10. Los resultados mostraron que la latencia de enderezamiento fue mayor en ratones VPA solo en P9 (2.43 ± 0.3 s, $n_{VPA} = 12$, $N_{VPA} = 3$, $p = 0.05$) en comparación con ratones CTL (1.75 ± 0.16 s, $n_{CTL} = 16$, $N_{CTL} = 4$, ver figura 13b). Estos resultados indican una función motriz disminuida en el modelo VPA.

7.5 La latencia de aproximación social es mayor en el modelo VPA

En la prueba conductual de aproximación social se evaluaron aquellos ratones que tuvieron una latencia para encontrar el nido mayor a 100 s, un total de 33 animales de 10 camadas. Aquí se observó que los ratones expuestos a VPA presentaron una mayor latencia para aproximarse al sujeto extraño (288.1 ± 40.7 s, $n_{VPA} = 18$, $N_{VPA} = 5$, $p = 0.001$) comparado con los del grupo CTL (90.13 ± 17.9 s, $n_{CTL} = 15$, $N_{CTL} = 5$, ver figura 13c), lo que sugiere una interacción social disminuida.

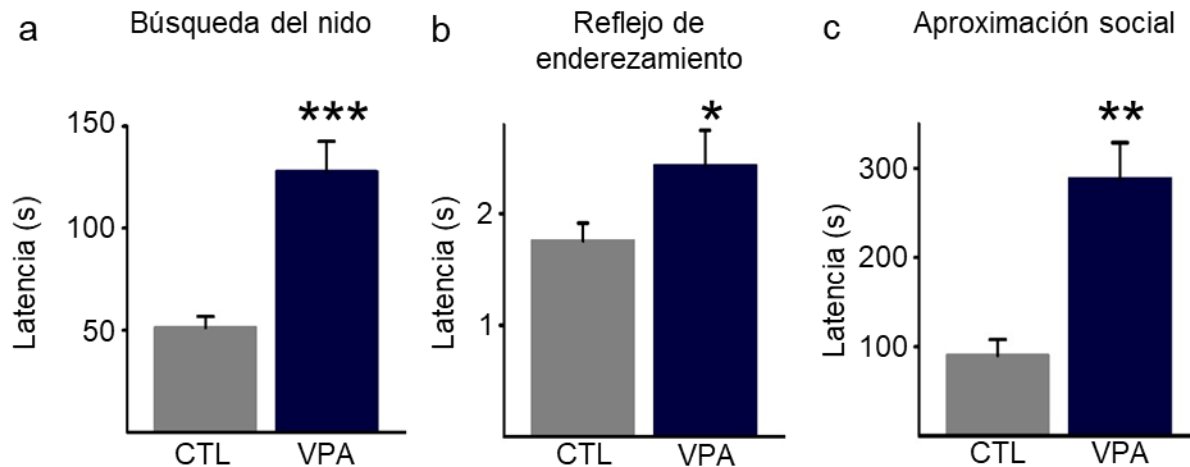


Figura 13. Deficiencias en habilidades sensoriomotoras y sociales en el modelo VPA. Gráficas que muestra la latencia para encontrar el nido (a) analizada en P8 ($n_{CTL} = 35$, $n_{VPA} = 47$, $N_{VPA} = 13$), la latencia de enderezamiento (b) analizada en P9 ($n_{CTL} = 16$, $n_{VPA} = 12$) y la latencia para aproximarse al sujeto extraño (c) analizada en P18 - P21 ($n_{CTL} = 15$, $n_{VPA} = 18$). Los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar. Las pruebas estadísticas usadas fueron Shapiro-Wilk y Mann-Whitney. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

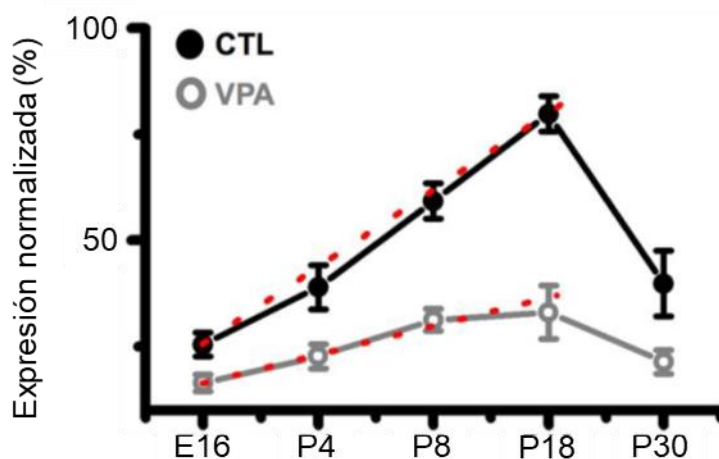
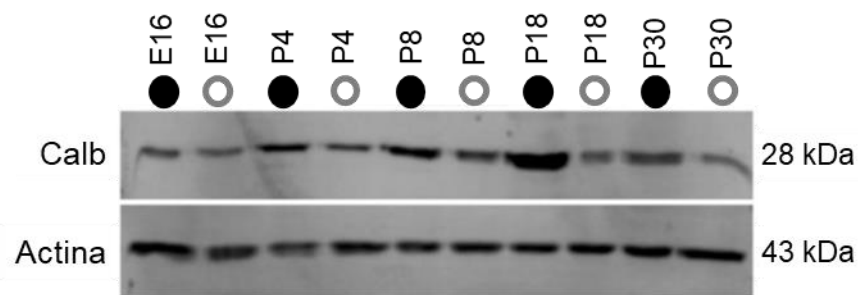
En conjunto, estos resultados indicaron que los ratones prenatalmente expuestos a VPA presentan deficiencias sensoriomotoras, las pruebas de identificación del nido y reflejo de enderezamiento se utilizaron para seleccionar los sujetos con déficits sensoriomotores en la primera semana del desarrollo postnatal (Varman et al., 2018).

7.6 Los niveles de la proteína calbindina esta reducida en el modelo VPA

En la etapa adulta, tanto en individuos autistas como en roedores prenatalmente expuestos a VPA se ha observado una disminución en el número de PCs particularmente en las regiones Crus I, Crus II y vermis del lóbulo VII del cerebelo (Ingram et al., 2000, Skefos et al., 2014; Wang et al., 2014). La calbindina es una proteína de unión a calcio dependiente de la vitamina D, importante en la regulación de los niveles de calcio intracelular en las interneuronas GABAérgicas del SNC (Heizmann, 1993). En el cerebelo

su expresión es selectiva para PCs, por lo que se utilizó como marcador para investigar si la exposición prenatal a VPA reducía su expresión y la densidad de este tipo celular.

La expresión de calbindina se analizó en distintas etapas del desarrollo (E16, P4, P8, P18 y P30) mediante estudios de western blot (160 cerebelos de 40 camadas). Los datos mostraron que la expresión de calbindina aumenta linealmente desde el día E16 hasta P18 ($r = 0.997$); sin embargo, disminuye en P30 respecto a P18 (-50%) en el grupo control (ver figura 14). El patrón de expresión de calbindina durante el desarrollo del cerebelo disminuyó significativamente en el modelo VPA (-36% en E16 hasta -60% en P18). Un análisis adicional de la pendiente confirmó que la tasa de expresión de la calbindina disminuyó un -61% en el grupo VPA (7 ± 1) respecto al control (18 ± 2), (Varman et al., 2018)¹.



¹ Varman & Soria-Ortiz, et al., 2018. Contribución igualitaria.

Figura 14. La expresión de calbindina disminuye en el cerebelo de los ratones expuestos prenatalmente al VPA. Los estudios de western blot se realizaron en distintas etapas del desarrollo para los grupos control (CTL), (E16C, P4C, P8C, P18C y P30C) y VPA (E16V, P4V, P8V, P18V y P30V). La expresión de calbindina (Calb) fue normalizada en función de la expresión de la β -actina que se utilizó como proteína control ($n = 16$ para cada edad y grupo experimental, E16 - P18; $r = 0.99$). Los datos se presentan como el porcentaje de cambio con respecto al control \pm el error estándar (Varman et al., 2018).

7.7 La densidad de las células de Purkinje se reduce en el modelo VPA

Los estudios de inmunofluorescencia para calbindina se realizaron con el objetivo de estimar la densidad de las PCs en los grupos CTL ($n = 8$ de $N = 4$) y VPA ($n = 8$ de $N = 4$); en donde n se refiere al número de ratones y N al número de camadas. Los resultados mostraron una disminución significativa (-21%) en el número de células calbindina positivas (Calb⁺) en el ratón VPA con respecto al control (39.19 ± 1.9 células/mm, $n_{CTL} = 8$; 31.04 ± 1.6 células/mm, $n_{VPA} = 8$, $p = 0.001$). En las imágenes de la figura 15, se muestran ejemplos de las células Calb⁺ en Crus I en el CTL (arriba) y en el VPA (abajo). Nótese que los somas (negro) en el CTL están alineados en la PL y el árbol dendrítico está claramente orientado hacia la capa molecular (ML, por sus siglas en inglés), mientras que en el grupo VPA se muestra una clara disminución en el marcaje para calbindina. La disminución de las PCs en ratones prenatalmente expuestos a VPA fue considerado como un marcador histológico del modelo.

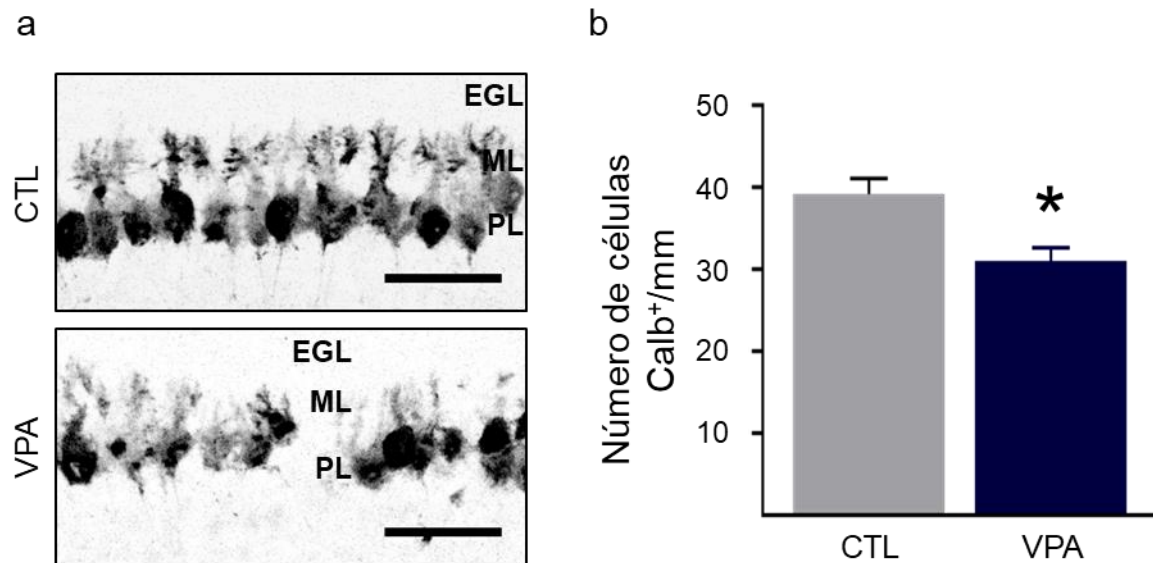


Figura 15. Pérdida de células de Purkinje en el modelo VPA. (a) Imágenes de la región Crus I de ratones CTL (arriba) y VPA (abajo). (b) Gráfica del número de células Calb⁺ en las regiones Crus I, Crus II y vermis del lóbulo VII ($n_{CTL} = 8$, $n_{VPA} = 8$) una imagen por región y en tres cortes por animal. Escala 50 μ m. Los datos se presentan como el promedio de células por milímetro \pm el error estándar de la muestra. Las pruebas estadísticas usadas fueron Shapiro-Wilk y t-Student. * $p = 0.001$. EGL, capa granular externa; ML, capa molecular; PL, capa de Purkinje.

7.8 La expresión de GFAP se incrementa en el modelo VPA

Una vez que se demostró que el modelo VPA reproduce deficiencias sensoriomotoras y pérdida de PCs, nuestro objetivo fue analizar si la expresión de GFAP aumentaba durante el desarrollo del cerebelo, como indicador del aumento en el número o tamaño de los astrocitos. La expresión de GFAP se analizó en distintas etapas del desarrollo (E16, P4, P8, P18 y P30) mediante estudios de western blot (160 cerebelos de 40 camadas).

Los datos mostraron que los niveles de la proteína GFAP aumentó linealmente desde el día E16 hasta P18 tanto en el CTL ($R^2 = 0.999$) como en el VPA ($R^2 = 0.988$). La expresión de GFAP en el CTL continúa aumentando linealmente hacia P30, mientras que en el VPA hay una ligera disminución en P18, pero continúa incrementando hacia P30 (ver figura 16). Asimismo, el análisis de la pendiente mostró que la tasa de expresión de

GFAP entre E16 y P8, es mayor en el grupo VPA con respecto al control (+14.6%, $m_{CTL} = 20.5$, $m_{VPA} = 23.5$). Además, los niveles se encontraban aumentados significativamente en el modelo VPA principalmente en las edades postnatales (23.3% en P4 ($n = 16$; $p = 0.007$); 14.4% en P8 ($n = 16$; $p = 0.001$) y 15.7% en P30 ($n = 16$; $p = 0.0001$). Así, nuestros datos indican que el nivel de la proteína de GFAP, evaluado por western blot, está aumentado en la primera semana postnatal del cerebelo.

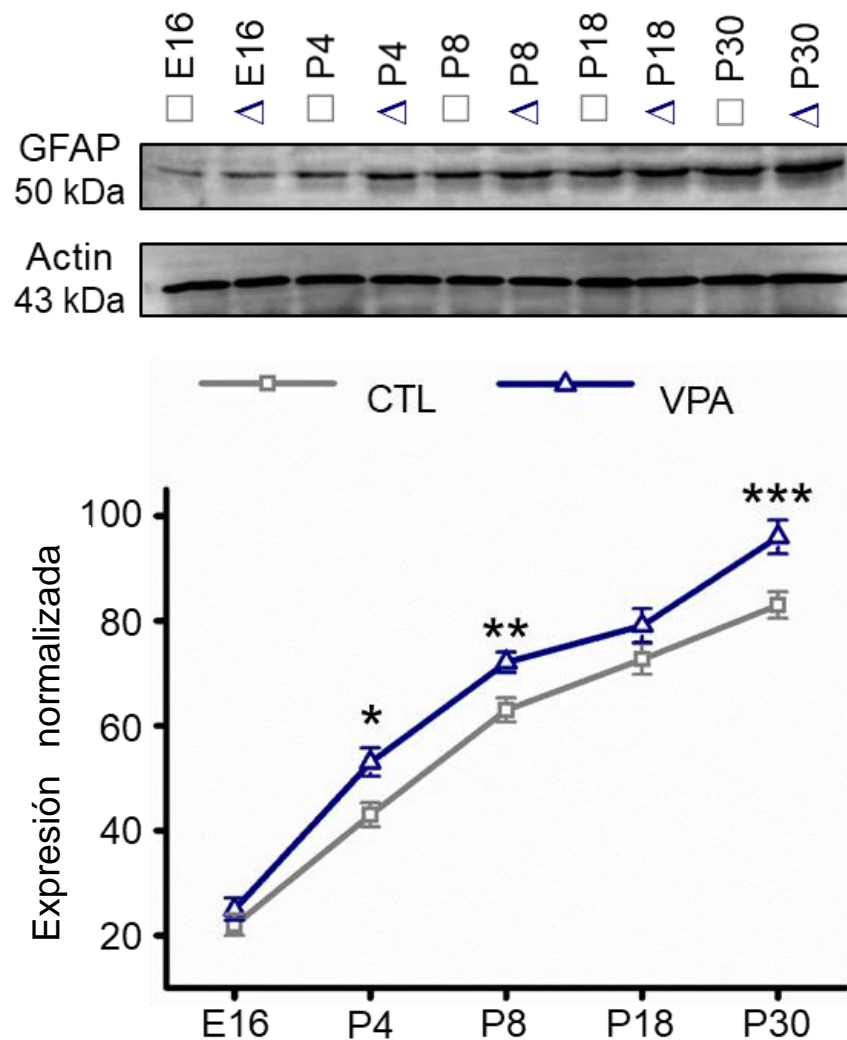


Figura 16. La expresión de GFAP se incrementa en el modelo VPA. Los estudios de western blot se realizaron en distintas etapas del desarrollo (E16, P4, P8, P18 y P30) para los grupos control CTL y VPA ($n = 16$ para cada edad y grupo experimental). La expresión de GFAP fue normalizada en función de la expresión de la b-actina. La expresión de GFAP incrementa linealmente tanto en el CTL ($R^2 = 0.999$, $m =$

20.5) como en el VPA ($R^2 = 0.988$, $m = 23.5$) del día E16 a P8. En el VPA la expresión se incrementó significativamente el 23.3% en P4 ($n = 16$; $p = 0.007$), el 14.4% en P8 ($n = 16$; $p = 0.001$) y el 15.7% en P30 ($n = 16$; $p = 0.0001$) con respecto al CTL para cada edad. Las pruebas estadísticas usadas fueron Shapiro-Wilk y t-Student. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$.

7.9 La densidad de astrocitos de la IGL aumenta en el modelo VPA

Después de determinar que el nivel de expresión de GFAP en el cerebelo aumenta en el modelo VPA, nuestro siguiente objetivo fue determinar si la densidad celular se incrementaba y si había cambios morfológicos en los astrocitos de la IGL. Para abordar este punto, se utilizaron ratones transgénicos GFAP-eGFP, que, a diferencia del método de inmunofluorescencia, permite visualizar la morfología completa del astrocito y facilita su análisis cuantitativo (ver tabla 2). Cabe señalar que, con base en los resultados de búsqueda del nido, los animales con una latencia mayor o igual que 100 s fueron seleccionados para el grupo VPA en este y los siguientes experimentos.

El número de las células GFAP-GFP⁺ se determinó en la IGL de crías machos en el día P8 ($N = 3$ de ambos grupos experimentales), los cuales corresponden a los astrocitos velados. Este análisis mostró que el número de astrocitos se incrementó significativamente (+254%, $p = 0.0022$) en la IGL del grupo VPA ($n = 4$) respecto al control ($n = 3$). Por lo tanto, la densidad de los astrocitos velados de la IGL se encuentra incrementada en el modelo VPA (ver figura 17).

El análisis morfológico de los astrocitos individuales (CTL = 426 células and VPA = 445 células; $n = 4$ para cada grupo experimental) mostró mayor complejidad morfológica en el modelo del VPA, de tal manera que el volumen celular incrementó 42% (CTL: $1188 \pm 42 \mu\text{m}^3$, VPA: $1690 \pm 106 \mu\text{m}^3$, $p = 5.5 \times 10^{-6}$), el número de ramificaciones aumentó 17% (CTL: 5 ± 0.2 , VPA: 6 ± 0.2 , $p = 0.009$) y la longitud de las ramificaciones aumentó 33% (CTL: $29.5 \pm 1.2 \mu\text{m}$, VPA: $39.3 \pm 1.9 \mu\text{m}$, $p = 1.3 \times 10^{-5}$) comparado con el grupo CTL (ver figura 17d). Estos datos indicaron que tanto la densidad como la morfología de los astrocitos estaba alterada en el modelo del VPA.

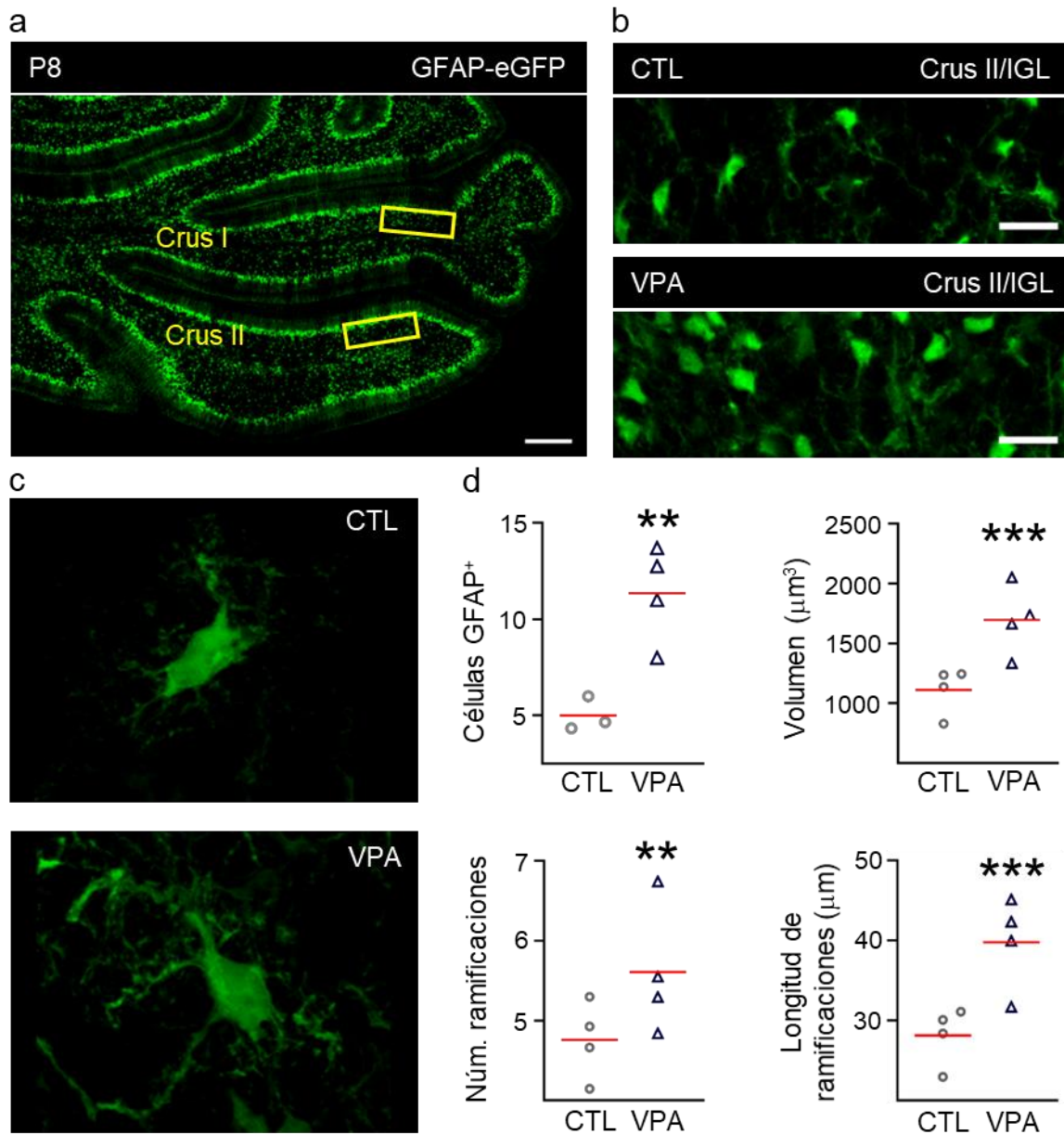


Figura 17. La densidad de astrocitos de la IGL aumenta en el modelo VPA. (a) A la izquierda, un corte horizontal del cerebelo que muestra las regiones Crus I y Crus II en ratones GFAP-eGFP. El conteo de células GFP⁺ se analizó en la IGL (rectángulos amarillos) en el día P8. A la derecha, imágenes representativas de la región Crus II, mostrando la densidad de células GFP⁺ para CTL (arriba) y VPA (abajo). Barra de calibración 100 μm . (b) Cuantificación de células GFP⁺, mostrando un incremento significativo del 254% en el ratón VPA ($n = 3$, $N = 3$) respecto al CTL ($n = 4$, $N = 3$). Los datos se presentan como el promedio del número de células en $10,000 \mu\text{m}^2 \pm$ el error estándar de la muestra. Barra de calibración 20 μm Las pruebas estadísticas usadas fueron Shapiro-Wilk y t-Student. * $p = 0.002$.

7.10 La extensión de la onda de calcio se incrementa en el modelo de VPA

La densidad de los astrocitos velados fue mayor en el modelo VPA por lo que se investigó si la extensión funcional de la onda de calcio también se incrementaba. Para esto, se aplicó un estímulo eléctrico que despolarizó localmente la IGL del cerebelo en las regiones Crus I y Crus II (ver figura 18a). La onda de calcio evocada por despolarización reclutó ensambles glio-neuronales y nuestro primer paso fue estimar la extensión funcional máxima. Nuestros resultados mostraron que la respuesta se incrementó 29% en ratones VPA ($382 \pm 22 \mu\text{m}$, $n_{\text{VPA}} = 10$, $N_{\text{VPA}} = 9$, $p = 0.01$) comparado con el grupo CTL ($295.9 \pm 24 \mu\text{m}$, $n_{\text{CTL}} = 10$, $N_{\text{CTL}} = 7$), (ver figura 18c). Por otro lado, la velocidad de propagación de la onda de calcio no mostró diferencias (VPA: $32 \pm 3 \mu\text{m/s}$, CTL: $27.3 \pm 4 \mu\text{m/s}$, $p = 0.3$, ver figura 18d). Posteriormente, se determinó el número total de células reclutadas por la onda de calcio y no se encontraron diferencias entre los ratones CTL y VPA. No obstante, un análisis más detallado reveló un aumento significativo del número de células reclutadas dentro de las primeras 100 μm de radio: 0-50 μm , +83 % (CTL: 22 ± 3 células, VPA: 40 ± 4 células, $p < 0.001$); 50-100 μm , +42 % (CTL: 51 ± 6 células, VPA: 73 ± 7 células, $p < 0.02$), mientras que en los radios subsecuentes no se encontraron diferencias significativas (ver figura 18b y tabla 5).

Adicionalmente, con el objetivo de estimar la amplitud promedio de los transitorios de Ca^{2+} evocados se analizó el área bajo la curva, este dato representa tanto el porcentaje de incremento en la intensidad de fluorescencia como de su duración. Los resultados mostraron que la amplitud promedio disminuía con relación a la distancia del origen de la despolarización para ambos grupos experimentales (control y VPA), (ver figura 19e). La amplitud promedio de los transitorios de Ca^{2+} se incrementó +53% ($\text{Céls}_{\text{CTL}} = 1222$, $n_{\text{CTL}} = 20$, $N_{\text{CTL}} = 13$, $\text{Céls}_{\text{VPA}} = 967$, $n_{\text{VPA}} = 23$, $N_{\text{VPA}} = 15$) en el grupo VPA ($89 \pm 10 \text{ u. a.}$, $p = 0.01$) comparado con el grupo CTL ($58 \pm 10 \text{ u. a.}$) (ver figura 18f, g). Con base en estos resultados se concluyó que la extensión funcional de la onda de calcio evocada, el número de células reclutadas y la amplitud promedio del transitorio de Ca^{2+} se incrementa en el modelo VPA.

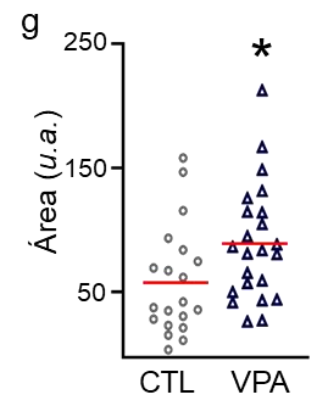
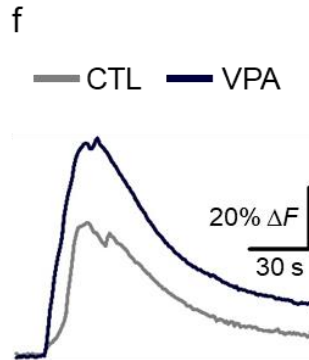
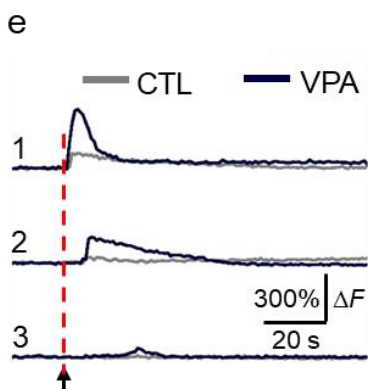
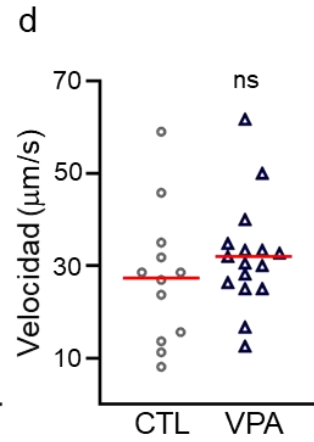
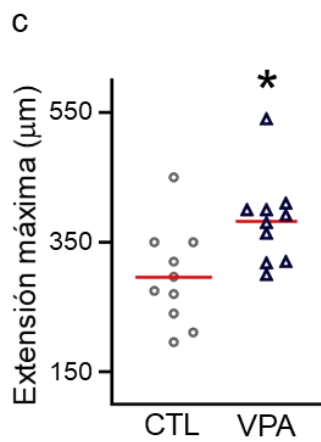
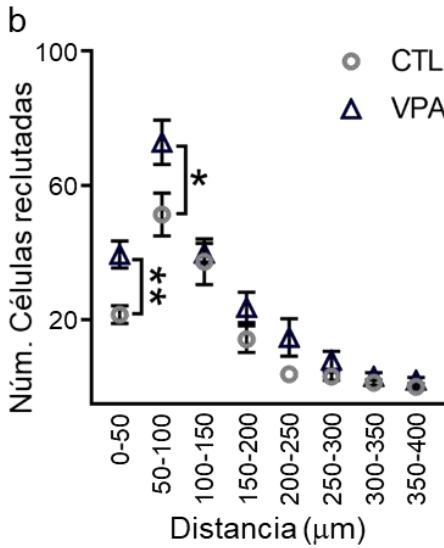
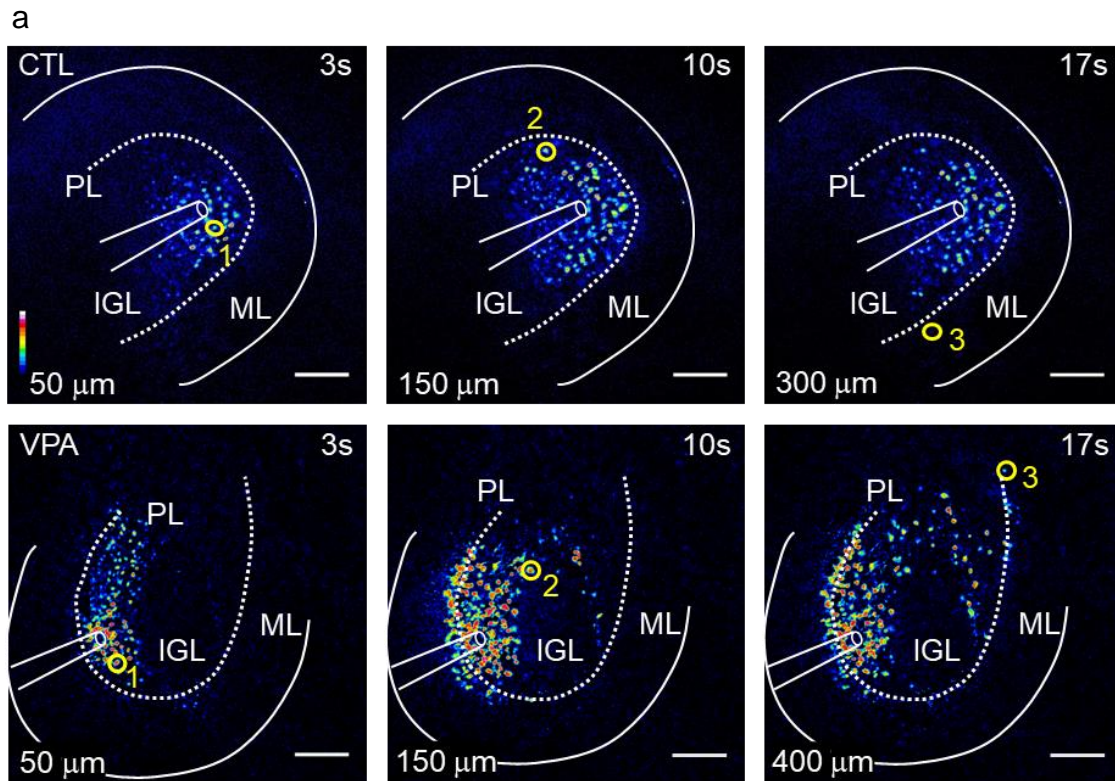


Figura 18. La onda de calcio se incrementa en el modelo VPA. (a) Onda de calcio evocada por despolarización en la capa granular interna (IGL) para los grupos CTL y VPA. Imágenes con pseudocolor (de azul a blanco) representando las intensidades de fluorescencia de Fluo4-AM. Escala 100 μm . (b) Gráfica de células reclutadas por distancia ($n_{\text{CTL}} = 10$, $N_{\text{CTL}} = 7$, $n_{\text{VPA}} = 10$, $N_{\text{VPA}} = 9$). (c) Distancia máxima de la onda de calcio ($n_{\text{CTL}} = 10$, $N_{\text{CTL}} = 7$, $n_{\text{VPA}} = 10$, $N_{\text{VPA}} = 9$). (d) Velocidad en la que se alcanza la distancia máxima ($n_{\text{CTL}} = 12$, $N_{\text{CTL}} = 8$, $n_{\text{VPA}} = 16$, $N_{\text{VPA}} = 12$). (e) Ejemplos de la activación de tres células reclutadas a diferentes distancias en la onda de calcio (círculos amarillos en CTL y VPA). (f) Amplitud promedio de los transitorios de Ca^{2+} de todas las células reclutadas dentro de la onda de calcio en CTL ($\text{Céls}_{\text{CTL}} = 1222$, $n_{\text{CTL}} = 20$, $N_{\text{CTL}} = 13$) y VPA ($\text{Cells}_{\text{VPA}} = 967$, $n_{\text{VPA}} = 23$, $N_{\text{VPA}} = 15$). (g) Resumen del promedio de las amplitudes de los transitorios de Ca^{2+} de todas las células reclutadas en ambos grupos experimentales. IGL, capa granular interna; PL, capa de Purkinje; ML, capa molecular. Los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar, las pruebas estadísticas usadas fueron Shapiro-Wilk, Mann-Whitney. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Tabla 5. Conteo celular por radio.

Radio (μm)	CTL (No. de células)	VPA (No. de células)	Valor p
0-50	22 \pm 3	40 \pm 4	0.001**
50-100	51 \pm 6	73 \pm 7	0.02*
100-150	37 \pm 7	40 \pm 3	0.7
150-200	14 \pm 4	24 \pm 5	0.14
200-250	4 \pm 2	15 \pm 6	0.07
250-300	3 \pm 1	8 \pm 3	0.19
300-350	1 \pm 1	3 \pm 1	0.14
350-400	0	2 \pm 1	0.03*

Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar de la muestra. El tamaño de la muestra fue $n_{\text{CTL}} = 10$, $N_{\text{CTL}} = 7$, $n_{\text{VPA}} = 10$, $N_{\text{VPA}} = 9$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

7.11 El reclutamiento de astrocitos aumenta en la onda de calcio en el VPA

Con el objetivo de determinar si la onda de calcio recluta astrocitos, se usó SRB, un marcador fluorescente que se incorpora preferentemente en astrocitos (>80% GFAP⁺

células, $n = 12$, $N = 3$) y se observó que la onda de calcio recluta células SRB⁺ positivas (>50%; $n = 8$, $N = 5$) en la IGL de ambos grupos experimentales (ver figura 10 y 19).

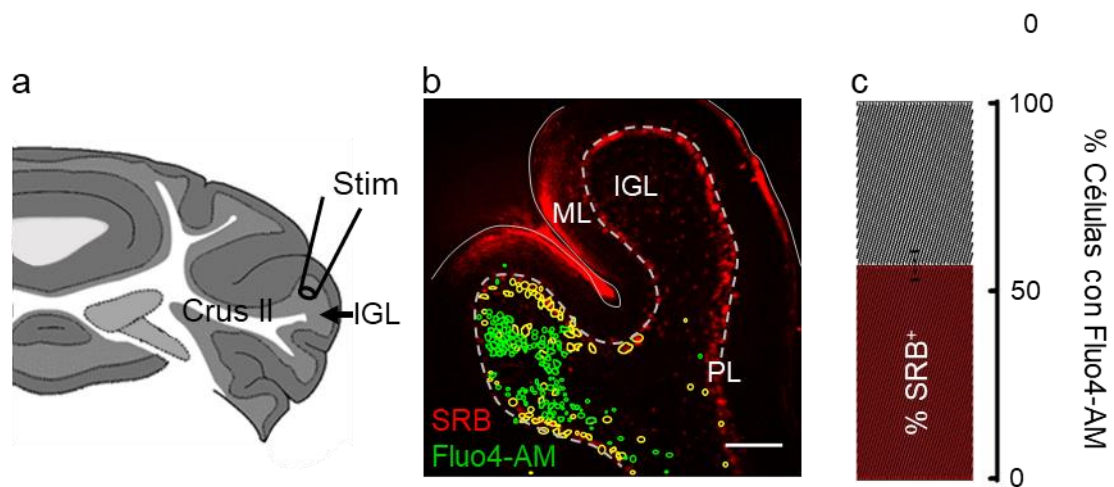


Figura 19. La onda de calcio evocada por despolarización recluta células gliales. (a) Representación gráfica del protocolo experimental. (b) La onda de Ca^{2+} inducida (Fluo4-AM, verde) reclutó células SRB⁺ (empalme en amarillo). (c) Resumen de los experimentos mostrando que > 50% de las células reclutadas son SRB⁺ ($n = 8$, $N = 5$). Escala 100 μm . Los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar, las pruebas estadísticas utilizadas fueron Shapiro-Wilk y Mann-Whitney. IGL, capa granular interna; PL, capa de Purkinje; ML, capa molecular.

El siguiente paso fue analizar el número de astrocitos que se reclutaron en la onda de calcio y la amplitud promedio de los transitorios de Ca^{2+} . Nuestros resultados mostraron que el reclutamiento de las células SRB⁺ aumentó significativamente +168% dentro de los primeros 100-150 μm de radio en el modelo VPA con respecto al CTL (CTL: 8 ± 1.6 SRB⁺ céls, VPA: 22 ± 6.5 céls, $p < 0.03$). Sin embargo, la amplitud promedio de los transitorios de Ca^{2+} no se modificó significativamente (CTL: 1671 ± 578 u. a. y VPA: 1629 ± 6.3 u. a., para el CTL (Cells-CTL = 299, $n_{\text{CTL}} = 6$, $N_{\text{CTL}} = 4$) y el VPA (Cells-VPA = 340, $n_{\text{VPA}} = 4$, $N_{\text{VPA}} = 3$)), respectivamente ($p < 0.4$); (ver figura 20 y la tabla 6). Con base en estos resultados se concluye que la onda de calcio recluta más astrocitos, pero la amplitud promedio de los transitorios de Ca^{2+} no se modifica significativamente en el modelo VPA.

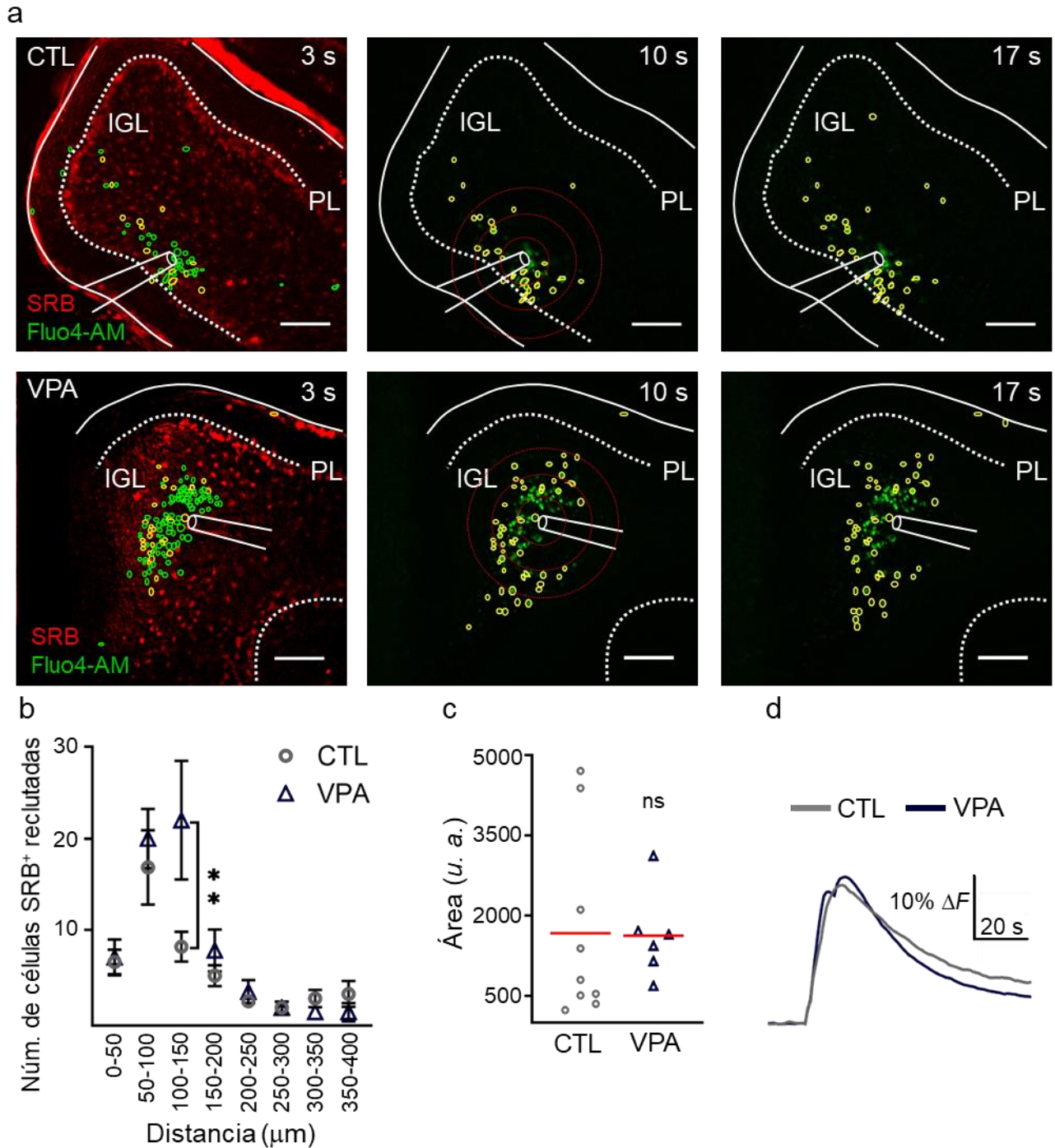


Figura 20. Aumento de astrocitos reclutados en la onda de calcio del modelo VPA. (a) Imágenes representativas de la onda de calcio en la IGL del CTL y VPA (Fluo4-AM en verde); a tres tiempos distintos (3, 10 y 17 segundos). Fracción de células Fluo4-AM que incorporaron SRB (círculos amarillos), respecto al resto de las células reclutadas (círculos verdes). Escala 100 μ m. (b) Histograma del número de células SRB⁺ reclutadas con respecto a la distancia ($n_{CTL} = 6$, $n_{VPA} = 4$, and $N_{CTL} = 3$ y $N_{VPA} = 3$). (c) Amplitud promedio de los transitorios de Ca²⁺ de las células SRB⁺ reclutadas en la onda en el grupo CTL (Céls_{CTL}

= 299, $n_{CTL} = 9$, $N_{CTL} = 4$) y en el VPA ($Céls_{VPA} = 340$, $n_{VPA} = 6$, $N_{VPA} = 3$). (d) Resumen de la amplitud promedio de los transitorios de Ca^{2+} de todas las células de los grupos CTL y VPA. IGL, capa granular interna; PL, capa de Purkinje. Los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar. Las pruebas estadísticas usadas fueron Shapiro-Wilk y t-Student. $**p < 0.05$.

Tabla 6. Conteo de células SRB⁺ por radio.

Radio (μm)	CTL (No. de células)	VPA (No. de células)	Valor p
0-50	7 \pm 1	7 \pm 2	0.83
50-100	17 \pm 4	20 \pm 3	0.59
100-150	8 \pm 2	22 \pm 6	0.03*
150-200	5 \pm 1	8 \pm 2	0.29
200-250	2 \pm 0.4	3 \pm 1	0.4
250-300	2 \pm 0.6	2 \pm 0.6	> 0.9
300-350	3 \pm 1	1 \pm 0	0.24
350-400	3 \pm 1	1 \pm 1	0.41

Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar de la muestra. El tamaño de la muestra fue $n_{CTL} = 6$, $n_{VPA} = 4$, and $N_{CTL} = 4$, and $N_{VPA} = 3$. El análisis estadístico aplicado fue Mann-Whitney. $*p < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

8.1 Tasa de natalidad

Los resultados obtenidos muestran que la tasa de natalidad disminuye el 20% en el modelo VPA. Estudios previos en ratas reportaron una disminución en la tasa de natalidad similar a partir de una dosis de 600 mg/kg de VPA (Favre et al., 2013). Asimismo, otros estudios en humanos reportaron que el 3.5% de un tratamiento prenatal con VPA resultan en abortos espontáneos (Vajda et al., 2004). Por lo tanto, la disminución en el índice de natalidad podría ser el resultado de un incremento en los abortos o bien por la reabsorción de los embriones en el ratón.

8.2 Peso corporal

Con relación a la ganancia de peso corporal de las crías VPA durante las primeras tres semanas no se observaron cambios significativos (Fig. 12), lo que concuerda con lo reportado previamente con el modelo VPA en ratas durante las primeras dos semanas del desarrollo postnatal (Favre et al., 2013). Por otra parte, otros estudios reportaron una disminución en el peso corporal de los individuos expuestos prenatalmente al VPA a partir de la tercera semana postnatal (P23, Schneider y Pzewlocki, 2005 y P25, Roullet et al., 2010). Adicionalmente, el tratamiento *in utero* con fármacos antiepilépticos reportaron menor peso al nacimiento únicamente cuando se combinaban con VPA (Hvas et al., 2000; Kilic et al., 2014; Margulis et al., 2019).

8.3 Peso del cerebro

En este estudio observamos que el peso del cerebro de ratones VPA aumenta en el día P8 y luego disminuye en el día P18 (Fig. 12). En contraste, un estudio con ratas reportó microcefalia en la edad P14 (Favre et al., 2013). Mientras que otro estudio reportó macrocefalia de P2 a P7 y microcefalia hacia la etapa adulta (Go et al., 2012). Los factores que subyacen estas diferencias entre grupos de investigación no son claros, pero es posible que se trate de las pequeñas variaciones al modelo y sería necesario ampliar el número de investigaciones al respecto. Sin embargo, los estudios en humanos realizados con imagen por resonancia magnética, MRI (Courchesne et al., 2011; Courchesne et al., 2001) y *post mortem* (Bauman, 1985) reportaron macrocefalia en la primera etapa del desarrollo (< 5 años) y una disminución hacia la etapa adulta. Además, la macrocefalia presente en pacientes con TEA correlaciona con un incremento en la densidad neuronal en la corteza (Courchesne et al., 2011). Hay evidencia de que los precursores neuronales permanecen en las fases G1/S de crecimiento, provocando la proliferación lenta de células idiopáticas de individuos autistas (Marchetto et al., 2017), aunado a la disminución de la apoptosis de precursores neuronales (Go et al., 2012).

Esto podría explicar el aumento en el volumen cerebral en etapas tempranas del desarrollo (Marchetto et al., 2017).

8.4 Conducta social y habilidades sensoriomotoras

Nuestros datos sobre el análisis de la conducta social y habilidades sensoriomotoras mostraron una mayor latencia en la búsqueda del nido (+170%) en el día P8, sugiriendo una deficiencia en habilidades sensoriomotoras necesarias; tanto para detectar el nido de su camada mediante una discriminación olfatoria, como para moverse y llegar a él, mediante habilidades motrices propias de la función del cerebelo. Asimismo, nuestros datos mostraron una latencia mayor en el reflejo de enderezamiento (+39%) en el día P9, sugiriendo deficiencias en la función del cerebelo. Varios estudios realizados en ratas respaldan nuestros resultados en estas etapas tempranas del desarrollo postnatal (Favre et al., 2013; Kazlauskas et al., 2016; Roullet et al., 2010, Schneider y Pzewlocki, 2005; Wagner et al., 2006). Estudios en niños autistas reportaron que los retrasos sensoriomotores se presentaron antes del inicio de las deficiencias sociales y verbales (Lloyd et al., 2013), lo que sugiere que las deficiencias sensoriomotoras podrían funcionar como un indicador potencial de riesgo de TEA.

Nuestros datos mostraron que los ratones con deficiencias sensoriomotoras presentaron una mayor latencia de aproximación hacia un sujeto extraño (+220%). Otros estudios, analizaron la aproximación social en el modelo VPA con diferentes modalidades; latencia en la exploración a un sujeto extraño, a compartimiento vacío o a un objeto nuevo utilizando el aparato de tres cámaras (Bronzuoli et al., 2018; Kim et al., 2011; Roullet et al., 2010) o en campo abierto (Gandal et al., 2010; Kataoka et al., 2013; Markram et al., 2008; Schneider & Przewlocki, 2005). En estos estudios se demostraron deficiencias en la conducta social al aumentar la latencia de aproximación y exploración a roedores extraños, al disminuir el número de inspecciones y tiempo de acicalamiento hacia roedores extraños y al aumento en la preferencia por espacios vacíos. Nuestros resultados están en congruencia con estos estudios y sugieren que las deficiencias en la

conducta social están asociadas a las alteraciones de habilidades sensoriomotoras adquiridas en etapas previas del desarrollo postnatal.

8.5 Expresión de calbindina y densidad de las células de Purkinje

Los resultados de este trabajo mostraron una disminución (-36% en E16 hasta -60% en P18) en la expresión de calbindina en el modelo VPA, asociada a una densidad disminuida de las PCs (-21%) en la edad P8. La calbindina es una proteína de unión a calcio dependiente de la vitamina D, importante en la regulación de los niveles de calcio intracelular en las interneuronas GABAérgicas del SNC y se expresa selectivamente en las PCs del cerebelo (Heizmann 1993). En la etapa adulta, tanto en individuos autistas (Bailey et al., 1998, Bauman y Kemper, 1985, Skefos et al., 2014, Whitney et al., 2008), como en roedores prenatalmente expuestos a VPA (Ingram et al., 2000; Wang et al., 2014; Yochum et al., 2008), se reportó una disminución en el número de PCs particularmente en las regiones Crus I, Crus II y vermis del lóbulo VII del cerebelo. De manera interesante, estudios en individuos con TEA (4 -51 y 8-13 años) reportaron una disminución del volumen del cerebelo principalmente en las regiones posteriores Crus I, Crus II y lóbulo X que correlacionan con una disminución de la densidad de PCs (D'Mello et al., 2005, Skefos et al., 2014). Además, la reducción del volumen de la sustancia gris en las regiones Crus I/II correlaciona con la severidad de los tres síntomas diagnósticos del TEA, que tiene conexión directa con la corteza fronto-parietal (D' Mello et al., 2015).

El presente estudio mostró una importante pérdida de las principales neuronas GABAérgicas (Calb⁺) que integran la información en el cerebelo en un periodo importante de la maduración de esta estructura y como consecuencia la pérdida de las conexiones hacia la corteza cerebral. De manera interesante, en otros análisis de nuestra muestra se demostró una disminución significativa en la expresión del receptor GABA ρ 3 expresado tanto en PCs como en células gliales ependimarias en el cerebelo (ver apéndice III) durante el primer mes posnatal (ver apéndice IV), indicando una importante pérdida funcional de las PCs y células gliales en el cerebelo, lo que pudiera contribuir al desequilibrio de la transmisión inhibitoria en el TEA.

Hasta aquí, nuestros resultados confirman que el modelo de autismo inducido por la exposición prenatal a VPA, tiene reproducibilidad en cuanto a las alteraciones anatómicas cerebrales, los déficits en la conducta social, las habilidades sensoriomotoras que involucran la función cerebelar; así como la pérdida de PCs del cerebelo, un marcador histológico que había sido descrito solo en adultos. En nuestro estudio demostramos que este marcador histológico está presente desde la primera semana postnatal y lo corroboramos a nivel molecular. Otro marcador molecular que se reprodujo fue la disminución en la neurotransmisión GABAérgica descrita en el TEA y otros modelos.

8.6 Expresión de GFAP

Un factor patogénico para el desarrollo del TEA es la alteración en el desarrollo de células gliales. La GFAP es una proteína de filamentos intermedios específica para astrocitos, controla su morfología, el arreglo de sus ramificaciones y su adhesión local (Moeton et al., 2016). Los glomérulos cerebelares en la IGL formados por dendritas de GCs, axones de células de Golgi y fibras musgosas, están envueltos por astrocitos. En este estudio investigamos el nivel de expresión de la proteína en ambos grupos experimentales entre E16 - P30 y los datos demostraron que el nivel de expresión de GFAP está aumentado en el grupo VPA en P4, P8 y P30. Estas alteraciones pueden afectar de manera directa tanto a la morfología de los astrocitos como al ensamble de las redes gliales o glioneuronales, que deben madurar dentro de este periodo postnatal.

Existe un estudio con el modelo VPA donde no se reportaron cambios en la expresión de GFAP en el cerebelo en P13, P35 y P90; pero si reportó una disminución en el nivel del transcrito en P35 y un aumento en P90 (Bronzuoli et al., 2018). Sin embargo, nuestros datos mostraron un incremento lineal en el modelo VPA desde E16 hasta P30 ($r^2 = 0.95$), lo cual es consistente con lo reportado en el TEA (Vargas et al., 2005) y en el modelo animal del Síndrome del X Frágil (P15, Pacey et al., 2015). Por otra parte, nuestros resultados reproducen los hallazgos en estudios *post mortem* de pacientes diagnosticados con TEA, en los que la expresión de GFAP aumentó significativamente

2.6 veces (Edmonson et al., 2014). Un estudio *post mortem* adicional con cerebelos de pacientes diagnosticados con TEA también reportó un aumento en la expresión de GFAP (49%) (Laurence and Fatemi, 2005).

8.7 Densidad y morfología de astrocitos

El incremento del nivel de expresión de GFAP puede predecir un incremento en el número de astrocitos y/o alteraciones en su morfología. Nuestros datos mostraron que la densidad de astrocitos en el ratón transgénico GFAP-eGFP, aumentó (+254%) en las regiones Crus I y Crus II en la primera semana postnatal. Asimismo, el análisis morfológico demostró un aumento en el volumen celular, número de ramificaciones y su longitud. Diversos estudios han demostrado que el VPA aumenta la proliferación de precursores gliales (Lee et al., 2016), esto es congruente con el incremento en la densidad de astrocitos durante la etapa postnatal, una etapa crucial en la proliferación de células gliales.

Algunos estudios, que analizan el número de astrocitos en el modelo prenatal de VPA (dosis de 500 y 600 mg/Kg) usando técnicas de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica, no reportan diferencias en el cerebelo en los días P7, P13 y P28 (Bronzuoli et al., 2018; Kazlauskas et al., 2016). Cabe mencionar que también empleamos las mismas técnicas histológicas utilizando anticuerpos anti-GFAP; sin embargo, no fue posible estimar con precisión la densidad de astrocitos, debido a que el anticuerpo no marcó los cuerpos celulares. A diferencia del marcaje en el ratón transgénico donde la GFAP se expresa muy bien en los somas de los astrocitos y además es más preciso en el cerebelo, comparado con otras regiones del cerebro (Nolte et al., 2001), siendo una posibilidad para estas discrepancias.

Por otro lado, los resultados de estudios *post mortem* de pacientes con TEA en un rango de edad de 5 a 44 años, si mostraron un aumento en la inmunoreactividad a GFAP en las capas ML, IGL y PL, con mayor significancia en la IGL (Vargas et al., 2005). Nuestros datos indican que el aumento de la expresión GFAP correlaciona con un aumento en la

densidad de astrocitos en el cerebelo y con alteraciones en su morfología. Desafortunadamente no existe suficiente información sobre la morfología de los astrocitos en el TEA o en estudios preclínicos; sin embargo, se sabe que la morfología está controlada por la expresión de varios genes incluidos el de GFAP, que repercuten sobre las interacciones neurona-glia (Lanjakornsiripan et al., 2018). Además, otro estudio demostró que la exposición a VPA de cultivos de neuronas – astrocitos reduce el número de sinapsis inhibitorias (Takeda et al., 2021). En conjunto, estos resultados sugieren que la función astrocítica podría comprometerse debido a las alteraciones morfológicas asociadas.

8.8 Onda de calcio

Los astrocitos pueden ser activados por estímulos mecánicos, químicos y eléctricos, incrementando su concentración de calcio intracelular, conocidos como transitorios de Ca^{2+} intracelular que pueden propagarse hacia células vecinas originando una onda de calcio (Verkhatsky et al., 2012). De manera interesante, observamos que la onda de calcio evocada por despolarización de la IGL reclutó una población específica de células. La onda de calcio se propagó de manera circular/ovalada. Kang y Othmer (2009) sugieren que la estructura de la onda de calcio depende básicamente de la morfología de los astrocitos. Sugiriendo que el cambio en la morfología de los astrocitos no alteró la forma de propagación en el modelo VPA.

Estudios previos han demostrado que la señalización de calcio evocada por despolarización puede propagarse hacia otras células mediante uniones comunicantes tras la difusión de IP_3 o por la liberación de ATP al espacio extracelular y la activación de receptores purinérgicos. En la sustancia gris de diferentes áreas cerebrales, la liberación de ATP al espacio extracelular parece ser el común denominador (Haas et al., 2006; Peters et al., 2003; Q. Wang et al., 2021). Por lo anterior, es posible que las ondas de calcio evocadas por despolarización se propaguen a través del mismo mecanismo en la IGL del cerebelo.

En el presente estudio se investigó sobre la función de los ensamblajes glio-neuronales de la IGL durante el desarrollo postnatal temprano en el modelo VPA. En este trabajo se encontró que la despolarización de la IGL en Crus I y Crus II, aumentó la extensión funcional de la onda de calcio (+29%) en el modelo VPA, alcanzando distancias hasta de 400 μm . Mientras que la velocidad de activación fue 27 $\mu\text{m/s}$ en el CTL y no fue diferente en el modelo VPA (32 $\mu\text{m/s}$). Estudios en la corteza (P10-P14), reportaron que la onda de calcio astrocítica alcanza distancias de 500 μm tras un estímulo despolarizante a una velocidad de 39.2 $\mu\text{m/s}$ acompañado de la activación neuronal. Además, se demostró que la velocidad disminuye (13.2 mm/s), inhibiendo la activación neuronal con tetrodotoxina y que esta velocidad se mantiene vía uniones comunicantes (Peters et al., 2003).

Estudios en la corteza (P10-P14, Haas et al., 2006) y en el cuerpo calloso (P5-P8, Schipke et al., 2002), reportaron que un estímulo eléctrico local de 10 Hz por 4 s evoca ondas de calcio que se propagan en promedio la misma distancia y velocidad. La velocidad de propagación que registramos es muy parecida y es posible que la actividad neuronal se encuentre involucrada. Estudios previos reportaron que en condiciones patológicas como la isquemia celular, las lesiones tisulares y la lisis celular se liberan grandes cantidades de ATP al espacio extracelular (De Vuyst et al., 2006). En nuestro estudio una mayor extensión funcional podría ser el resultado de una mayor liberación de ATP atribuida a una mayor densidad astrocítica, sin embargo, esta hipótesis requiere experimentación adicional.

De manera interesante, reportamos que el número de células reclutadas en la onda de calcio fue mayor en los primeros 100 μm de radio (+83% de 0-50 μm y +42% de 50-100 μm) en el modelo VPA. Estudios previos demostraron que las ondas de calcio que involucran la difusión de IP_3 se propagan con mayor rapidez, pero recluta pocas células. Mientras que las ondas de calcio que involucran la liberación de ATP se propagan más lento y alcanzan distancias mayores (Kang y Othmer, 2009). Es posible que en el modelo VPA el incremento en la densidad y la morfología de los astrocitos modifique el acoplamiento de uniones comunicantes y por tanto, provoque una alteración en la

difusión de IP_3 cerca del epicentro del estímulo; otra posibilidad es que estos cambios provoquen que la liberación de ATP sea mayor.

Nuestros datos revelaron que más del 50% de las células reclutadas por la onda de calcio tenían identidad glial, SRB^+ . Además, también reportamos un aumento en el reclutamiento de astrocitos en el modelo VPA. Una posibilidad es que exista una porción de astrocitos que no sean SRB^+ (Kafitz et al., 2008). Con base en nuestros análisis en el ratón transgénico, el 80% de astrocitos $GFAP^+$ fueron SRB^+ en el día P8. Kafitz et al. (2008) reportaron en sus estudios electrofisiológicos que existen poblaciones de astrocitos hipocampales $GFAP^+$ y $SR101^-$ (análogo de SRB) entre P3 y P15, los cuales tienen propiedades de membrana distintas a los $GFAP^+/SRB^+$. A estos astrocitos se les llama astrocitos de rectificación variable, ya que presentan dos tipos de corrientes salientes de potasio, corrientes de rectificación lenta y corrientes tipo A y un potencial de membrana más positivo que el potencial de equilibrio del potasio. Por lo que, es posible que los astrocitos que se reclutan después de los 250 μm tengan distintas propiedades fisiológicas.

Por otra parte, estudios previos reportan que los indicadores de calcio pueden ser incorporados en neuronas hasta el día P5 y posteriormente se incorporan a astrocitos específicamente (Peters et al., 2003). Por esta razón, no podemos descartar que el indicador de calcio usado en este trabajo sea incorporado por las GCs a esta edad, ya que se trata de una población de GCs clasificadas como inmaduras (P0-P7) e intermedias (P7-P15) que no producen potenciales de acción y que poseen un potencial de membrana entre -35 y -60 mV (Hockberger y Connor, 1987). Asimismo, debido a que la SRB se internaliza por transportadores orgánicos aniónicos que tanto astrocitos como neuronas expresan (Kafitz et al., 2008), es posible que la red de células reclutadas en la onda esté compuesta por astrocitos y GCs.

El calcio es un importante segundo mensajero que tiene efecto sobre los procesos de proliferación, migración, diferenciación y muerte celular programada. Las ondas y los transitorios de Ca^{2+} ocurren durante la migración de los precursores de las GCs desde la

capa granular externa hacia la IGL del cerebelo (Kumada & Komuro, 2004). La migración de los precursores de las GCs ocurre prematuramente y la apoptosis se presenta en un mayor número de precursores granulares, en el modelo VPA, durante las primeras dos semanas postnatales (R. Wang et al., 2018); lo que sugiere un proceso de maduración aberrante en la IGL del cerebelo, probablemente debido al aumento en la dinámica de calcio de las redes neurona-astrocito.

Por otra parte, las ramificaciones de los astrocitos velados envuelven el glomérulo, en donde se forman las sinapsis entre las fibras musgosas y las dendritas y axones de las GCs a partir de la tercera semana. Existe evidencia de que los astrocitos velados retienen Brevican en su superficie membranal, un proteoglicano que inhibe el crecimiento de las neuritas de las GCs, controlando la entrada de axones y dendritas al glomérulo durante su formación (Yamada et al., 1997), es posible que el aumento en el número de astrocitos aumente la producción de esta molécula e inhiba la maduración de las sinapsis. Las GCs hacen sinapsis con las PCs a través de las fibras paralelas y Wang et al. (2018) demostraron una disminución en la frecuencia de corrientes postsinápticas excitadoras y una disminución en la frecuencia y amplitud de corrientes postsinápticas inhibitoras. Estos resultados sugieren una alteración de las sinapsis que mantienen las PCs con las GCs excitadoras y las fibras trepadoras inhibitoras.

Allen et al. (2022), demostraron que los astrocitos derivados de individuos con TEA trasplantados en el hipocampo de roedores sanos muestran un aumento en las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas y activadas; las cuales correlacionan con la aparición de conductas repetitivas, alteración en la memoria y potenciación a largo plazo, reducción de la actividad neuronal y disminución de la densidad de espinas dendríticas en los roedores trasplantados (Allen et al., 2022).

Estos hallazgos sobre las GCs junto con las alteraciones en la población de las PCs son relevantes porque estos dos tipos celulares representan la principal unidad funcional del cerebelo, la cual se ve afectada en el modelo VPA por el incremento en la dinámica de

calcio de las redes funcionales neurona-astrocito, sugiriendo un papel importante en la etiología del TEA.

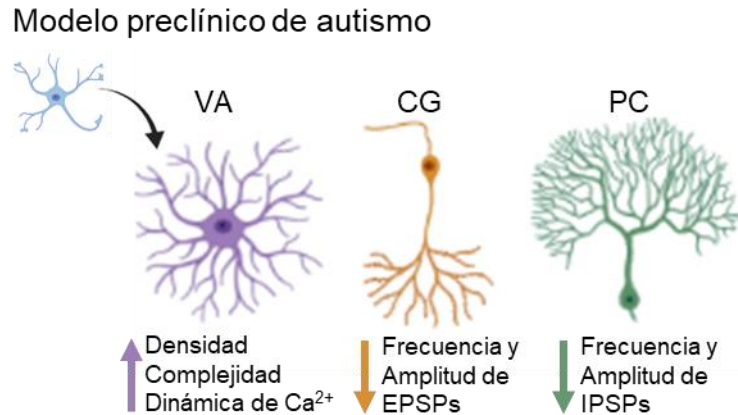


Figura 21. Principales hallazgos observados en el modelo VPA. Los astrocitos velados aumentan su densidad, complejidad y dinámica de Ca^{2+} en la IGL donde rodean las sinapsis del glómulo cerebeloso (Soria-Ortiz et al., 2021); posiblemente con un rol importante sobre la disminución de la frecuencia y amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSPs) de las GCs y de las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSPs) de las PCs (Wang et al., 2018).

9. CONCLUSIONES

Los ratones expuestos prenatalmente a VPA presentan alteraciones sensoriomotoras y de la conducta social, disminución de la densidad de PCs y un aumento de la densidad de astrocitos en las regiones Crus I/II del cerebelo, así como cambios en su morfología, que correlaciona con un incremento en el nivel de expresión de la proteína GFAP durante el desarrollo postnatal. La onda de calcio evocada por despolarización de la IGL tuvo una expansión mayor, reclutó más células y una amplitud promedio del transitorio de Ca^{2+} aumentada en el modelo VPA. Con base en estos resultados se concluye que la función de los ensambles glio-neuronales está notablemente incrementada en el modelo preclínico de autismo. Esto puede repercutir negativamente sobre el desarrollo del cerebelo y el funcionamiento de los circuitos cerebelares que se presentan en el autismo.

BIBLIOGRAFIA

- Al Sagheer, T., Haida, O., Balbous, A., Francheteau, M., Matas, E., Fernagut, P. O., & Jaber, M. (2018). Motor impairments correlate with social deficits and restricted neuronal loss in an environmental model of autism. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 21(9). <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy043>
- Allen, M., Huang, B. S., Notaras, M. J., Lodhi, A., Barrio-Alonso, E., Lituma, P. J., Wolujewicz, P., Witzum, J., Longo, F., Chen, M., Greening, D. W., Klann, E., Ross, M. E., Liston, C., & Colak, D. (2022). Astrocytes derived from ASD individuals alter behavior and destabilize neuronal activity through aberrant Ca²⁺ signaling. *Molecular Psychiatry*, 27(5), 2470–2484. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01486-x>
- Amaral, D. G., Schumann, C. M., & Nordahl, C. W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends in Neurosciences*, 31(3), 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.12.005>
- Appaix, F., Girod, S., Boisseau, S., Römer, J., Vial, J. C., Albrieux, M., Maurin, M., Depaulis, A., Guillemain, I., & van der Sanden, B. (2012). Specific in vivo staining of astrocytes in the whole brain after intravenous injection of sulforhodamine dyes. *PLoS ONE*, 7(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035169>
- Bailey, A., Luthert, P., Dean, A., Harding, B., Janota, I., Montgomery, M., Rutter, M., & Lantos, P. (1998). A clinicopathological study of autism. *Brain*, 121(5), 889–905. <https://doi.org/10.1093/brain/121.5.889>
- Banerjee, S., Riordan, M., & Bhat, M. A. (2014). Genetic aspects of autism spectrum disorders: Insights from animal models. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(FEB), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00058>
- Bauman. (1985). Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology*, 35(6), 866–874.
- Bauman, M. L., & Kemper, T. L. (2005). Neuroanatomic observations of the brain in autism: A review and future directions. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(2-3 SPEC. ISS.), 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.09.006>
- Bazargani, N., & Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: The third wave. *Nature*

- Neuroscience*, 19(2), 182–189. <https://doi.org/10.1038/nn.4201>
- Biamonte, F., Assenza, G., Marino, R., D'Amelio, M., Panteri, R., Caruso, D., Scurati, S., Yague, J. G., Garcia-Segura, L. M., Cesa, R., Strata, P., Melcangi, R. C., & Keller, F. (2009). Interactions between neuroactive steroids and reelin haploinsufficiency in Purkinje cell survival. *Neurobiology of Disease*, 36(1), 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.001>
- Brambilla, P., Hardan, A., Ucelli Di Nemi, S., Perez, J., Soares, J. C., & Barale, F. (2003). Brain anatomy and development in autism: Review of structural MRI studies. *Brain Research Bulletin*, 61(6), 557–569. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2003.06.001>
- Bronzuoli, M. R., Facchinetti, R., Ingrassia, D., Sarvadio, M., Schiavi, S., Steardo, L., Verkhratsky, A., Trezza, V., & Scuderi, C. (2018). Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. *Molecular Autism*, 9(1), 9–66. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0254-0>
- Buffo, A., & Rossi, F. (2013). Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Progress in Neurobiology*, 109, 42–63. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.08.001>
- Butts, T., Green, M. J., & Wingate, R. J. T. (2014). Development of the cerebellum: simple steps to make a “little brain.” *Development*, 141(21), 4031–4041. <https://doi.org/10.1242/dev.106559>
- Casanova, M. F. (2015). The neuropathology of autism. *The Molecular Basis of Autism*, 2000(24), 153–171. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2190-4_8
- Cerrato, V. (2020). Cerebellar Astrocytes: Much more than passive bystanders in ataxia pathophysiology. *Journal of Clinical Medicine*, 9(3), 757. <https://doi.org/10.3390/jcm9030757>
- Christensen, J., Grønborg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., & Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*, 309(16), 1696–1703. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>
- Christianson Arnold L, Chester Nicole, K. J. G. R. (1994). Fetal valproate syndrome : clinical and neurodevelopmental features in two sibling pairs. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 36, 357–369.

- Courchesne, E., Campbell, K., & Solso, S. (2011). Brain growth across the life span in autism: Age-specific changes in anatomical pathology. *Brain Research*, 1380, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.101>
- Courchesne, E., Karns, C. M., Davis, H. R., Ziccardi, R., Carper, R. A., Tigue, Z. D., Chisum, H. J., Moses, P., Pierce, K., Lord, C., Lincoln, A. J., Pizzo, S., Schreibman, L., Haas, R. H., Akshoomoff, N. A., & Courchesne, R. Y. (2001). Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: An MRI study. *Neurology*, 57(2), 245–254. <https://doi.org/10.1212/WNL.57.2.245>
- Courchesne, E., Pierce, K., Schumann, C. M., Redcay, E., Buckwalter, J. A., Kennedy, D. P., & Morgan, J. (2007). Mapping early brain development in autism. *Neuron*, 56(2), 399–413. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.016>
- Crippa, A., Del Vecchio, G., Ceccarelli, S. B., Nobile, M., Arrigoni, F., & Brambilla, P. (2016). Cortico-cerebellar connectivity in autism spectrum disorder: What do we know so far? *Frontiers in Psychiatry*, 7(FEB), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00020>
- D’Mello, A. M., Crocetti, D., Mostofsky, S. H., & Stoodley, C. J. (2015). Cerebellar gray matter and lobular volumes correlate with core autism symptoms. *NeuroImage: Clinical*, 7, 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.02.007>
- De Vuyst, E., Decrock, E., Cabooter, L., Dubyak, G. R., Naus, C. C., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2006). Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *The EMBO Journal*, 25(1), 34–44. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600908>
- Didonato, C., & Bodganik, L. (2011). Behavioral Phenotyping for neonates: Righting reflex. *Treat-NMD*, 2, 2–7.
- Dodero, L., Damiano, M., Galbusera, A., Bifone, A., Tsafaris, S. A., Scattoni, M. L., & Gozzi, A. (2013). Neuroimaging evidence of major morpho-anatomical and functional abnormalities in the BTBR T+TF/J mouse model of autism. *PLoS ONE*, 8(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076655>
- DSM-5. (2014). DSM-V Manual Estadístico Diagnóstico. In *Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM-5®* (Quinta). Editorial médica panamericana.
- Edmonson, C., Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2014). Altered glial marker expression in

- autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. *Molecular Autism*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-3>
- Fatemi, S. H., Stary, J. M., Halt, A. R., & Realmuto, G. R. (2001). Dysregulation of reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 31(6), 529–535. <https://doi.org/10.1023/A:1013234708757>
- Favre, M. R., Barkat, T. R., LaMendola, D., Khazen, G., Markram, H., & Markram, K. (2013). General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00088>
- Fombonne, E., Marcin, C., Manero, A. C., Bruno, R., Diaz, C., Villalobos, M., Ramsay, K., & Nealy, B. (2016). Prevalence of autism Spectrum disorders in Guanajuato, Mexico: The Leon survey. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(5), 1669–1685. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2696-6>
- Fujii, Y., Maekawa, S., & Morita, M. (2017). Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13243-0>
- Fukuchi, M., Nii, T., Ishimaru, N., Minamino, A., Hara, D., Takasaki, I., Tabuchi, A., & Tsuda, M. (2009). Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neuroscience Research*, 65(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.05.002>
- Gandal, M. J., Edgar, J. C., Ehrlichman, R. S., Mehta, M., Roberts, T. P. L., & Siegel, S. J. (2010). Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biological Psychiatry*, 68(12), 1100–1106. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.09.031>
- Ge, Y., Belcher, S. M., Pierce, D. R., & Light, K. E. (2004). Detection of Purkinje cell loss following drug exposures to developing rat pups using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis for calbindin-D28k mRNA expression. *Toxicology Letters*, 150(3), 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.02.003>
- Go, H. S., Kim, K. C., Choi, C. S., Jeon, S. J., Kwon, K. J., Han, S. H., Lee, J., Cheong, J. H., Ryu, J. H., Kim, C. H., Ko, K. 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*, 63(6), 1028–1041. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.028>
- Gregory, E. H., & Pfaff, D. W. (1971). Development of olfactory-guided behavior in infant rats. *Physiology and Behavior*, 6(5), 573–576. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(71\)90208-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(71)90208-3)
- Guerra, M., Medici, V., Weatheritt, R., Corvino, V., Palacios, D., Geloso, M. C., Farini, D., & Sette, C. (2023). Fetal exposure to valproic acid dysregulates the expression of autism-linked genes in the developing cerebellum. *Translational Psychiatry*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02391-9>
- Gurvich, N., Tsygankova, O. M., Meinkoth, J. L., & Klein, P. S. (2004). Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Research*, 64(3), 1079–1086. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-0799>
- Haas, B., Schipke, C. G., Peters, O., Söhl, G., Willecke, K., & Kettenmann, H. (2006). Activity-dependent ATP-waves in the mouse neocortex are independent from astrocytic calcium waves. *Cerebral Cortex*, 16(2), 237–246. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi101>
- Heizmann Claus. (1993). Chemical signaling in the brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 53, 15–23. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1193-58>
- Hockberger, E., & Connor, A. (1987). Immunocytochemical and electrophysiological cerebellar granule cells in explant cultures differentiation of rat. *Cultures*, 7(May).
- Hoogland, T. M., & Kuhn, B. (2010). Recent developments in the understanding of astrocyte function in the Cerebellum in vivo. *Cerebellum*, 9(3), 264–271. <https://doi.org/10.1007/s12311-009-0139-z>
- Houades, V., Rouach, N., Ezan, P., Kirchhoff, F., Koulakoff, A., & Giaume, C. (2006). Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron Glia Biology*, 2(1), 3–14. <https://doi.org/10.1017/s1740925x06000081>
- Hvas, C. L., Henriksen, T. B., østergaard, J. R., & Dam, M. (2000). Epilepsy and pregnancy: Effect of antiepileptic drugs and lifestyle on birthweight. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 107(7), 896–902.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2000.tb11089.x>

- Ikegaya, Y., Le Bon-Jego, M., & Yuste, R. (2005). Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neuroscience Research*, *52*(2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.02.004>
- 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*, *22*(3), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00083-5)
- Johannessen, C. U. (2000). Mechanisms of action of valproate: A commentary. *Neurochemistry International*, *37*(2–3), 103–110. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(00\)00013-9](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(00)00013-9)
- Kafitz, K. W., Meier, S. D., Stephan, J., & Rose, C. R. (2008). Developmental profile and properties of sulforhodamine 101—Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Methods*, *169*(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.11.022>
- Kang, M., & Othmer, H. G. (2009). Spatiotemporal characteristics of calcium dynamics in astrocytes. *Chaos*, *19*(3). <https://doi.org/10.1063/1.3206698>
- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., & Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(1), 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>
- Kazlauskas, N., Campolongo, M., Lucchina, L., Zappala, C., & Depino, A. M. (2016). Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, *72*, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.06.001>
- Kemper, T. L. y B. M. (1988). Kemper_Infantile Autism.pdf. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *57*(7), 645–652.
- Kilic, D., Pedersen, H., Kjaersgaard, M. I. S., Parner, E. T., Vestergaard, M., Sørensen, M. J., Olsen, J., Bech, B. H., Christensen, J., & Pedersen, L. H. (2014). Birth outcomes after prenatal exposure to antiepileptic drugs - A population-based study. *Epilepsia*, *55*(11), 1714–1721. <https://doi.org/10.1111/epi.12758>

- Kim, K. C., Kim, P., Go, H. S., Choi, C. S., Park, J. H., Kim, H. J., Jeon, S. J., Dela Pena, I. C., Han, S. H., Cheong, J. H., Ryu, J. H., & Shin, C. Y. (2013). Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *Journal of Neurochemistry*, *124*(6), 832–843. <https://doi.org/10.1111/jnc.12147>
- Kim, K. C., Kim, P., Go, H. S., Choi, C. S., Yang, S. Il, Cheong, J. H., Shin, C. Y., & Ko, K. H. (2011). The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. *Toxicology Letters*, *201*(2), 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.018>
- Kim, K. C., Lee, D. K., Go, H. S., Kim, P., Choi, C. S., Kim, J. W., Jeon, S. J., Song, M. R., & Shin, C. Y. (2014). Pax6-dependent cortical glutamatergic neuronal differentiation regulates autism-like behavior in prenatally valproic acid-exposed rat offspring. *Molecular Neurobiology*, *49*(1), 512–528. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8535-2>
- Kowalski, T. W., Lord, V. O., Sgarioni, E., Gomes, J. do A., Mariath, L. M., Recamonde-Mendoza, M., & Vianna, F. S. L. (2022). Transcriptome meta-analysis of valproic acid exposure in human embryonic stem cells. *European Neuropsychopharmacology*, *60*, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2022.04.008>
- Kumada, T., & Komuro, H. (2004). Completion of neuronal migration regulated by loss of Ca²⁺ transients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(22), 8479–8484. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401000101>
- Labrada-Moncada, F. E., Martínez-Torres, A., & Reyes-Haro, D. (2020). GABAA receptors are selectively expressed in NG2 glia of the cerebellar white matter. *Neuroscience*, *433*, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.003>
- Lagace, D. C., O'Brien, W. T., Gurvich, N., Nachtigal, M. W., & Klein, P. S. (2004). Valproic acid: How it works. Or not. *Clinical Neuroscience Research*, *4*(3-4 SPEC. ISS.), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.cnr.2004.09.013>
- Lanjakornsiripan, D., Pior, B. J., Kawaguchi, D., Furutachi, S., Tahara, T., Katsuyama, Y., Suzuki, Y., Fukazawa, Y., & Gotoh, Y. (2018). Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03940-3>

- Laurence, J. A., & Fatemi, S. H. (2005). Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Cerebellum*, *4*(3), 206–210. <https://doi.org/10.1080/14734220500208846>
- 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>
- Lloyd, M., MacDonald, M., & Lord, C. (2013). Motor skills of toddlers with autism spectrum disorders. *Autism*, *17*(2), 133–146. <https://doi.org/10.1177/1362361311402230>
- Mabunga, D. F. N., Gonzales, E. L. T., Kim, J., Kim, K. C., & Shin, C. Y. (2015). Exploring the validity of valproic acid animal model of autism. *Experimental Neurobiology*, *24*(4), 285. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>
- MacHold, R., & Fishell, G. (2005). Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron*, *48*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.028>
- Magliaro, C., Cocito, C., Bagatella, S., Merighi, A., Ahluwalia, A., & Lossi, L. (2016). The number of Purkinje neurons and their topology in the cerebellar vermis of normal and reIn haplodeficient mouse. *Annals of Anatomy*, *207*, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.02.009>
- Mandell, D. S., Novak, M. M., & Zubritsky, C. D. (2005). Factors associated with age of diagnosis among children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, *116*(6), 1480–1486. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-0185>
- Marchetto, M. C., Belinson, H., Tian, Y., Freitas, B. C., Fu, C., Vadodaria, K. C., Beltrao-Braga, P. C., Trujillo, C. A., Mendes, A. P. D., Padmanabhan, K., Nunez, Y., Ou, J., Ghosh, H., Wright, R., Brennand, K. J., Pierce, K., Eichenfield, L., Pramparo, T., Eyler, L. T., ... Muotri, A. R. (2017). Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. *Molecular Psychiatry*, *22*(6), 820–835. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.95>
- Margulis, A. V., Hernandez-Diaz, S., McElrath, T., Rothman, K. J., Plana, E., Almqvist, C., D’Onofrio, B. M., & Oberg, A. S. (2019). Relation of in-utero exposure to antiepileptic drugs to pregnancy duration and size at birth. *PLoS ONE*, *14*(8), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214180>

- Markram, K., Rinaldi, T., Mendola, D. La, Sandi, C., & Markram, H. (2008). Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 33(4), 901–912. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301453>
- Marzban, H., Del Bigio, M. R., Alizadeh, J., Ghavami, S., Zachariah, R. M., & Rastegar, M. (2015). Cellular commitment in the developing cerebellum. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(JAN), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00450>
- McFarlane, H. G., Kusek, G. K., Yang, M., Phoenix, J. L., Bolivar, V. J., & Crawley, J. N. (2008). Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes, Brain and Behavior*, 7(2), 152–163. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00330.x>
- Melancia, F., Schiavi, S., Servadio, M., Cartocci, V., Campolongo, P., Palmery, M., Pallottini, V., & Trezza, V. (2018). Sex-specific autistic endophenotypes induced by prenatal exposure to valproic acid involve anandamide signalling. *British Journal of Pharmacology*, 175(18), 3699–3712. <https://doi.org/10.1111/bph.14435>
- Menashe, I., Grange, P., Larsen, E. C., Banerjee-Basu, S., & Mitra, P. P. (2013). Co-expression Profiling of Autism Genes in the Mouse Brain. *PLoS Computational Biology*, 9(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003128>
- Mesdjian, E., Ciesielski, L., Valli, M., Bruguerolle, B., Jadot, G., Bouyard, P., & Mandel, P. (1982). Sodium valproate: Kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 6(3), 223–233. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(82\)80172-3](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(82)80172-3)
- Miterko, L. N., Baker, K. B., Beckinghausen, J., Bradnam, L. V., Cheng, M. Y., Cooperrider, J., DeLong, M. R., Gornati, S. V., Hallett, M., Heck, D. H., Hoebeek, F. E., Kouzani, A. Z., Kuo, S. H., Louis, E. D., Machado, A., Manto, M., McCambridge, A. B., Nitsche, M. A., Taib, N. O. Ben, ... Sillitoe, R. V. (2019). Consensus paper: experimental neurostimulation of the cerebellum. *Cerebellum*, 18(6), 1064–1097. <https://doi.org/10.1007/s12311-019-01041-5>
- Moeton, M., Stassen, O. M. J. A., Sluijs, J. A., van der Meer, V. W. N., Kluivers, L. J., van Hoorn, H., Schmidt, T., Reits, E. A. J., van Strien, M. E., & Hol, E. M. (2016). GFAP isoforms control intermediate filament network dynamics, cell morphology, and focal adhesions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(21), 4101–4120. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2239-5>

- Mony, T. J., Lee, J. W., Dreyfus, C., DiCicco-Bloom, E., & Lee, H. J. (2016). Valproic acid exposure during early postnatal gliogenesis leads to autistic-like behaviors in rats. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 14(4), 338–344. <https://doi.org/10.9758/cpn.2016.14.4.338>
- Moore, S. J., Turnpenny, P., Quinn, A., Glover, S., Lloyd, D. J., Montgomery, T., & Dean, J. C. (2000). A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *Journal of Medical Genetics*, 37(7), 489–497. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882750><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1734633>
- Mowery, T. M., Wilson, S. M., Kostylev, P. V., Dina, B., Buchholz, J. B., Prieto, A. L., & Garraghty, P. E. (2015). Embryological exposure to valproic acid disrupts morphology of the deep cerebellar nuclei in a sexually dimorphic way. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 40, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.10.003>
- Nedergaard, M., Rodríguez, J. J., & Verkhratsky, A. (2010). Glial calcium and diseases of the nervous system. *Cell Calcium*, 47(2), 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.11.010>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N. D., & Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature Methods*, 1(1), 31–37. <https://doi.org/10.1038/nmeth706>
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U. K., Kirchhoff, F., & Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia*, 33(1), 72–86. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(20010101\)33:1<72::AID-GLIA1007>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1098-1136(20010101)33:1<72::AID-GLIA1007>3.0.CO;2-A)
- Pacey, L. K. K., Guan, S., Tharmalingam, S., Thomsen, C., & Hampson, D. R. (2015). Persistent astrocyte activation in the fragile X mouse cerebellum. *Brain and Behavior*, 5(10), 1–12. <https://doi.org/10.1002/brb3.400>
- Pennington, M. L., Cullinan, D., & Southern, L. B. (2014). Defining autism: variability in state education agency definitions of and evaluations for autism spectrum disorders. *Autism Research and Treatment*, 2014(c), 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/327271>

- Perez-Pouchoulen, M., Miquel, M., Saft, P., Brug, B., Toledo, R., Hernandez, M. E., & Manzo, J. (2016). Prenatal exposure to sodium valproate alters androgen receptor expression in the developing cerebellum in a region and age specific manner in male and female rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *53*, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.07.001>
- Peters, O., Schipke, C. G., Hashimoto, Y., & Kettenmann, H. (2003). Different mechanisms promote astrocyte Ca²⁺ waves and spreading depression in the mouse neocortex. *The Journal of Neuroscience*, *23*(30), 9888–9896. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-30-09888.2003>
- Reeves, A. M. B., Shigetomi, E., & Khakh, B. S. (2011). Bulk loading of calcium indicator dyes to study astrocyte physiology: Key limitations and improvements using morphological maps. *Journal of Neuroscience*, *31*(25), 9353–9358. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0127-11.2011>
- Reyes-Haro, D., González-González, M. A., Pétriz, A., Rosas-Arellano, A., Kettenmann, H., Miledi, R., & Martínez-Torres, A. (2013). γ -Aminobutyric acid-p expression in ependymal glial cells of the mouse cerebellum. *Journal of Neuroscience Research*, *91*(4), 527–534. <https://doi.org/10.1002/jnr.23183>
- Reyes-Haro, D., Labrada-Moncada, F. E., Miledi, R., & Martínez-Torres, A. (2015). Dehydration-induced anorexia reduces astrocyte density in the rat corpus callosum. *Neural Plasticity*, *2015*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/474917>
- Reyes-Ortega, P., Ragu Varman, D., Rodríguez, V. M., & Reyes-Haro, D. (2020). Anorexia induces a microglial associated pro-inflammatory environment and correlates with neurodegeneration in the prefrontal cortex of young female rats. *Behavioural Brain Research*, *392*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112606>
- Roullet, 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*, *170*(2), 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.069>
- Roullet, Florence I., Lai, J. K. Y., & Foster, J. A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism - A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and Teratology*, *36*, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.004>

- Schipke, C. G., Haas, B., & Kettenmann, H. (2008). Astrocytes discriminate and selectively respond to the activity of a subpopulation of neurons within the barrel cortex. *Cerebral Cortex*, *18*(10), 2450–2459. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn009>
- Schmahmann, J. D. (2019). The cerebellum and cognition. *Neuroscience Letters*, *688*(April), 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.005>
- Schneider, T., & Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, *30*(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
- Silbereis, J., Cheng, E., Ganat, Y. M., Ment, L. R., & Vaccarino, F. M. (2009). Precursors with glial fibrillary acidic protein promoter activity transiently generate GABA interneurons in the postnatal cerebellum. *Stem Cells*, *27*(5), 1152–1163. <https://doi.org/10.1002/stem.18>
- Silbereis, J., Heintz, T., Taylor, M. M., Ganat, Y., Ment, L. R., Bordey, A., & Vaccarino, F. (2010). Astroglial cells in the external granular layer are precursors of cerebellar granule neurons in neonates. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *44*(4), 362–373. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.05.001>
- Skefos, J., Cummings, C., Enzer, K., Holiday, J., Weed, K., Levy, E., Yuce, T., Kemper, T., & Bauman, M. (2014). Regional alterations in Purkinje cell density in patients with autism. *PLoS ONE*, *9*(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081255>
- Stoodley, Catherine; Valera, Eve; Schmahmann, J. (2012). Functional topography of the cerebellum for cognitive and motor tasks. *Neuron*, *59*(2), 1560–1570. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.08.065>
- Stoodley, C. J., Valera, E. M., & Schmahmann, J. D. (2012a). Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: An fMRI study. *NeuroImage*, *59*(2), 1560–1570. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.08.065>
- Stoodley, C. J., Valera, E. M., & Schmahmann, J. D. (2012b). Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: An fMRI study. *NeuroImage*, *59*(2), 1560–1570. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2011.08.065>
- Suzuki, L., Coulon, P., Sabel-Goedknecht, E. H., & Ruigrok, T. J. H. (2012). Organization of cerebral projections to identified cerebellar zones in the posterior cerebellum of the rat. *Journal of Neuroscience*, *32*(32), 10854–10869.

- <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0857-12.2012>
- Takeda, K., Watanabe, T., Oyabu, K., Tsukamoto, S., Oba, Y., Nakano, T., Kubota, K., Katsurabayashi, S., & Iwasaki, K. (2021). Valproic acid-exposed astrocytes impair inhibitory synapse formation and function. *Scientific Reports*, *11*(1), 23. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79520-7>
- Tanaka, M. (2008). Connexin43 and Bergmann glial gap junctions in cerebellar function. *Frontiers in Neuroscience*, *2*(2), 225–233. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.038.2008>
- Terbach, N., & Williams, R. S. B. (2009). Structure–function studies for the panacea, valproic acid. *Biochemical Society Transactions*, *37*(5), 1126–1132. <https://doi.org/10.1042/bst0371126>
- Totland, M. Z., Rasmussen, N. L., Knudsen, L. M., & Leithe, E. (2020). Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *77*(4), 573–591. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03285-0>
- Vajda, F. J., O'Brien, T. J., Hitchcock, A., Graham, J., Cook, M., Lander, C., & Eadie, M. J. (2004). Critical relationship between sodium valproate dose and human teratogenicity: Results of the Australian register of anti-epileptic drugs in pregnancy. *Journal of Clinical Neuroscience*, *11*(8), 854–858. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2004.05.003>
- Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., & Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology*, *57*(1), 67–81. <https://doi.org/10.1002/ana.20315>
- Varman, D. R., Soria-Ortiz, M. B., Martínez-Torres, A., & Reyes-Haro, D. (2018). GABA_A3 expression in lobule X of the cerebellum is reduced in the valproate model of autism. *Neuroscience Letters*, *687*, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.09.042>
- Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, *98*(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Verkhratsky, A., Rodríguez, J. J., & Parpura, V. (2012). Calcium signalling in astroglia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *353*(1–2), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.039>
- Wagner, G. C., Reuhl, K. R., Cheh, M., McRae, P., & Halladay, A. K. (2006). A new

- neurobehavioral model of autism in mice: Pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 36(6), 779–793. <https://doi.org/10.1007/s10803-006-0117-y>
- Wang, Q., Kong, Y., Wu, D. Y., Liu, J. H., Jie, W., You, Q. L., Huang, L., Hu, J., Chu, H. De, Gao, F., Hu, N. Y., Luo, Z. C., Li, X. W., Li, S. J., Wu, Z. F., Li, Y. L., Yang, J. M., & Gao, T. M. (2021). Impaired calcium signaling in astrocytes modulates autism spectrum disorder-like behaviors in mice. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23843-0>
- Wang, R., Tan, J., Guo, J., Zheng, Y., Han, Q., So, K. F., Yu, J., & Zhang, L. (2018). Aberrant development and synaptic transmission of cerebellar cortex in a VPA induced mouse autism model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00500>
- Wang, S., Kloth, A. D., & Badura, A. (2014). The cerebellum, sensitive periods, and autism. *Neuron*, 83(3), 518–532. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.016>
- Wang, V. Y. ., Rose, M. F. ., & Zoghbi, H. Y. . (2005). Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron*, 48(1), 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.024>
- Whitney, E. R., Kemper, T. L., Bauman, M. L., Rosene, D. L., & Blatt, G. J. (2008). Cerebellar Purkinje cells are reduced in a subpopulation of autistic brains: A stereological experiment using calbindin-D28k. *Cerebellum*, 7(3), 406–416. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0043-y>
- Yamada, H., Fredette, B., Shitara, K., Hagihara, K., Miura, R., Ranscht, B., Stallcup, W. B., & Yamaguchi, Y. (1997). The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. *Journal of Neuroscience*, 17(20), 7784–7795. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-20-07784.1997>
- Yang, Z., & Wang, K. K. W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, 38(6), 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>
- Yochum, C. L., Dowling, P., Reuhl, K. R., Wagner, G. C., & Ming, X. (2008). VPA-induced apoptosis and behavioral deficits in neonatal mice. *Brain Research*, 1203, 126–132.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.055>

- York, E. M., Ledue, J. M., Bernier, L. P., & Macvicar, B. A. (2018). 3Dmorph automatic analysis of microglial morphology in three dimensions from ex vivo and in vivo imaging. *ENeuro*, *5*(6), 1–12. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0266-18.2018>
- Zeidan, J., Fombonne, E., Scolah, J., Ibrahim, A., Durkin, M. S., Saxena, S., Yusuf, A., Shih, A., & Elsabbagh, M. (2022). Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Research*, *15*(5), 778–790. <https://doi.org/10.1002/aur.2696>
- Zorec, R., Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Verkhratsky, A., & Parpura, V. (2012). Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro*, *4*(2), 103–119. <https://doi.org/10.1042/AN20110061>

LISTA DE FIGURAS	Página
1 Estructuras cerebelares asociadas al TEA	9
2 Composición celular de la corteza cerebelosa	12
3 Esquema sagital del cerebelo en desarrollo	14
4 Esquema cronológico del desarrollo del cerebelo del roedor	15
5 Posibles mecanismos de proliferación glial del cerebelo	16
6 Circuitos cerebelosos y expresión genética involucrados en el TEA	17
7 Reconocimiento del nido	30
8 Reflejo de enderezamiento	31
9 Aproximación social	32
10 La sulforodamina (SRB) marca células GFP+	40
11 Tamaño de la camada	41
12 El peso del cerebro se altera durante el desarrollo postnatal P1, P8 y P18	43
13 Deficiencias en habilidades sensoriomotoras y sociales en el modelo VPA	45
14 La expresión de calbindina disminuye en el cerebelo de los ratones prenatalmente expuestos al VPA	46
15 Pérdida de células de Purkinje en el modelo de VPA	48
16 La expresión de GFAP se incrementa en el modelo VPA	49
17 La densidad de astrocitos de la IGL aumenta en el modelo VPA	51
18 La onda de calcio se incrementa en el modelo VPA	53
19 La onda de calcio evocada por despolarización recluta más células gliales	55
20 Aumento de astrocitos reclutados en la onda de calcio del modelo VPA	56
21 Principales hallazgos observados en el modelo VPA	67

LISTA DE TABLAS	Página
1 Ejemplos del riesgo relativo del TEA con respecto a factores genéticos y ambientales	5
2 Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia y western blot	35
3 Estandarización de la amplitud de corriente	38
4 Peso corporal y del cerebro	43
5 Conteo celular por radio	54
6 Conteo de células SRB ⁺ por radio	57

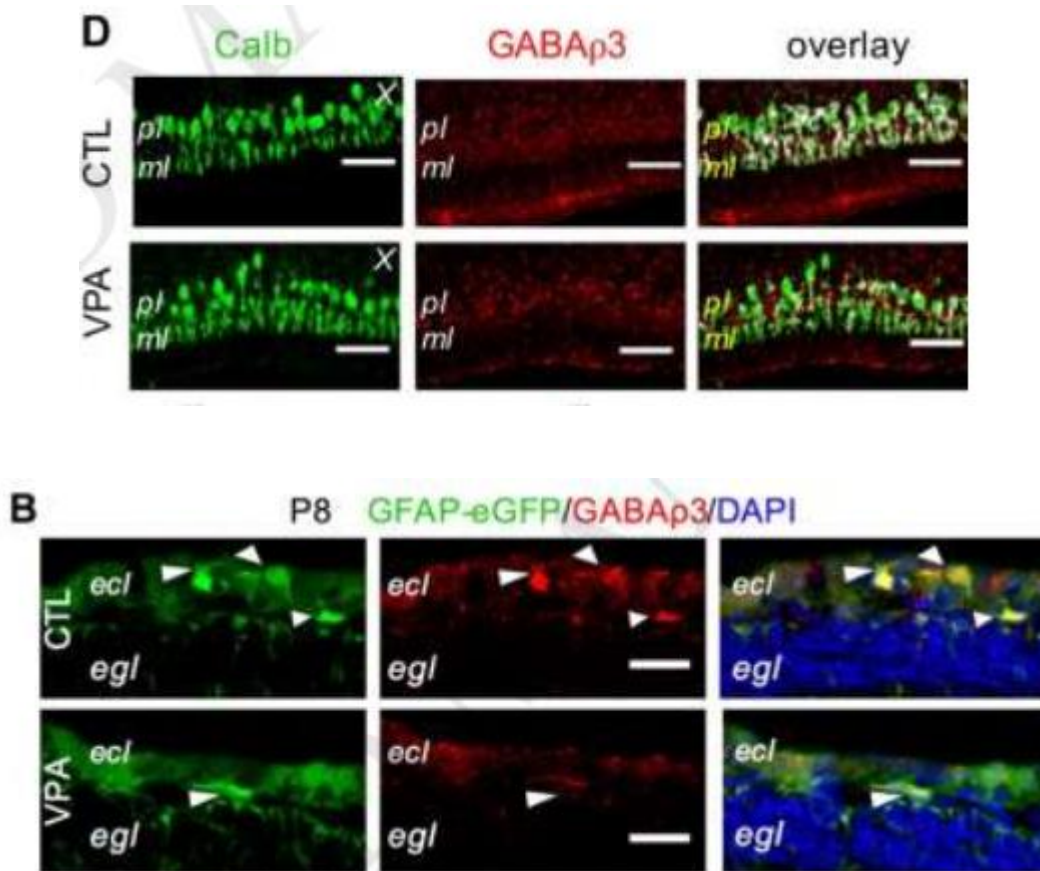
APÉNDICE I. Genes asociados al TEA (Banerjee et al., 2014).

Gene	Protein description	Nature of abnormality	Reference
NRXN1	Transmembrane	Mutation, CNVs	Feng et al. (2006)
NRXN2	Transmembrane	Mutation	Arstikaitis et al. (2011)
NRXN3	Transmembrane	Mutation	Vaags et al. (2012)
NLGN1	Transmembrane	Genetic association	Glessner et al. (2009)
NLGN3	Transmembrane	Mutation	Jamain et al. (2003)
NLGN4	Transmembrane	Mutation, CNVs	Jamain et al. (2003)
CNTN3	Ig-CAM	Mutation, CNVs	Morrow et al. (2008)
CNTN 4	Ig-CAM	Mutation	Roohi et al. (2009)
CNTNAP2	Transmembrane	Mutation, genetic association	Arking et al. (2008)
NrCAM	Ig-CAM	Genetic association	Marui et al. (2009)
CDH9/10	Transmembrane	Genetic association	Bucan et al. (2009)
CDH18	Transmembrane	Chromosomal abnormality	Marshall et al. (2006)
PCDH9	Transmembrane	Mutation	Marshall et al. (2008)
PCDH10	Transmembrane	Mutation	Morrow et al. (2008)
PCDH19	Transmembrane	Mutation	Dibbens et al. (2008)
SHANK1	Scaffolding	Mutation	Sato et al. (2012)
SHANK2	Scaffolding	Mutation	Berkel et al. (2010)
SHANK3	Scaffolding	Mutation	Durand et al. (2007)
DLG4 (disk large homolog 4)	Scaffolding	SNPs	Feyder et al. (2010)
HOMER1	Scaffolding	Mutation	Kelleher et al. (2012)
cAMP-GEF (guanine exchange factor)	Cytoskeletal	Mutation	Bacchelli et al. (2003)
RELN (Reelin)	Secreted	Genetic association	Persico et al. (2001)
EN2 (Engrailed 2)	Transcription factor	Genetic association	Gharani et al. (2004)

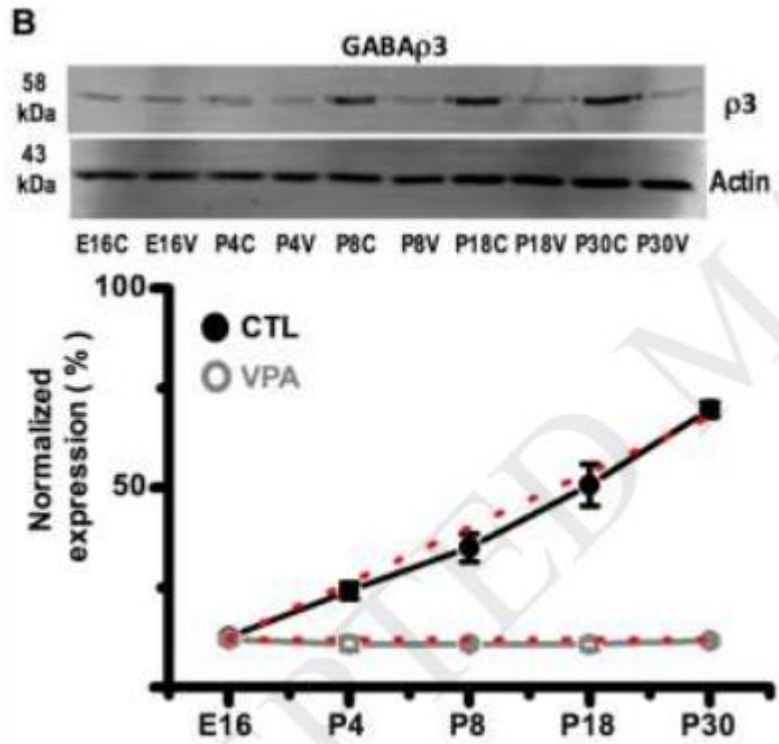
APÉNDICE II. Análisis fenotípico de los modelos animales con aportaciones relevantes al TEA (Banerjee et al., 2014).

Phenotype	Animal models								
	Non-human primate	Mouse	Rat	Prairie vole	Songbird	Zebrafish	<i>Drosophila</i>	<i>Aplysia</i>	<i>C. elegans</i>
Genetic analyses		+	+			+	+	+	+
Molecular analyses		+	+		+	+	+	+	+
Hyperactivity and repetitive behavior	+	+	+						
Social communication	+	+	+	+	+				
Cognition		+	+						
Impaired vocalization		+			+				

APÉNDICE III. Expresión del receptor $GABA_{\rho 3}$ en PCs y células gliales endimarias del cerebelo (Varman et al., 2018).



APÉNDICE IV. Expresión del receptor GABA ρ 3 en el cerebelo durante el primer mes postnatal (Varman et al., 2018).



APÉNDICE V. Análisis morfológico de astrocitos (York et al., 2018)

1. Adquirir imágenes en 3D de astrocitos individuales a 63x, en formato "Ism".
2. Del campo adquirido, seleccionar una célula en los 3 ejes y eliminar el resto de la señal en la imagen original.
3. Utilizar image J para realizar un cuadrante en los ejes x,y donde solo exista la señal de una sola célula.
4. Es probable que se deba rotar la imagen primero, para que el cuadrante quede más específico.
5. Duplicar el cuadrante para todo el stack en el eje Z.
6. Sobre ese cuadrante, duplicar únicamente los frames del stack en Z que contengan la señal de la célula elegida.
7. Descargar MATLAB y abrir el script 3DMorph.
8. Seleccionar el modo automático.
9. Seleccionar los parámetros.
10. Seleccionar las imágenes en 3D que se procesaron en image J, conteniendo una sola célula.
11. Guardar análisis.

APÉNDICE VI. Análisis de detección de células y propagación de la señal de calcio.

1. Abrir el video en image J.
2. Ajustar la escala a 3.08 pixeles por micrómetro.
3. Convertir a 8 bits.
4. Duplicar la primera imagen.
5. Restar la primera imagen del resto con image calculator.
6. Eliminar el ruido de fondo a 50 pixeles con subtract background.
7. Ajustar el brillo y el contraste al máximo.
8. Aplicar un filtro de promedios a 2.0.
9. Guardar con un nombre diferente.
10. Obtener una proyección en z.
11. Aplicar una capa de círculos concéntricos con incrementos de 10 – 50 μm de radio, siendo la pipeta el epicentro. Usar concentric circles.
12. Seleccionar cada célula con ROI manager, en orden por cada radio.
13. Guardar los ROIs.
14. Cuantificar el número de células por radio con cell counter. Guardar o tomar una captura de pantalla del conteo con la capa de círculos.
15. Armar un power point con esta información.
16. Seleccionar la línea straight para medir la distancia a la que está la célula más lejana del círculo más grande, nombrar como distancia máxima y anotar en un excel.
17. Sobre el video, determinar el tiempo post estímulo en el que la primera y la última célula se activaron y nombrar como t_1 = tiempo de última célula y t_0 = tiempo de primera célula.
18. Dividir la distancia máxima entre la diferencia de tiempos, anotar en un Excel.
19. Repetir para cada video y hacer la estadística.

APÉNDICE VII. Análisis del área bajo la curva.

1. Abrir el video original en image J.
2. Quitar ruido de fondo y restar la señal de la primera imagen y guardar con nombre diferente.
3. Abrir el ROI correspondiente al archivo.
4. Aplicar measure para obtener las intensidades promedio de los blancos de las células dentro de los ROIs con mean, desactivar el resto.
5. Guardar los archivos en formato .xls o más actual.
6. Graficar en Excel todas las columnas correspondientes a cada célula, en cada renglón se encuentra el valor numérico promedio de la intensidad de la fluorescencia, siendo la primera columna el tiempo para cada número.
7. Borrar el primer renglón que estará en ceros.
8. Determinar los primeros 15 s, como mínimo, de los trazos y asegurarse de que no hay incrementos de señal.
9. Hacer un promedio de los números de esas 15 celdas en el Excel y colocar el número justo al final de cada columna de cada célula.
10. Aplicar la fórmula $\Delta F = \Delta F / F_b$ en formato de hoja de cálculo en las siguientes columnas en blanco numeradas en el mismo orden, ejemplo = (C1-\$C\$300)/\$C\$300.
11. Aplicar enter para toda la columna.
12. Repetir el proceso para cada columna.
13. En la siguiente columna limpia, aplicar un promedio por cada renglón de todas las columnas con los valores normalizados para cada archivo Excel para armar los trazos promedio representativos.
14. Instalar anaconda 2 y spyder 5.2.2.
15. Abrir el script graficasv2.py en spyder.
16. Modificar las líneas de la dirección de origen del video, número de los segundos que se tomarán para normalizar y la dirección de carpeta de salida.
17. Correr el script y recolectar los resultados.

18. Cada gráfica muestra los picos que se tomaron en cuenta para calcular el área bajo la curva.
19. Elegir uno de los dos métodos trapezoide o Simpson para hacer estadística.