

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE HEMICANALES ASTROGLIALES DE
CRIAS DE MADRES MURINAS EXPUESTAS A INFLAMACIÓN
PRENATAL

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

BEATRIZ CAMILA AVENDAÑO VILLAGRA

TEMUCO – CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE HEMICANALES ASTROGLIALES DE
CRIAS DE MADRES MURINAS EXPUESTAS A INFLAMACIÓN
PRENATAL

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

BEATRIZ CAMILA AVENDAÑO VILLAGRA

PROFESOR GUIA: JUAN ANDRES ORELLANA ROCA

TEMUCO – CHILE

2013

“REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE CONEXIONES Y PANEXONES EN
ASTROCITOS DE CRIAS DE MADRES MURINAS EXPUESTAS A LPS DURANTE
LA PREÑEZ”

PROFESOR GUIA : _____
PhD. Juan Andrés Orellana Roca.
Profesor Asistente.
Doctor en Ciencias Biológicas.
Departamento de Neurología.
Escuela de Medicina.
Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

PROFESOR CONSEJERO : _____
PhD. Ricardo Nicolás Felmer Dórner.
Bioquímico.
Doctor en Reproducción Animal.
Departamento de Ciencias Agronómicas y
Recursos Naturales.
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales.
Universidad de la Frontera, Temuco.

CALIFICACION PROMEDIO TESIS : _____

INDICE

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Células gliales y funciones fisiológicas de los astrocitos	3
2.2 Activación astrogliar y daño cerebral	5
2.3 Hemicanales y su papel en la inflamación cerebral	7
2.4 Hemicanales en astrocitos	11
2.5 Moléculas neurotóxicas liberadas por los hemicanales de células gliales durante la inflamación	12
2.6 Señalización purinérgica y hemicanales	13
2.7 Posible papel de los hemicanales de células gliales en la disfunción cerebral inducida por inflamación prenatal	13
3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	16
3.1 Hipótesis	15
3.2 Objetivo general	15
3.3 Objetivos específicos	15
4 MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 Reactivos	16
4.2 Anticuerpos	17
4.3 Equipos	17
4.4 Animales experimentales	17
4.4.1 Modelos de inflamación prenatal	17
4.5 Cultivo celular	18
4.6 Medición de $[Ca^{2+}]_i$	19
4.7 Medición de IL-1 β , TNF- α	19
4.8 Determinación de óxido nítrico	20
4.9 Western blot: niveles de iNOS	20
4.10 Captación de etidio	21

4.11	Silenciamiento molecular con siRNAs	22
4.12	Inmunofluorescencia	22
4.13	Análisis estadístico	22
5	RESULTADOS	24
5.1	Medición de TNF-α/IL-1β, expresión de iNOS, producción de óxido nítrico y niveles basales de calcio intracelular.	24
5.2	Medición de la actividad de hemicanales e identificación de conexones y/o panexones responsables de la captación de etidio.	30
5.3	Expresión y distribución de la proteína Cx43.	32
5.4	Inhibición de iNOS y p38 MAP kinasa; Neutralización de IL-1β y TNF-α.	33
6	DISCUSIÓN	35
7	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	41

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de la caracterización de los canales formados por conexinas y panexinas.
- Figura 2.** Esquema de las moléculas que permean los hemicanales en condiciones fisiológicas e inflamatorias.
- Figura 3.** Esquema del diseño experimental.
- Figura 4.** Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal exhiben un aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, expresión de iNOS y liberación de ON.
- Figura 5.** Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal no mostraron cambios en los niveles basales de Ca^{2+} .
- Figura 6.** Astrocitos de la descendencia de ambos grupos prenatales presentan distintos patrones de dinámicas de Ca^{2+} intracelular evocadas por ATP.
- Figura 7.** Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal exhiben cambios en el porcentaje de astrocitos correspondientes a cada patrón comparando con el grupo control.
- Figura 8.** Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal tienen una mayor probabilidad de exhibir oscilaciones espontáneas.
- Figura 9.** Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal muestran un aumento en la captación de Etd mediada por hemicanales de Cx43.
- Figura 10.** Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal exhiben un cambio en la expresión de Cx43.
- Figura 11.** La vía iNOS y p38 MAP kinasa están involucradas en el aumento en la captación de Etd observado en astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal.

ABREVIACIONES

[Ca²⁺]_i	: Concentración de Ca ²⁺ intracelular
[Ca²⁺]_e	: Concentración de Ca ²⁺ extracelular
Ara-C	: Citosina β-D-arabinofuranósido
ATP	: Adenosina trifosfato
CL	: Loop citoplasmático
DAF-FM	: 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína Diacetato
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DAPI	: 4',6-diamino-2-fenilindol
FGF-1	: Factor de crecimiento de fibroblasto
FN-κβ	: Factor nuclear κβ
FURA-2AM	: Fura-2-acetoximetil ester
GPC	: Proteína G acoplada
hIL-1β	: Interleuquina-1β humana
HRP	: <i>Horseradish peroxidase</i>
IFN-γ	: Interferon gamma
IP3	: Inositol 1, 4, 5 trifosfato
MC	: Medio condicionado
PGE2	: Prostaglandina E
ROS	: Especies reactivas de oxígeno
SFB	: Suero fetal bovino
TLR-4	: Toll-like-receptor-4

RESUMEN

Estudios epidemiológicos indican que hijos de madres expuestas a infecciones durante el embarazo, tienen un mayor riesgo de desarrollar trastornos en el sistema nervioso central (SNC) durante la etapa adulta. En este mismo sentido, la administración sistémica de lipopolisacáridos (LPS) en roedores como modelo de inflamación prenatal ha demostrado una disminución en las capacidades cognitivas de la descendencia, así como daño estructural y apoptosis en el SNC. Aunque los mecanismos que explican este fenómeno aun se desconocen, se ha propuesto que la inflamación prenatal podría llevar a una inflamación cerebral fetal persistente, contribuyendo a la alteración de diversas etapas del desarrollo y maduración del SNC.

En el cerebro las microglías y astrocitos son las células encargadas de las respuestas inflamatorias y sirven como la principal fuente de producción de citoquinas en el parénquima cerebral. Por lo tanto, es concebible pensar que alteraciones en las funciones fisiológicas de estas células podrían cumplir un papel importante en el deterioro cerebral observado en las crías de madres expuestas a inflamación prenatal. Estudios recientes, indican que durante condiciones inflamatorias, la liberación de glutamato y ATP vía hemicanales (HCs) desde astrocitos induce muerte neuronal. Los hemicanales son canales de membrana plasmática permeables a iones y pequeñas moléculas, que facilitan el intercambio difusional entre el medio intra y extracelular. Estos canales pueden estar compuestos por la oligomerización de seis subunidades proteicas de dos tipos de familias de proteínas de membrana: conexinas o panexinas. De esta manera, los HCs también llamados conexones o panexones según corresponda, permiten la liberación de cantidades relevantes de diversas moléculas auto y paracrina (e.j., glutamato, ATP, PEG² y glutatión). Importantemente, se ha postulado que la desregulación de éstos canales podría contribuir al comienzo y la progresión de diversas patologías cerebrales. Bajo este punto de vista, la liberación exacerbada de glutamato y/o ATP liberado vía HCs desde los astrocitos, podría explicar en parte la apoptosis, daño estructural y alteraciones conductuales observadas en las crías de madres expuestas a inflamación prenatal. Teniendo en cuenta estos antecedentes, la hipótesis del estudio fue: "***La actividad de HCs se incrementa en***

astrocitos de las crías de madres expuestas a LPS prenatal". Para abordar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos específicos: i) Determinar si los niveles de citoquinas, producción de ON, activación de la vía iNOS y los niveles de Ca^{2+} intracelular se alteran en astrocitos obtenidos a partir de la descendencia de ratonas expuestas a LPS prenatal; ii) Determinar si la actividad de HCs se altera en astrocitos de las crías de la descendencia de ratonas expuestas a LPS prenatal e identificar las conexinas/panexinas involucradas; iii) Determinar si la expresión y distribución de la Cx43 se altera en astrocitos de las crías de la descendencia de ratonas expuestas a LPS prenatal; y iv) Estudiar si la actividad de HCs de astrocitos observada en la descendencia de ratonas expuestas a LPS es inhibida por la neutralización de IL-1 β y TNF- α , inhibición de iNOS y/o p38 MAP kinasa. Para generar un ambiente inflamatorio se inyectó LPS (0,01 μ g/gr) intraperitonealmente en ratonas preñadas al día 17 de gestación. La ratona control fue inyectada con PBS la misma etapa de gestación. Se utilizaron cultivos astrogliales para estudiar cómo la inflamación maternal durante la preñez afecta la actividad de HCs en astrocitos de la descendencia. La actividad de HCs fue evaluada a través de experimentos de captación de colorante, mientras que el perfil pro-inflamatorio de astrocitos fue evaluado midiendo los niveles de Ca^{2+} intracelular, expresión de iNOS, liberación de citoquinas y óxido nítrico. Para determinar las proteínas que estuvieron involucradas en este fenómeno, se usaron bloqueadores específicos de HCs y siRNAs.

En este estudio se demostró que la inflamación prenatal altera distintas funciones celulares de los astrocitos, incluyendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β y TNF- α), liberación de ON, patrones de Ca^{2+} intracelular evocadas por ATP, oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} intracelular, y la actividad de hemicanales. Las alteraciones en estas funciones astrogliales inducidas por la inflamación prenatal podrían participar en una posible desregulación en la comunicación entre astrocitos y neuronas en el parénquima cerebral de la descendencia. Futuras investigaciones podrán dilucidar cómo estas desregulaciones podrían estar involucradas en el daño neuronal y cognitivo observado en hijos de madres que padecieron infecciones importantes durante su embarazo.

Financiado por el proyecto FONDECYT 11121133

SUMMARY

Several epidemiological studies indicate that children from mothers exposed to infections during pregnancy, have an increased risk to develop dysfunctions in the central nervous system (CNS). Similarly, systemic administration of LPS in rodents has been used to demonstrate that maternal inflammation during pregnancy induces apoptosis, structural damage and behavior impairment in the offspring. Although mechanisms explaining these phenomena are still unclear, it has been proposed that maternal inflammation may lead to persistent fetal brain inflammation, contributing to disturb several steps of CNS development and maturation. In the CNS, microglia and astrocytes are the instrumental cells of inflammatory response and serve as the main source of cytokines for the brain parenchyma. Therefore, it is conceivable that impairment of intercellular communication and coordination among glial cells and with neurons can play an important role in the maternal inflammation-induced brain abnormalities observed in the offspring.

Brain microglia and astrocytes are the cells responsible for the inflammatory response and serve as the main source of cytokine production in the brain parenchyma. Therefore, it is conceivable that alterations in the physiological functions of these cells could play an important role in brain damage observed in the offspring of mothers exposed to prenatal inflammation. Recent evidences indicate that during pro-inflammatory conditions, release of glutamate and ATP through glial cell hemichannels can induces neuronal death. Hemichannels are plasma membrane channels permeable to ions and small molecules that permit diffusional exchange between the intra and extracellular compartments, allowing cellular release of relevant quantities of autocrine/paracrine signaling molecules. Each hemichannel is composed of six protein subunits of connexins or pannexins, two highly conserved protein families encoded by 21 or 3 genes, respectively in humans. Under this view, high amounts of glutamate and/or ATP released by astroglial hemichannels could be good candidates to explain apoptosis, structural damage and behavior impairment observed in the offspring of mothers exposed to inflammatory conditions. Accordingly, the hypothesis of the current proposal is "**Maternal inflammation increases astroglial hemichannel activity in the offspring**". The general goals of this proposal were: i) To investigate whether astrocytes obtained from offsprings

of mothers exposed to LPS exhibit an increased release of cytokines, nitric oxide, and basal intracellular Ca^{2+} ; ii) To investigate whether astrocytes obtained from offsprings of mothers exposed to LPS exhibit an increased hemichannel activity and which connexin/pannexin are involved; iii) To investigate whether astrocytes obtained from offsprings of mothers exposed to LPS exhibit changes in the distribution of Cx43 and iv) To investigate whether the changes observed in astroglial hemichannel activity induced by prenatal inflammation are dependent on cytokine, iNOS and p38 MAP kinase activity.

To generate a maternal inflammatory condition we performed a single intraperitoneal injection of LPS (0.01 $\mu\text{g/g}$) in pregnant mice at gestation day 17. Control pregnant mice will be injected with PBS at the same gestation stage. We used astroglial cultures to study how maternal inflammation during pregnancy affects hemichannel activity in astrocytes of the offspring. Hemichannel activity was evaluated through dye uptake experiments, whereas the pro-inflammatory profile of astrocytes was examined by measuring the intracellular Ca^{2+} levels, iNOS expression and release of cytokines and nitric oxide. To determine which hemichannel forming proteins could be involved in the above mentioned phenomena, we used astroglial cultures and specific hemichannel blockers and siRNAs for hemichannel forming proteins.

This study demonstrated that prenatal inflammation alters various cellular functions of astrocytes, including the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α), NO release, patterns of intracellular Ca^{2+} evoked by ATP, spontaneous oscillations intracellular Ca^{2+} , and activity of hemichannels. Alterations in these induced astroglial prenatal functions could be involved in inflammation dysregulation possible communication between astrocytes and neurons in the cerebral parenchyma of the offspring. Future research may elucidate how these deregulation could be involved in the neuronal and cognitive impairment observed in children of mothers who suffered serious infections during pregnancy.

Suported by FONDECYT project 11121133

1. INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos indican que hijos de madres expuestas a infecciones durante el embarazo (e.j., sinusitis, neumonía y pielonefritis), tienen un mayor riesgo de desarrollar disfunciones en el sistema nervioso central (SNC) incluyendo esquizofrenia, autismo y parálisis cerebral (**Boksa, 2010**). Hasta ahora, todos estos datos epidemiológicos han sido respaldados por estudios en animales, en su mayoría basados en la administración de agentes pro-inflamatorios durante la etapa gestacional (**Boksa, 2010**). La administración sistémica de lipopolisacáridos (LPS), un constituyente de la pared celular de bacterias Gram negativas, se ha convertido en un método ampliamente usado para evaluar los efectos de la inflamación prenatal sobre la descendencia. Esto debido a que su administración establece un modelo que imita varios aspectos de la infección bacteriana, incluyendo la producción de citoquinas, inflamación, fiebre, y la activación tanto de la cascada del complemento como del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (**Aderem y Ulevitch, 2000**). Usando este enfoque experimental, varios estudios han demostrado que la inflamación prenatal afecta el comportamiento y las interacciones sociales de la descendencia en la etapa adulta (**Golan et al., 2005, Meyer et al., 2006, Meyer et al., 2008, Stolp et al., 2011**). Entre los aspectos conductuales, se han descrito problemas de aprendizaje y memoria (**Golan et al., 2005, Meyer et al., 2005**), aumento en conductas de ansiedad (**Golan et al., 2006**), déficit motores (**Girard et al., 2009**) y comportamiento exploratorio perturbado (**Meyer et al., 2005; Meyer et al., 2006**). Aunque los mecanismos que explican estas anomalías cerebrales en la descendencia aún no están claros, se ha propuesto que la inflamación prenatal podría producir una inflamación cerebral persistente en el feto. Esto último, podría favorecer la alteración de varios pasos en el desarrollo y maduración del SNC (**Gilmore y Jarskog, 1997, Saliba y Henrot, 2001**).

Distintos grupos de investigación proponen que las citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-1 β y TNF- α , podrían estar involucradas en los trastornos del SNC inducidos por inflamación prenatal en la descendencia (**Golan et al., 2006, Meyer et al., 2008, Graciarena et al., 2010**). En efecto, estudios en ratas sugieren que los cambios en el comportamiento inducidos por LPS prenatal, no son mediados por acción directa del LPS sobre el cerebro fetal. Por el contrario, se cree que estos cambios podrían deberse a una

respuesta inflamatoria secundaria (e.j. inducción de citoquinas) que se transfiere desde el plasma materno y/o la placenta a la circulación fetal. Esto último, alteraría la expresión de glucocorticoides y hormonas tiroideas, contribuyendo a la perturbación del desarrollo cerebral durante la etapa gestacional (**Ashdown et al., 2006**). Por consiguiente, se piensa que las anomalías observadas en el cerebro de la descendencia inducidas por la inflamación prenatal se deben a la respuesta inflamatoria por sí misma, independientemente del agente pro-inflamatorio (e.j., LPS) (**Patterson, 2002, Shi et al., 2003**). En apoyo a esta idea, la liberación de citoquinas producida durante la gestación, en ausencia de la administración de LPS, es suficiente para provocar múltiples trastornos neurológicos y anormalidades en el cerebro de la descendencia (**Shi et al., 2003, Zuckerman et al., 2003, Meyer et al., 2005, Meyer et al., 2006**).

Importantemente, estudios en modelos murinos han demostrado que el periodo de gestación en la que se realiza la estimulación inmune maternal determina los patrones de comportamiento y anomalías presentes en la etapa adulta de la descendencia (**Meyer et al., 2006**). Por ejemplo, la administración de LPS a ratas preñadas en la última etapa de gestación, aumenta la expresión de IL-1 β y TNF- α en el cerebro fetal (**Cai et al., 2000**). Resultados similares se han observado por otros grupos de investigación asociados con apoptosis, daño morfológico y estructural, déficit de proliferación neuronal, daño en la memoria y alteración del aprendizaje (**Fatemi et al., 2002, Golan et al., 2005, Golan et al., 2006, Meyer et al., 2006, Rousset et al., 2006**).

En el SNC, las células gliales (CGs) son las células instrumentales de la respuesta inflamatoria y la principal fuente de IL-1 β y TNF- α en el parénquima cerebral. Se ha descrito que están involucradas en anomalías cerebrales inducidas por inflamación maternal en procesos como apoptosis, daño morfológico y deterioro en el comportamiento, pero su participación aún no se encuentra completamente entendida ni explorada (**Jonakait, 2007, Roumier et al., 2008**).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Células gliales y funciones fisiológicas de los astrocitos

Para lograr una respuesta coordinada a los estímulos externos, muchos *phyla* han desarrollado estructuras neuronales más complejas para la detección, integración y procesamiento de la información. Debido a esto, el SNC evolucionó desde una red simple hacia ganglios y cerebros centralizados, con lo cual emergió un nuevo tipo celular no neuronal: las CGs. Estas representan el ~90% de las células del cerebro, mientras que las neuronas solo constituyen el ~10%. Debido a las presiones evolutivas, las CGs han persistido en un gran número y diversidad en mamíferos superiores y se clasifican en dos grupos: macroglías (e.j., astrocitos, oligodendrocitos, células NG2 y células endimogliales) y microglías (**Verkhratsky et al., 2006**). Por mucho tiempo, las CGs fueron consideradas elementos conectivos tisulares, cuyo papel era dar soporte a las supuestas células funcionales del cerebro: las neuronas. No obstante, ahora se sabe que las CGs desempeñan un papel protagónico en la plasticidad y formación sináptica, migración y proliferación neuronal, metabolismo energético y oxidativo, homeostasis sináptica de neurotransmisores y iones, formación de la barrera hematoencefálica (BHE), acoplamiento neurovascular y repuestas inmunes innatas y pro-inflamatorias (**Barres, 2008**).

En un comienzo se creía que los astrocitos sólo cumplían el papel de actuar como células de soporte para las neuronas, no obstante, evidencia reciente indica que además del flujo de información entre neuronas pre- y post-sinápticas, también existe comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas. En efecto, los astrocitos son parte esencial de la sinapsis entre la neurona pre- y post-sináptica, ya que integran y procesan la información sináptica, regulando finalmente la transmisión y plasticidad neuronal a través de la liberación de gliotransmisores (**Perea et al., 2009**). De esta manera, los astrocitos pasaron a ser reconocidos como protagonistas esenciales del procesamiento cerebral, aprendizaje y memoria, debido al concepto emergente de sinapsis tripartita. La mayoría de los astrocitos para cumplir con su función de regulación de sinapsis, expresan un gran repertorio de receptores de neurotransmisores, lo que les permite detectar y responder a nivel local a la actividad neuronal a través de la liberación dependiente de Ca^{2+} de gliotransmisores, como

glutamato, D-serina y ATP (**Haydon y Carmignoto, 2006**). En los últimos años, una serie de estudios han revelado que en forma similar a como lo hacen los astrocitos, las microglías también interactúan dinámicamente con la sinapsis neuronal. En efecto, las microglías parecieran que actúan como “sensores sinápticos”, respondiendo a cambios en la actividad neural y liberación de neurotransmisores. Esto último, ha redefinido el concepto de "sinapsis tripartita" a la noción de “sinapsis tetrapartita” (**Schafer et al., 2013**).

Los astrocitos son fundamentales para la fisiología normal del cerebro. Son elementos celulares que regulan la defensa y homeostasis cerebral, además se encuentran profundamente involucrados en las respuestas celulares a diversas neuropatologías, determinando el comienzo y progresión de éstas. En la corteza, los astrocitos ocupan dominios estrictamente delimitados, por un lado forman entre ellos un sinticio celular por medio de múltiples estructuras de contacto, mientras que sus pies terminales se encuentran envolviendo los vasos sanguíneos del SNC (**Sofroniew et al., 2010**). Los dominios sincitiales de las redes astrogiales captan el K^+ extracelular local acumulado durante episodios de alta actividad neuronal, disipando el exceso de K^+ extracelular por difusión simple hacia áreas con bajas concentraciones de K^+ . Otros procesos donde los astrocitos están implicados son: la captación de glucosa y liberación de lactato, la captación de precursores de glutatión y liberación de glutatión, defensa contra el estrés oxidativo, homeostasis de iones y agua, reparación de tejidos y la disminución de excitotoxicidad mediante la captación de glutamato y liberación de glutamina (**Stevens, 2008; Sofroniew et al., 2010**). Cabe destacar, que durante la actividad neural, el aumento en la concentración de glutamato en la hendidura sináptica, es rápidamente reducido por los astrocitos circundantes. Estos primero convierten el glutamato a glutamina (utilizando la enzima glutamina sintetasa) y luego liberan glutamina al espacio intersticial para ser captada por las neuronas (**Anderson et al., 2000**). La captación de glutamato sináptico por los astrocitos es el mejor mecanismo para prevenir la acumulación de glutamato en el espacio sináptico y así proteger a las neuronas de la activación excesiva de receptores de glutamato y la subsecuente generación de muerte celular por excitotoxicidad. Al mismo

tiempo, la vía glutamato-glutamina es la única que permite a las neuronas restablecer su almacenamiento de glutamato y GABA (Bernarroch, 2005).

2.2. Activación astrogliar y daño cerebral

Es importante destacar que en varios trastornos del SNC, tales como accidente cerebrovascular, traumatismo, tumorigénesis, o diversas enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos sufren un cambio de larga duración llamado “astroglisis reactiva”. Este proceso es una reacción con características fenotípicas, moleculares, celulares y morfológicas específicas, que permite a los astrocitos sentir con mayor sutileza su entorno y responder dinámicamente a los cambios producidos en su microambiente (Pekny et al., 2005). Existe un gran número de moléculas de señalización celular capaces de inducir y regular aspectos específicos de la “astroglisis reactiva”; incluyendo factores de crecimiento, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el interferon- γ (IFN- γ), el factor de crecimiento transformante (TGF- β), distintos mediadores de la inmunidad innata (ej. LPS, poly IC), neurotransmisores (ej. ATP, glutamato, noradrenalina), especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (ON) y proteínas o péptidos asociados a eventos neurodegenerativos (ej. péptido β -amiloide) (Sofroniew et al., 2009; Kuboyama et al., 2011; Sofroniew et al., 2010). La “astroglisis reactiva” se caracteriza por la hipertrofia de los procesos astrogliales y ampliación de las redes de filamentos intermedios a través de la sobreexpresión de la proteína ácida fibrilar (GFAP), vimentina y también la reexpresión de nestina (Pekny y Nilsson, 2005).

Por otro lado, investigaciones *in vivo* e *in vitro* han mostrado el papel fundamental que desempeñan el ATP y sus metabolitos en la astroglisis reactiva causada por daño cerebral. Estas moléculas, regulan la remodelación morfológica, proliferación, sobreexpresión en la síntesis de GFAP, quimiotaxis y quimioquinas en astrocitos activados. Se sabe que la “astroglisis reactiva” es fundamental para la regeneración del tejido cerebral dañado. Tras un evento de daño cerebral, las neuronas y CGs sufren muerte celular en el sitio de daño, con un reclutamiento simultáneo de microglías y monocitos periféricos. Además los astrocitos migran desde el parénquima intacto adyacente a las células dañadas y comienzan la reparación (Ridet et al., 1997). Después del daño cerebral, las concentraciones de ATP extracelular incrementan marcadamente, no solo por las células

que murieron, sino que también debido a la liberación activa por parte de las células sobrevivientes (**Franke et al., 2006; Robson et al., 2006**).

Interesantemente, se ha sugerido que en ciertas condiciones patológicas, los astrocitos podrían cambiar su fenotipo reactivo a un estado de sobreactivación llamado “astrogliosis reactiva”, el cual está caracterizado por una desregulación de sus funciones fisiológicas, alterando diversos procesos celulares que finalmente podrían desencadenar la muerte neuronal y generar daño cerebral. Entre estas desregulaciones se pueden mencionar la producción de diversas moléculas pro-inflamatorias conocidas por inducir daño neuronal, tales como citoquinas, prostaglandinas, ON, y ROS. Interesantemente, la liberación de ATP durante el daño neuronal puede aumentar los efectos inflamatorios de las citoquinas (IL-1 β , TNF- α e INF- γ), prostaglandina E2 (PGE₂) y ON en cultivos de astrocitos (**Xu et al., 2003**).

Normalmente, tanto las microglías como los astrocitos se encuentran funcionalmente acoplados con neuronas de una manera neurotrófica y metabólica (sinapsis tetrapartita). La liberación de factores neurotróficos, citoquinas anti-inflamatorias y otras moléculas paracrinas por parte de las CGs, así como la señalización de Ca²⁺ intercelular producida entre ellas, proporcionan las bases mecánicas para detectar la actividad sináptica “momento a momento” (**Orellana et al., 2011a**). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, durante el daño cerebral, se deteriora la interacción neurona-glía y se producen altas concentraciones de moléculas que pueden inducir disfunción y muerte neuronal, incluyendo ON, ROS, glutamato, ATP y prostaglandinas (**Saha y Pahan, 2006, Ha et al., 2008, Gandelman et al., 2010, Orellana et al., 2011b**). Un papel clave en este proceso se proporciona a través de la liberación de gliotransmisores regulados por cambios en la concentración de Ca²⁺ libre intracelular ([Ca²⁺]_i), entre estos se incluyen el ATP, D-serina y glutamato (**Farber y Kettenmann, 2006**). Es importante destacar, que la liberación de ON y citoquinas pro-inflamatorias incluyendo IL-1 β y TNF- α , cambia las dinámicas de [Ca²⁺]_i entre los astrocitos (**Hsiao et al., 2007, Ida et al., 2008, Wuchert et al., 2009**), lo cual podría afectar la liberación de gliotransmisores. En consecuencia, varios autores han propuesto que las dinámicas de [Ca²⁺]_i de los astrocitos se ven afectadas durante el daño del SNC, afectando la interacción y comunicación neurona-glía (**Farber y Kettenmann, 2006**,

Nedergaard et al., 2010). Considerando que los astrocitos se activan persistentemente en la descendencia después de inflamación maternal, es concebible que el deterioro en la señalización intercelular y coordinación entre ellos y las neuronas jueguen un papel en las anomalías cerebrales inducidas por inflamación maternal. En vertebrados, una parte importante de la comunicación intercelular entre células del SNC, se lleva a cabo a través de las uniones en hendidura (UHs).

2.3. Hemicanales y su papel en la inflamación cerebral

Las UHs son agregados de canales intercelulares que permiten la continuidad citoplasmática directa pero selectiva entre las células en contacto (**Sáez et al., 2003**). A través de los canales de UHs (CUHs), es posible el intercambio intercelular de metabolitos (e.j., ADP, glucosa, glutamato y glutatión), iones (e.j. K^+ , Na^+ y Ca^{2+}), segundos mensajeros (e.j., cAMP e IP3) y la propagación intercelular de potenciales electrónicos en tejidos excitables y no excitables (**Sáez et al., 2003, Sohl y Willecke, 2004, Evans et al., 2006**). Cada CUH está formado por el acoplamiento de dos hemicanales (HCs) cada uno aportado por cada célula adyacente. A su vez, cada HC está compuesto por seis subunidades de una familia de proteínas llamadas conexinas (Cxs) (**Fig.1**). Las Cxs son una familia de proteínas altamente conservadas que codifican para 21 genes en humanos y 20 en ratón con genes ortólogos en otras especies de vertebrados (**Cruciani y Milkasen, 2005**) y son expresadas abundantemente en células del SNC (**Orellana et al., 2009**).

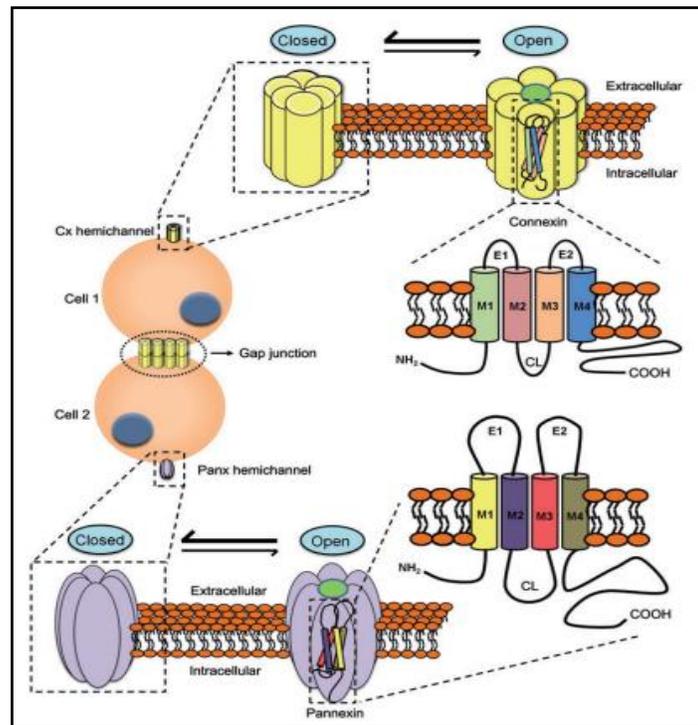


Figura 1. Esquema de la caracterización de los canales formados por conexinas y panexinas.

La parte superior e inferior corresponden a HCs de Cxs y Panxs en la membrana plasmática, respectivamente. Ambos tipos de proteínas tienen cuatro dominios transmembrana (M1-4) con el amino (NH₂) y carboxilo (COOH) terminal en el lado citoplasmático, dos *loops* extracelulares (E1 y E2), y un *loop* citoplasmático (CL). Cada HC está formado por seis subunidades de Cxs o Panxs. En el centro del esquema se muestra la agrupación de canales intercelulares de Cxs formando una unión en hendidura (UH) entre la célula 1 y la célula 2. Cada canal de UH está formado por dos HCs de Cx. Adaptado de (Orellana et. al., 2009).

Las Cxs se identifican por su masa molecular expresada en kDa, de modo que Cx43 corresponde a la Cx que posee una masa molecular de ~43 kDa. Las Cxs recién sintetizadas son ensambladas, dependiendo del tipo de Cx, en el retículo endoplasmático o en el aparato de golgi para formar los HCs o conexones. Los HCs formados por un solo tipo de Cx son llamados homoméricos, mientras que los HCs formados por diferentes Cxs son llamados heteroméricos. No todas las combinaciones de Cxs pueden formar HCs heteroméricos y no todos los HCs pueden unirse para formar CUHs funcionales. Después de la oligomerización, los HCs son transportados a la superficie celular, donde se acoplan con los HCs de las células vecinas para formar CUHs.

Durante mucho tiempo la principal función atribuida a los HCs fue la formación de CUHs. Sin embargo, en la última década, la presencia de HCs funcionales fuera de la membrana de contacto, ha sido demostrado por varias investigaciones experimentales (**Sáez et al., 2010**). Estos estudios, indican que los HCs sirven como poros acuosos permeables a iones y pequeñas moléculas que median el intercambio difusional entre los compartimientos intra y extracelular, permitiendo la liberación de distintas moléculas señalizadoras autocrinas/paracrinas (e.j. ATP, glutamato, NAD^+ y PGE_2) al medio extracelular (**Stout et al., 2002, Bruzzone et al., 2003, Ye et al., 2003, Cherian et al., 2005**), así como la entrada de pequeñas moléculas y iones (e.j., glucosa y Ca^{2+}) (**Retamal et al., 2007**). Recientemente, se ha identificado otra familia de genes que codifica para tres proteínas de membrana, llamadas panexinas (Panxs 1-3) (**Bruzzone et al., 2003**). Hasta ahora, la ausencia de evidencias ultraestructurales para la formación de CUHs en células de mamíferos, sugieren que la principal función de canales formados por Panxs es actuar como HCs (panexones) (**Fig.1**) (**Locovei et al., 2006**). Aunque las Cxs y Panxs no comparten una secuencia aminoacídica, si poseen una topología de membrana similar, con cuatro dominios α -hélice de transmembrana conectados por dos *loops* extracelulares, donde ambos N-terminal y C-terminal son intracelulares.

En la actualidad, muchos estudios sugieren que en un cerebro normal, los HCs liberan moléculas fisiológicas relevantes para la señalización intercelular y la propagación de ondas de Ca^{2+} intercelulares, incluyendo ATP y PGE_2 (**Fig.2**) (**Orellana et al., 2011a**). Sin embargo, se cree que en condiciones patológicas, la desregulación de estos canales podría ser crucial en el comienzo y preogresión del desequilibrio homeostático en diversas enfermedades cerebrales (**Fig.2**) (**Orellana et al., 2009**).

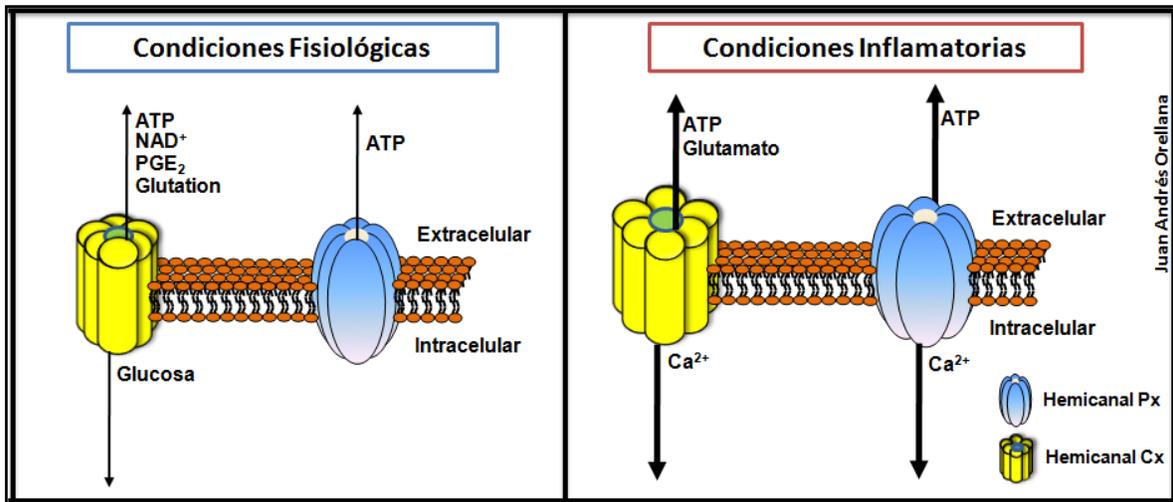


Figura 2. Esquema de las moléculas que permean los hemicanales en condiciones fisiológicas e inflamatorias. Moléculas liberadas y captadas a través hemicanales formados por Cxs y Panxs en condiciones fisiológicas e inflamatorias (modificado de Orellana, 2010).

En efecto, estudios pioneros muestran que la muerte astrogliar inducida por condiciones de isquémicas es acelerada por la apertura de los HCs de Cx43 (Contreras et al., 2002). Tal aumento en la actividad de HCs de Cxs ha sido también observado en neuronas. (Thompson et al., 2006, Orellana et al., 2011b), oligodendrocitos (Domercq et al., 2010), y también en neuronas y glia sometidas a otras condiciones pro-inflamatorias (Orellana et al., 2009). Se ha postulado que la apertura prolongada de HCs contribuye al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, que a su vez puede favorecer aún más la actividad de HCs (De Vuyst et al., 2007, Schalper et al., 2008), induciendo sobrecarga de Ca^{2+} y Na^+ intracelular. Bajo esas condiciones iónicas se genera un desequilibrio osmótico que produce lisis celular y ruptura de la membrana plasmática. Por otro lado, la sobrecarga de Ca^{2+} inducida en parte por la apertura de HCs puede también activar la fosfolipasa A2, con la posterior generación de ácido araquidónico y activación de la vía ciclooxigenasa/lipooxigenasa. Esto último, lleva a un incremento en la producción de radicales libres y peroxidación lipídica generando aún más daño en la membrana plasmática. Bajo esta visión, se cree que la apertura exacerbada de HCs, podría llevar a daño celular por distintos mecanismos: 1) aumento de $[Ca^{2+}]_i$ por la entrada de Ca^{2+} a través de HCs, 2) lisis celular por el incremento en la entrada de Na^{2+} y Cl^- a través de HCs, 3) depleción de productos metabólicos esenciales para la viabilidad celular tales como ATP, glucosa, NAD^+ o glutatión, a través de su liberación vía HCs. En paralelo, las células bajo condiciones pro-inflamatorias podrían liberar moléculas vía HCs

(e.j., glutamato y ATP), las cuales en exceso podrían afectar la viabilidad de las células vecinas sanas propagando el daño celular.

2.4. Hemicanales en astrocitos

Los astrocitos constituyen la población celular con el más alto nivel de expresión de Cxs en el SNC, siendo Cx43 y Cx30 las Cxs astrogiales más abundantes en el cerebro adulto (**Giaume y Theis, 2009**). Debido a que los astrocitos proporcionan un soporte metabólico y estructural a las neuronas y controlan la concentración extracelular de glutamato, K^+ y H^+ ; ha sido propuesto que el daño celular astrogial asociado a la apertura de los HCs, podría afectar la susceptibilidad neuronal a radicales libres, bajo condiciones adversas tal como isquemia y/o inflamación crónica o aguda (**Contreras et al., 2004, Orellana et al., 2009**). La presencia de HCs en astrocitos fue sugerida por primera vez por Hofer y Dermietzel (**Hofer y Dermietzel, 1998**). Utilizando un anticuerpo neutralizador del dominio extracelular de Cx43, ellos demostraron que la captación de amarillo de Lucifer inducida por baja concentración de Ca^{2+} extracelular ($[Ca^{2+}]_e$) dependía de Cx43. Sin embargo, los investigadores que proporcionaron la demostración definitiva fueron Contreras y colaboradores (**Contreras et al., 2002**). Ellos demostraron que la muerte celular astrogial inducida por condiciones de isquemia es acelerada por un aumento en la apertura de HCs de Cx43, dado que astrocitos deficientes de Cx43 o tratados con un siRNA contra Cx43 sometidos a isquemia presentaban una disminución en la muerte celular.

Por otra parte, en cultivos de astrocitos se demostró que la hipoxia-reoxigenación o tratamientos con el péptido $A\beta$ inducen un aumento en la actividad de hemicanales mediados por Cx43, pero no Panx1 (**Orellana et al., 2010, Orellana et al., 2011b, Orellana et al., 2011c**). Aunque los astrocitos expresan HCs de Panx1 funcionales (**Iglesias, 2008**), el rol de ellos durante condiciones inflamatorias no ha sido explorado completamente (**Zappala et al., 2007, Karpuk et al., 2011**). A pesar de esto, dos estudios recientes, uno usando astrocitos de medula espinal tratados con factor de crecimiento de fibroblasto (FGF-1) (**Garre et al., 2010**) y el otro utilizando cortes de cerebro de ratones con un absceso cerebral (**Karpuk et al., 2011**), demostraron que ambas, Cx43 y Panx1 podrían formar HCs funcionales *in vivo*. En consecuencia, la respectiva contribución de

HCs de Panxs y Cxs en distintas condiciones fisiológicas como patológicas podrían depender de condiciones específicas aún no identificadas que provocan su activación.

2.5. Moléculas neurotóxicas liberadas por los hemicanales de células gliales durante la inflamación

Se ha demostrado que varios gliotransmisores incluyendo D-serina (Yang et al., 2003, Wu et al., 2004, Henneberger et al., 2010), glutamato (Noda et al., 1999, Malarkey y Parpura, 2008) y ATP (Ferrari et al., 1997, Gourine et al., 2010) son liberados por CGs; y muchos de ellos han sido reconocidos por ser liberados vía HCs (Takeuchi et al., 2006, Orellana et al., 2011c). Aunque los gliotransmisores que son liberados vía HCs modulan la eficacia presináptica y la respuesta postsináptica (Orellana et al., 2011a), estudios recientes indican que en condiciones pro-inflamatorias un aumento exacerbado de la liberación de estos, podría contribuir al daño neuronal por excitotoxicidad. Las moléculas tóxicas liberadas a través de HCs de CGs por un lado, podrían ser buenos candidatos para explicar los daños producidos a las células, como la apoptosis y daño morfológico. Como consecuencia de esto la descendencia podría presentar daño en el comportamiento en madres expuestas a condiciones pro-inflamatorias durante la preñez.

En efecto, la inhibición de la liberación de glutamato en CGs usando bloqueadores de HCs disminuye el daño neuronal inducido por estas células en condiciones pro-inflamatorias (Mezawa and Jin, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que el fragmento neurotóxico del péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ ($A\beta_{25-35}$) incrementa la actividad de HCs en microglías y astrocitos detectada a través de ensayos electrofisiológicos y la captación del trazador molecular etidio (Orellana et al., 2011c). Interesantemente, la apertura de los HCs en estas condiciones permitió la liberación de altas concentraciones de ATP y glutamato desde las CGs. Esto último resultó en daño neuronal vía receptores de NMDA y P2X7 y la subsecuente activación de HCs de Panx1 en neuronas. En efecto, la muerte neuronal inducida por las CGs fue prevenida cuando se usaron inhibidores de los receptores P2X7 y NMDA o cuando se emplearon inhibidores de HCs de Panx1 en las neuronas (Orellana et al., 2011c).

Se cree que el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ causado por la activación de receptores NMDA y P2X7 genera una activación de los HCs de Panx1 neuronales (Locovei et al., 2006) y un

consecuente aumento en la liberación de ATP. El ATP liberado activaría receptores P2X7, aumentando la extensión de la muerte neuronal por medio de la generación de un *feedback* positivo de activación celular.

2.6. Señalización purinérgica y hemicanales

Las purinas y los nucleótidos extracelulares son sustancias químicas que cumplen un papel crucial en la regulación de diferentes funciones fisiológicas involucradas en la comunicación neurona-glia. El ATP y sus metabolitos actúan a través de una gran familia de receptores de membrana plasmática clasificados en dos grupos: los receptores P1 y los receptores P2. Los receptores P1 responden a adenosina e incluyen cuatro subtipos diferentes de receptores acoplados a proteína G que son altamente expresados por CGs y neuronas: A1, A2A, A2B, y A3. Por otro lado, ATP y ADP son los principales ligandos para los receptores P2, los cuales se subdividen en dos subfamilias, los receptores ionotrópicos P2X y los receptores metabotrópicos P2Y. Los receptores P2X (P2X1-7) son canales cuya apertura esta mediada por la unión de ATP, permitiendo la difusión de iones como el Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Por el contrario, los receptores P2Y son 7 receptores metabotrópicos acoplados a proteína G que se activan por distintos nucleótidos extracelulares: P2Y1, P2Y12, y P2Y13 son preferentemente activados por ADP; P2Y2 y P2Y4 por ATP/UTP; P2Y6 por UDP; P2Y11 por ATP; y P2Y14 por azúcares-UDP. Interesantemente, breves estimulaciones de los receptores P2X7 con bajas concentraciones de ATP generan pequeñas corrientes catiónicas (10-30 pS), mientras que altas concentraciones y/o la estimulación permanente con ATP conduce a la aparición de grandes corrientes (~440 pS) y la rápida captación de moléculas de gran tamaño (sobre ~1 kDa).

Los astrocitos son una de las principales fuentes de liberación de ATP en el SNC. Ellos liberan ATP para comunicarse entre ellos y con otros tipos de CGs mediante la estimulación de purinoreceptores. El ATP astroglial y su metabolito adenosina activa los purinoreceptores de las neuronas, microglía, oligodendrocitos y células endoteliales. El ATP astroglial puede ser liberado a través de diferentes vías (1) exocitosis dependiente de Ca^{2+} y 2) mediante HCs formados por Cxs y Panxs (**Franke et al., 2012**).

Los astrocitos se comunican entre ellos vía “ondas de Ca^{2+} intercelulares. (**Cornell-Bell et al., 1990**). Esas células responden a un alto rango de estímulos fisiológicos y patológicos con cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, principalmente a través de la activación de receptores P2Y. Lo anterior, genera un aumento en la producción de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) y la subsecuente liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático. La propagación de las ondas de Ca^{2+} se produce por 1) la difusión de IP_3 entre astrocitos a través de los CUs y 2) por la liberación de ATP vía exocitosis o a través de HCs, generando cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células vecinas vía activación de receptores P2Y y P2X (**Cotrina et al., 2000; Scemes et al., 2006**).

Así, la liberación de ATP desde los astrocitos puede activar los receptores purinérgicos (P2X y P2Y) de las células vecinas, conduciendo a un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y a la propagación de ondas de Ca^{2+} en células distantes (**Cotrina et al., 2000**).

2.7. Posible papel de los hemicanales de células gliales en la disfunción cerebral inducida por inflamación prenatal

Como se ha mencionado anteriormente, estudios con modelos murinos indican que la inflamación materna expone el feto a citoquinas y mediadores inflamatorios, llevando a la descendencia a mostrar un fenotipo pro-inflamatorio (**Mandal et al., 2013**). Esto último, podría generar cambios agudos y tardíos en el comportamiento, estructura y función de la descendencia. Interesantemente, se sabe que la administración de LPS en ratas preñadas provoca un aumento en el número de astrocitos GFAP-positivos en los cerebros de neonatos (**Cai et al., 2000**) y en la activación microglial y astrogliosis (**Rousset et al., 2006, Rousset et al., 2008, Graciarena et al., 2010**).

El LPS es un potente activador de citoquinas pro-inflamatorias (efectores clave de la respuesta inmune en el SNC). La señalización de LPS en el cerebro ocurre a través de *toll-like-receptor-4* (TLR-4), donde la unión de LPS a este receptor genera una cascada de señalización que activa el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) provocando la inducción secuencial de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6 y la producción de ON vía activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Niveles anormales de citoquinas

durante la gestación, como resultado de la infección, pueden afectar el desarrollo del cerebro fetal en el útero (**Boksa, 2010**).

Como se mencionó anteriormente, la sobreactivación de CGs ha sido observada en crías de madres expuestas a LPS. La evidencia de otros trastornos neurológicos indican que las CGs en el SNC inflamado, muestran un aumento en la liberación de citoquinas, las cuales son conocidas por modular las dinámicas de Ca^{2+} intracelular, liberación de ON, señalización intercelular y coordinación entre CGs (**Hsiao et al., 2007, Ida et al., 2008, Orellana et al., 2009, Wuchert et al., 2009**). Sin embargo, se desconoce si eventos similares ocurren en las CGs de la descendencia de madres expuestas a LPS durante la preñez. Relevante a este punto es que los astrocitos tratados con $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ muestran un aumento en la actividad de HCs de Cx43 a través de la vía dependiente de ON y p38MAP kinasa (**Retamal et al., 2007**). Por lo tanto, sería de interés estudiar si el estímulo inflamatorio prenatal podría inducir un incremento en la actividad de HCs de astrocitos de la descendencia y si esto depende de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y la activación de la iNOS y p38 MAP kinasa en la descendencia.

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

3.1 HIPÓTESIS

"La actividad de hemicanales se incrementa en astrocitos de las crías de madres expuestas a LPS prenatal".

3.2 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la regulación de hemicanales en astrocitos de crías de madres murinas expuestas a LPS prenatal.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si los niveles de citoquinas, producción de ON, activación de la vía iNOS y los niveles de Ca^{2+} intracelular se alteran en astrocitos obtenidos a partir de la descendencia de ratonas expuestas a LPS prenatal.
2. Determinar si la actividad de HCs se altera en astrocitos de las crías de ratonas expuestas a LPS prenatal e identificar las conexinas/panexinas involucradas.
3. Determinar si la expresión y distribución de la Cx43 se altera en astrocitos de las crías de ratonas expuestas a LPS prenatal.
4. Estudiar si la actividad de HCs de las CGs observada en la descendencia de madres expuestas a LPS es inhibida por la neutralización de $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$, inhibición de iNOS y/o p38 MAP kinasa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Neurociencias del Centro de Investigaciones Médicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

En la fase experimental con el propósito de evaluar cómo afecta la infección maternal a las CGs obtenidas de la descendencia de madres inyectadas con LPS, se utilizaron ratonas de la cepa C57BL/6, entre 2 a 5 meses de edad y se sometieron a un protocolo de inflamación maternal al día 17 de gestación (**Fig. 4**). Después de los tratamientos, las crías se mantuvieron con sus madres hasta el día postnatal 2, para luego hacer los cultivos purificados de astrocitos corticales, a los cuales se les midió liberación de citoquinas, óxido nítrico, actividad de HCs, niveles de $[Ca^{2+}]_i$, expresión de iNOS y Cx43.

4.1 Reactivos

Lipofectamina RNAiMAX, 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína Diacetato (DAF-FM), Fura-2-acetoximetil ester (FURA-2AM), 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), Hoechst 33342, fueron obtenidos de Invitrogen.

M-PER reactivo de extracción de proteínas mamíferas, cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasas Halt™, inhibidor de proteasas libre de EDTA Halt™, se obtuvieron de Thermo Scientific.

Citosina arabinosa (Ara-C), adenosina 5'-trifosfato disódico hidrato de sal (ATP), L-2-Aminoadipic Acid, L-N6-(1-iminoetil) lisina, Dimetil sulfóxido (DMSO), SB202190 y poli-L-lisina, se obtuvieron de Sigma. Los péptidos miméticos de HCs (Cx43L2; $_{10}$ Panx1¹⁹ Gap¹⁹) fueron comprados a GenScript USA Inc. SiRNA's para Panx1 y Cx43, fueron obtenidos de OriGene. Los Kit de ELISA para la determinación de citoquinas IL-1 β y TNF- α , fueron comprados en eBioscience. Lipopolosacáridos E.coli (LPS), se obtuvo de Fluka Analytical. Suero Fetal bovino se obtuvo de HyClone. Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's, se obtuvo de Gibco.

4.2 Anticuerpos

El anticuerpo anti-Panx1 policlonal y los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón conjugados a peroxidasa (HRP) o conjugados con Alexa Fluor 488/555/647, fueron obtenidos de Invitrogen. El Anticuerpo purificado de ratón anti-Cx43, se obtuvo de BD Bioscience. El anticuerpo anti-iNOS se obtuvo de Thermo Scientific. Los anticuerpos anti-Cx43 policlonal desarrollado en conejo, anti-GFAP monoclonal, anti-GFAP policlonal y anti- β -tubulina, fueron obtenidos de Sigma.

4.3 Equipos

Vortex mixer Vision scientific Co., LTD (KMC-1300V), fuente de poder electroforesis *Power pac basic* Bio-Rad, estufa de cultivo y campana de cultivo, centrifuga refrigerada EBA 12R, lector ELISA Synergy HT Biotek Grupo Bios, sonicador, baño termoregulado Memmert EquiLab, incubador/agitador Heidolph inkubator 1000 Merck.

4.4 Animales experimentales

Se utilizó la cepa de ratón silvestre C57BL/6. Los ratones se alojaron en cajas de plástico con temperatura (24°C), con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad (luz a las 8:00 A.M.), con libre acceso a comida y agua. La experimentación animal fue llevada a cabo de acuerdo a los documentos de orientación locales generados por el comité bioético de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile y el comité encargado de CONICYT. Al término de los protocolos experimentales o por razones de mantención de la colonia se utilizó la eutanasia por dislocación cervical.

4.4.2. Modelo de inflamación prenatal

Para el protocolo de inflamación prenatal se utilizaron ratonas de 2 a 5 meses de edad, n=1. Estas fueron asignadas al azar al grupo control (inyección de PBS) o grupo de inflamación materna (inyección i.p. con 0,01 μ g/Kg LPS de *E.Coli*). Al día 17 de gestación las ratonas fueron inyectadas i.p con PBS o LPS con un volumen final de 30 μ l). Después del parto, la descendencia se mantuvo con sus madres hasta el día 2 postnatal.

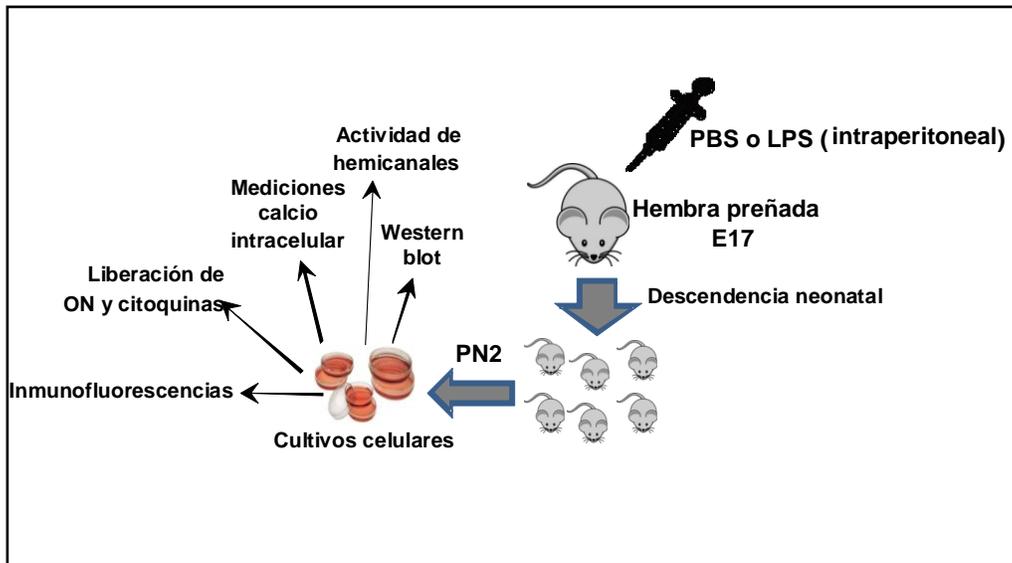


Figura 4. Esquema del diseño experimental. Al día 17 de gestación se realiza la administración de LPS (i.p.) a la hembra preñada y al día postnatal 2 se realiza el cultivo primario a partir del cerebro de los neonatos. Luego se llevaron a cabo los ensayos de actividad de HCs, medición de ON y citoquinas, medición de $[Ca^{2+}]_i$ y expresión de Cx43 por *western blot* e inmunofluorescencia.

4.5 Cultivo celular

Los cultivos de astrocitos fueron obtenidos a partir de la corteza cerebral de neonatos del día 2 postnatal (P2) como se ha descrito previamente (**Orellana et al., 2011c**). Brevemente, el cerebro fue recuperado en buffer Hank's (0,4 g/L KCL, 0,06 g/L KH_2PO_4 , 3,5 g/L $NaHCO_3$, 8 g/L NaCl, 0,048 g/L $NaHPO_4$, 1 g/L D-Glucosa) pH 7,4 a 4°C. Se retiraron cuidadosamente las meninges y se separaron las cortezas mecánicamente. Las células disociadas se sembraron en una placa de 60mm previamente tratada con poli-L-lisina, en DMEM suplementado con 10% de suero fetal de caballo (SFC), 5 U/ml de penicilina y 5mg/ml de estreptomicina. Al día siguiente se cambió el medio a DMEM 10% suero fetal bovino (SFB). Los medios de cultivo fueron cambiados dos veces por semana y los cultivos se utilizaron después de tres semanas de cultivo. Luego de 7 días, se añadió 5 μ M de Ara-C para depletar de microglías. Todos los cultivos se mantuvieron en una atmósfera con 5% CO_2 y a 37°C.

4.6 Medición de $[Ca^{2+}]_i$

El efecto de la administración de LPS maternal sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en los cultivos de astrocitos fue medido utilizando la sonda FURA-2-AM. El protocolo ha sido previamente descrito por Orellana y colaboradores, 2012 (**Orellana et al., 2012**). Brevemente, los cultivos de astrocitos se lavaron 1 vez con 1 ml de medio de registro (NaCl 8,99 gr/L, HCl 0,4 gr/L, CaCl 0,34 gr/L, MgCl₂ 0,31 gr/L, Glucosa 0,9 gr/L, HEPES 1,19 gr/L), luego se cargaron los cultivos celulares con la sonda indicadora de Ca^{2+} FURA-2-AM en DMEM sin suero durante 15 minutos con 500 μ l de medio DMEM sin suero para permitir la completa des-esterificación de los acetatos intracelulares. Por último se lavó cinco veces con 1 ml de medio de registro y se observó la $[Ca^{2+}]_i$. Esta sonda tiene la característica de que es permeable a la membrana plasmática, ratiométrica y excitable a luz UV. Una vez dentro de la célula las esterasas intracelulares clivan el grupo AM de la sonda, impidiéndole que salga de la célula. Cuando la sonda FURA-2 se une al Ca^{2+} , ésta emite a una longitud de onda de 340nm, mientras que cuando no está unida al Ca^{2+} emite a 380 nm. De esta manera, a medida que la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta, la sonda cambia su patrón de emisión que puede ser detectado por un microscopio de epifluorescencia en tiempo real. El protocolo experimental para imágenes de $[Ca^{2+}]_i$ implicó la adquisición de datos cada 3 segundos, usando el objetivo de inmersión 40X con medio de registro en un microscopio vertical Olympus BX 51W1I. Se utilizó el *software* METAFLUOR para medir los cambios de fluorescencia en tiempo real. En algunos estudios se midieron los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a un estímulo de 500 μ M de ATP con la finalidad de estudiar si la señalización purinérgica se modula en nuestro modelo.

4.7 Medición de IL-1 β , TNF- α

La liberación de IL-1 β y TNF- α del cultivo de astrocitos fue determinada por ELISA de acuerdo al protocolo del fabricante (eBioscience, EE.UU). Para el ensayo se utilizó 100 μ l de medio condicionado (MC), obtenido del cultivo de astrocitos purificados, el cual fue adicionado a cada pocillo de la placa de ELISA y fue incubado a 4°C toda la noche. El anticuerpo de detección fue incubado a temperatura ambiente por 1 h con la reacción asociada a avidina-HRP y la solución de sustrato. Las mediciones de cada placa fueron

leídas a 450nm con referencia a 570nm con un lector ELISA automático de microplacas Synergy HT- BioTek.

4.8. Determinación de Óxido Nítrico

El efecto de la administración de LPS maternal sobre la producción de ON en los cultivos de astrocitos fue medido utilizando la sonda DAF-FM diacetato. Los cultivos celulares fueron lavados cuatro veces con 1ml de medio de registro (NaCl 8,99 gr/L, HCl 0,4 gr/L, CaCl 0,34 gr/L, MgCl₂ 0,31 gr/L, Glucosa 0,9 gr/L, HEPES 1,19 gr/L). Luego se incubaron durante 25 minutos con 0,5 µl de la sonda DAF-FM diacetato a 37°C. Posteriormente, se realizaron cinco lavados con 1 ml de medio de registro para eliminar el exceso de sonda y luego se incubaron los cultivos durante 10 minutos con 500µl de medio DMEM sin suero para permitir la completa des-esterificación de los acetatos intracelulares. Por último se lavó cinco veces con 1 ml de medio de registro y se monitoreó en tiempo real los cambios en los niveles de ON. Finalmente se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 495nm, usando el objetivo 40X con medio de registro en un microscopio vertical Olympus BX 51W1I. Se utilizó el programa METAFLUOR.

4.9. Western blot: Niveles de iNOS

El efecto de la administración maternal de LPS sobre los niveles de iNOS en cultivos de astrocitos de la descendencia de ambos grupos, fue examinado por la técnica de *western blot* a partir del lisado celular como ha sido descrito previamente (**Orellana et al., 2011c**). Los cultivos de astrocitos corticales fueron lavados dos veces con PBS 1X a 4°C y posteriormente fueron incubados con inhibidores de proteasas/fosfatasa y el *buffer* de lisis M-PER. Luego de esto, los cultivos fueron cosechados y el homogeneizado recuperado se sonicó sobre hielo. Las proteínas se cuantificaron por el método de *Bradford*, el cual se basa en la propiedad del colorante azul de coomasie G-250 de unirse a proteínas. Las muestras de proteínas fueron resueltas por electroforesis SDS-PAGE gel de acrilamida al 8% (se corrió a 80 mV) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (se transfirió a 350 mA). Al término de ésta se le realizó la tinción de Ponceau S. en las membranas de nitrocelulosa para corroborar que se transfirieron proteínas.

Para evitar la unión de proteínas inespecífica la membrana de nitrocelulosa se bloqueó en TBS-T 0,1% 5% leche toda la noche a 4°C, y al otro día se realizó la incubación con el anticuerpo primario α -iNOS, disuelto en TBS-T 0,1% 5% leche, durante toda la noche a 4°C. Esto fue seguido por 3 lavados de 15 min con TBS-T 0,1%. Inmediatamente se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por 5 lavados de 5 minutos. Finalmente la inmunoreactividad fue detectada utilizando el kit de detección de quimioluminiscencia de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizó α -tubulina como control de carga.

4.10. Captación de Etd

La evaluación del estado funcional de los hemicanales en el cultivo de astrocitos corticales se llevó a cabo mediante la incorporación de colorante y en imágenes de tiempo real, como ha sido descrito anteriormente (**Orellana et al., 2011**). Las células fueron expuestas a etidio (Etd), un colorante que traspasa la membrana plasmática sólo de las células vivas y se intercala entre las bases nitrogenadas emitiendo fluorescencia.

Los experimentos, los cultivos de astrocitos control y grupo prenatal LPS primero se les realizó un lavado con medio de registro (NaCl 8,99 gr/L, HCl 0,4 gr/L, CaCl 0,34 gr/L, MgCl₂ 0,31 gr/L, Glucosa 0,9 gr/L, HEPES 1,19 gr/L) para eliminar los restos de DMEM, luego fueron expuestos a 5 μ M de Etd a 37°C durante 10 minutos. Luego se lavaron las células con medio de registro y usando un microscopio acoplado a imágenes en tiempo real se midió la velocidad de captación de Etd. La intensidad de fluorescencia fue medida seleccionando las regiones de interés. Las imágenes fueron capturadas cada 15 seg con la cámara digital monocromática QImaging Retiga13001 de enfriado rápido y mediante el programa METAFLUOR se realizaron los análisis y la cuantificación de fluorescencia. Para detectar los cambios en la pendiente, se fijó la regresión lineal en varios puntos antes y después del tratamiento usando el programa Excel, y los valores promedios de las pendientes fueron comparados usando el programa GraphPad Prism y fueron expresadas en UA/min. En algunos experimentos las células fueron pre-incubadas con bloqueadores de hemicanales, se utilizaron péptidos miméticos sintéticos GAP19, L2, Cx43^{E2} y 10panx1 (50 μ M) durante 15 min en DMEM a 37°C y luego fueron co-incubadas (100 μ M) durante 10 min en DMEM a temperatura ambiente y luego se desarrollaron los experimentos.

4.11. Silenciamiento molecular con siRNAs

Para respaldar la información obtenida en la captación de Etd de los HCs de Cx43 y Panx1, se silenciaron las proteínas de los cultivos de astrocitos de ambos grupos prenatal LPS y PBS usando siRNA's. Se utilizaron 2 siRNA's contra Cx43 y Panx1 de ratón, los cuales se transfectaron con lipofectamina de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

4.12. Inmunofluorescencia

Los cultivos de astrocitos en cubreobjetos se lavaron con PBS 1X y fueron fijados con paraformaldehído (PFA) 2% por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los cultivos se lavaron tres veces con PBS 1X, con PBS Glicina 0,1M y luego fueron bloqueados con suero de cabra (SC) al 10% en PBS-Tritón 0,1% durante 40 minutos a temperatura ambiente. Para identificar a los astrocitos se empleó un anticuerpo policlonal contra GFAP, mientras que para identificar la Cx43 se empleó un anticuerpo monoclonal. Las células fijadas se incubaron durante toda la noche con la solución de anticuerpo primario que consistió en PBS-Tritón 0,1% y SC 2%. Posteriormente se realizaron cinco lavados con PBS-Tritón 0,1% durante 8 minutos en agitación y luego los cultivos fueron incubados con los anticuerpos secundarios anti-ratón Alexa Fluor 488 o anti-conejo Alexa Fluor 555 1h en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se hicieron cinco lavados con PBS-Tritón 0,1% y se incubó con Hoeschst o DAPI, ambos marcadores de núcleo. Luego de varios lavados, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos sobre una gota de medio de montaje.

4.13. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos fueron hechos usando el programa GraphPad Prism software Inc. Para cada grupo de datos, los resultados se expresaron como el error estándar de la media, donde n se refiere al número de experimentos independientes. Para el análisis estadístico cada tratamiento se comparó con su respectivo control, y la significancia se determinó usando ANOVA de un factor o T-student. Se consideró que los grupos presentan diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Primer objetivo específico: Determinar si los niveles de citoquinas, producción de ON, activación de la vía iNOS y los niveles de calcio intracelular se alteran en astrocitos corticales obtenidos a partir de la descendencia de madres expuestas a LPS durante la preñez.

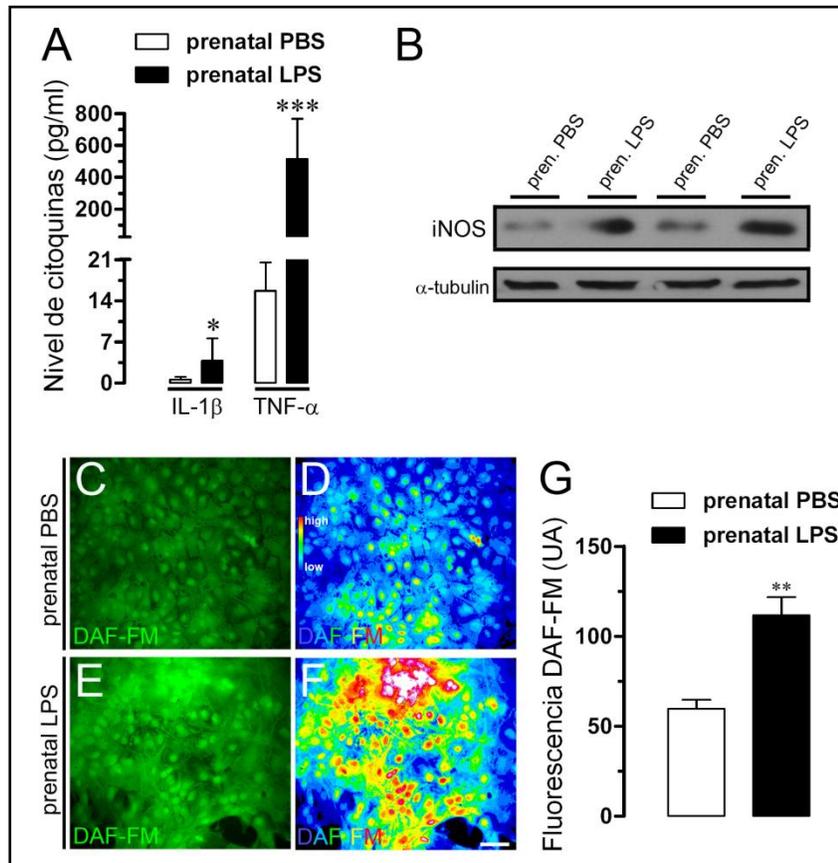


Figura 5. Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal exhiben un aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, expresión de iNOS y liberación de ON. (A) Niveles de IL-1 β / TNF- α en astrocitos controles (barras blancas) o provenientes del modelo de LPS prenatal (barras negras). *P<0,05 y ***P<0,001, con respecto al control. (B) Niveles totales de iNOS en astrocitos controles (carril 1 y 3) o astrocitos provenientes del modelo de LPS prenatal (carril 2 y 4). (C-F) Imágenes representativas de fluorescencia (C y E) y pseudocolor (D y F) de DAF-FM en astrocitos controles o provenientes del modelo de LPS prenatal (barras negras). (G) Cuantificación de la fluorescencia DAF-FM. **P<0,005. Barra de calibración: 80 μ m.

En el SNC, la microglia y astrocitos son las células instrumentales de la respuesta inflamatoria y sirven como la principal fuente de citoquinas (e.j. $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-1}\beta$) para el parénquima cerebral. Muchas de esas citoquinas controlan y regulan las funciones neuronales y gliales en respuesta a condiciones patológicas, expresión de iNOS, producción de ON y $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En este contexto, nosotros investigamos si los astrocitos obtenidos desde la descendencia de ratonas expuestas a LPS durante la preñez exhiben un aumento en la liberación de $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-1}\beta$.

Interesantemente, astrocitos del modelo de inflamación prenatal exhibieron un aumento en la producción de $\text{TNF-}\alpha$ 40 veces mayor y una producción de $\text{IL-1}\beta$ 5 veces más comparadas con astrocitos del grupo control (**Fig.5**). Por otro lado, astrocitos del modelo de inflamación prenatal exhibieron un aumento de ~ 3 veces en los niveles de iNOS comparados con astrocitos del grupo control (**Fig. 5B**). En concordancia con estos resultados, los astrocitos de inflamación prenatal presentaron un aumento significativo en la producción de ON (~ 2 veces) comparado con las condiciones controles (**Fig. 5C-D**).

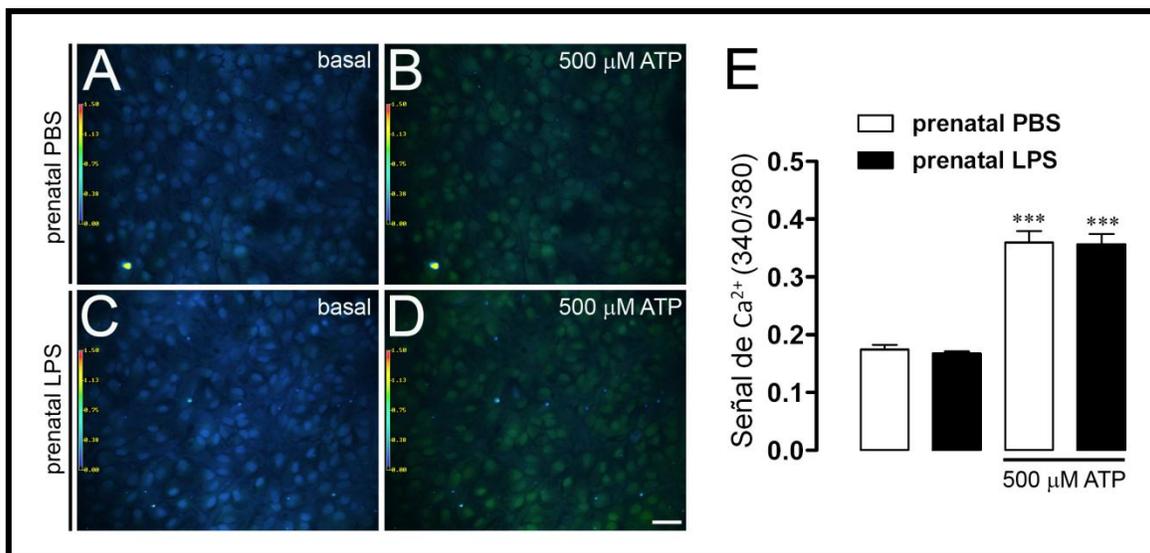


Figura 6. Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal no mostraron cambios en los niveles basales de Ca^{2+} . (A-D) Imágenes representativas de fluorescencia de astrocitos cargados con FURA-2-AM mostrando $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal (A,C) y estimulados con 500μM de ATP (B,D) de astrocitos del grupo prenatal PBS y prenatal LPS, respectivamente. (E) Cuantificación de la señal de Ca^{2+} de astrocitos provenientes del grupo control (barras blancas) y

grupo prenatal LPS (barras negras), antes y después de la estimulación con 500 μM de ATP. Barra de calibración: 80 μm . *** $P < 0,001$, con respecto a cada control.

Varios estudios muestran que las dinámicas de Ca^{2+} intracelular cumplen un rol crítico sobre el perfil pro-inflamatorio de CGs, y sirven como un sistema sensitivo para mediar la liberación de gliotransmisores, citoquinas y factores de crecimiento, representando la primera vía por las cuales las CGs responden a la actividad neural. De esta manera, nosotros examinamos el efecto de la inflamación prenatal sobre los niveles basales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de astrocitos. A diferencia de lo que ocurrió con la producción de ON, astrocitos del modelo de inflamación prenatal presentaron niveles basales similares en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ comparados con los astrocitos del grupo control (**Fig. 6A-E**).

Para estudiar el impacto en la inflamación prenatal sobre los receptores purinérgicos y la señalización de Ca^{2+} intracelular, los astrocitos fueron estimulados con ATP, conocido por activar tanto, receptores P2X como P2Y.

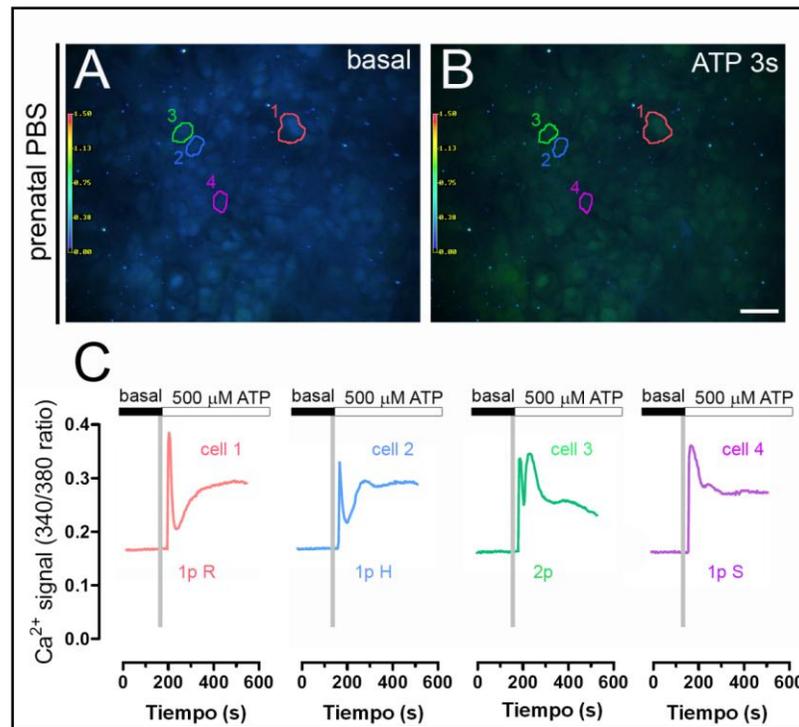


Figura 7. Astrocitos de la descendencia de ambos grupos prenatales presentan distintos patrones de dinámicas de Ca^{2+} intracelular evocadas por ATP. (A-B) Selección de células

representativas de los diferentes patrones de comportamiento de señal de Ca^{2+} intracelular presentes tanto en grupo prenatal LPS (imagen no mostrada) como en el grupo control (A-B). (C) Patrones de comportamiento de la señal de Ca^{2+} intracelular en respuesta a $500\mu\text{M}$ de ATP. Barra de calibración: $80\mu\text{m}$.

Importantemente, tanto astrocitos de la descendencia de madres tratadas con LPS o PBS mostraron transientes de Ca^{2+} similares luego de la estimulación con $500\mu\text{M}$ de ATP (**Fig. 6A-E**). Estos datos indican, que la inflamación prenatal podría incrementar la liberación y producción de IL- 1β y TNF- α y ON en astrocitos, pero no genera cambios en los niveles basales de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ni en las transientes de Ca^{2+} intracelular evocadas por ATP.

Estudios previos, desarrollados en astrocitos han revelado que el ATP ($500\mu\text{M}$) produce una respuesta bifásica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$: la liberación del calcio almacenado (primer *peak*) y entrada de calcio desde el medio extracelular (segundo *peak*). Esos estudios muestran que el primer *peak* en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por ATP, depende de los receptores P2Y, mientras que la segunda respuesta debería ocurrir vía activación de los receptores P2X7. Por lo tanto, nosotros analizamos los patrones de respuesta de los cambios en la señal de Ca^{2+} provocados por ATP en nuestro modelo. Los astrocitos controles (Fig. 7A,B y C) y los astrocitos de las madres tratadas con LPS muestran 3 patrones diferentes de respuesta de calcio sobre la aplicación de ATP (Fig. 7C): 1) Un *peak* seguido por un ligero aumento de calcio (1p R, célula 1 en azul); 2) 2 *peaks* seguidos por diferentes cambios en calcio (2p, célula 3 en rojo) y 3) Un *peak* seguido por una pequeña disminución y plateau de calcio (1p S, célula 4 en verde). No se detectaron diferencias entre los astrocitos control y los astrocitos de madres tratadas con LPS (Fig. 8A y B).

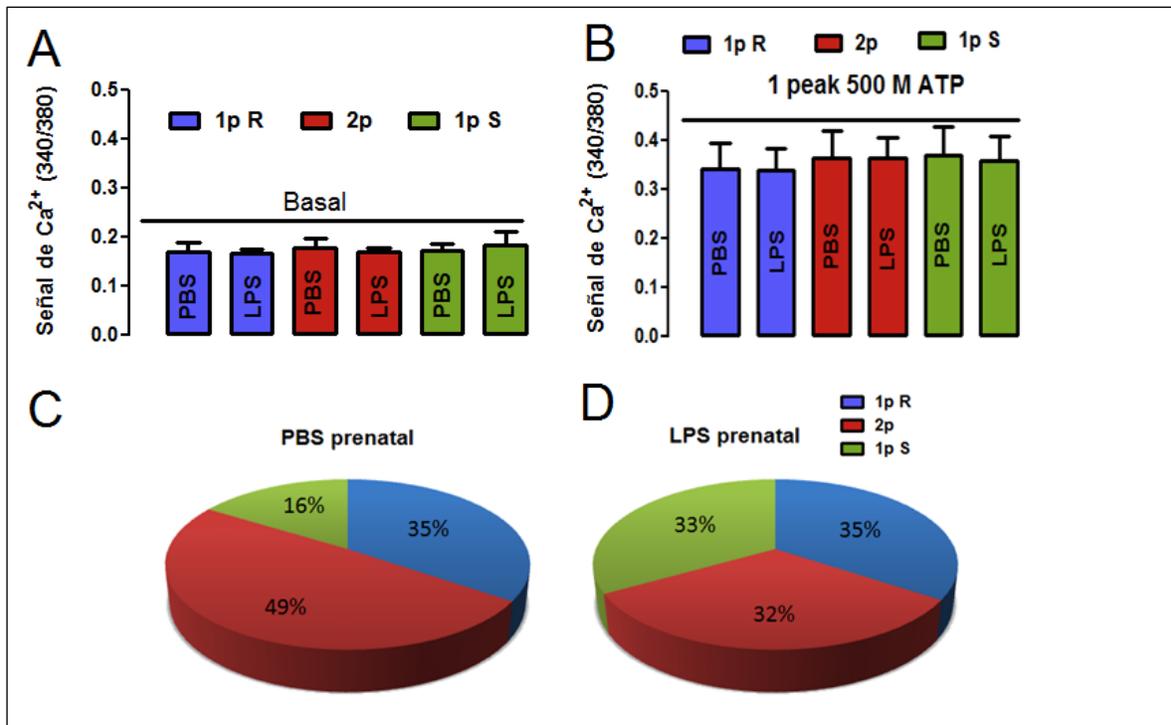


Figura 8. Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal exhiben cambios en el porcentaje de astrocitos correspondientes a cada patrón comparando con el grupo control. (A-B) Señal de Ca²⁺ intracelular de los distintos patrones (1p R, 2p, 1p S) antes (A) y después de la aplicación de 500 μM ATP (B). (C-D) Porcentaje de células correspondientes a cada patrón de calcio en grupo prenatal PBS (C) y grupo prenatal LPS (D).

Sin embargo, cuando comparamos los astrocitos del grupo prenatal LPS con los astrocitos control, había una menor cantidad de astrocitos del grupo prenatal LPS correspondiente al patrón de 2p (32% ± 2), mientras que un mayor número de astrocitos del grupo prenatal LPS respondieron con un patrón 1p R o 1p S de calcio (35% ± 4.1 y 32% ± 3.9, respectivamente) (Fig. 8C).

Estos resultados respaldan la idea que la inflamación prenatal podría afectar la distribución de astrocitos de la descendencia que responden con un patrón específico de Ca²⁺ evocado por ATP. Esta idea resulta interesante dado que los patrones de Ca²⁺ 1p R y 1p S coinciden con la respuesta evocada por ATP a los receptores P2Y/P2X y P2Y, respectivamente. En otras palabras, la inflamación prenatal podría afectar la distribución y activación de receptores P2 en astrocitos de la descendencia.

Se mostró que los astrocitos presentan oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas asincrónicas, las cuales se correlacionan con la liberación de gliotransmisores que regulan las redes neuronales locales. De acuerdo con esto, se evaluó si la inflamación prenatal podría afectar las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas en astrocitos de la descendencia.

Se observó que bajo condiciones control pocos astrocitos muestran oscilaciones de calcio espontáneas (**Fig. 9A-E**). Sin embargo, alrededor del ~45% de astrocitos provenientes del modelo de inflamación prenatal muestran oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} (**Fig. 9 A-E**). Contrariamente a lo esperado, no se encuentran diferencias en el número de oscilaciones de calcio espontáneas, cuando se compararon los astrocitos provenientes del modelo de inflamación prenatal (**Fig. 9F**)

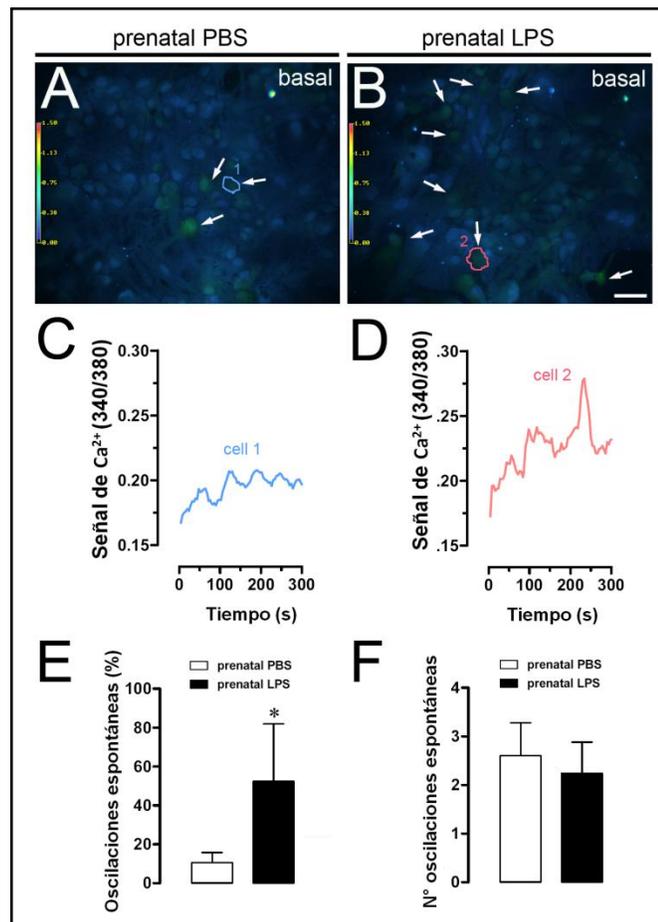


Figura 9. Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal tienen una mayor probabilidad de exhibir oscilaciones espontáneas. (A-B) Imágenes representativas de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} . Las flechas blancas indican algunas de las células que presentaron

oscilaciones espontáneas en grupo prenatal PBS (A) y prenatal LPS (B). (C-D) Ejemplo del patrón de oscilación de Ca^{2+} correspondiente al grupo prenatal PBS (C) y prenatal LPS (D). (E) Porcentaje de oscilaciones espontáneas y (F) Número de oscilaciones espontáneas, en astrocitos controles (barras blancas) o provenientes del modelo de LPS prenatal (barras negras). Barra de calibración: 80 μm .

5.2 Segundo objetivo específico: Determinar si la actividad de HCs se altera en astrocitos de las crías de ratonas expuestas a LPS durante la preñez e identificar las conexinas/panexinas involucradas.

Para estudiar si los astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS durante la preñez muestran un incremento en la actividad de conexones y/o panexones, se evaluó la actividad de HCs con la técnica de captación del trazador molecular Etd (5 μM)

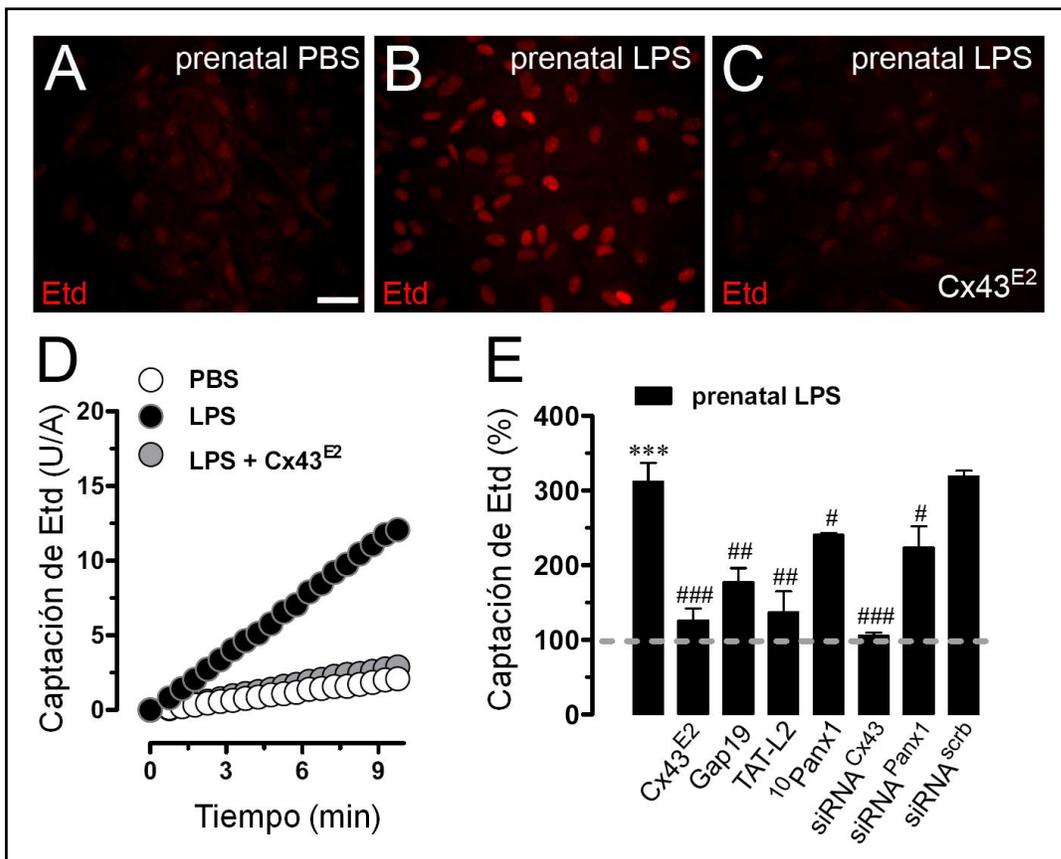


Figura 10. Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal muestran un aumento en la captación de Etd mediada por hemicanales de Cx43. (A-C) Imágenes representativas de fluorescencia de Etd en astrocitos controles (A) o provenientes del modelo de

LPS prenatal sin bloquear (B) y bloqueando los HCs con Cx43^{E2} (C). (D) Captación de Etd con respecto al tiempo en astrocitos grupo prenatal PBS (círculos blancos), prenatal LPS (círculos negros) y prenatal LPS bloqueado con Cx43^{E2} (círculos grises). (E) Captación de Etd con respecto al tiempo en astrocitos corticales bajo condiciones control o pre-incubados por 15 min con bloqueadores farmacológicos (Cx43^{E2}, Gap19, L2, ¹⁰Panx1) y moleculares (siRNA Cx43 y siRNA Panx1), además del scrambled (siRNA^{scrb}). Barra de calibración: 80 μ m. ***P<0,001, con respecto al control prenatal PBS. # P<0,05, ## P<0,005 y ### P<0,001, con respecto al control prenatal LPS.

Cuando los astrocitos del grupo control fueron expuestos por 10 minutos de Etd, mostraron una baja captación de éste trazador (**Fig. 10A-D**). Sin embargo, astrocitos provenientes del modelo de inflamación materna mostraron una captación de Etd al menos 4 veces mayor que astrocitos del grupo control (**Fig. 10 A-D**).

Para determinar la contribución de los HCs de Cx43 en ésta respuesta, se utilizó el anticuerpo Cx43^{E2}, que bloquea específicamente los HCs de Cx43, pero no los CUHs formados por ésta Cx. Interesantemente, el anticuerpo Cx43^{E2} (1:500) previno completamente la captación de Etd inducida por el modelo de inflamación prenatal en los astrocitos (**Fig. 10C-E**). Similares resultados fueron observados cuando se emplearon varios inhibidores farmacológicos de HCs de Cx43, incluyendo Gap 19 (100uM) y TAT-L2 (100 μ M) (**Fig. 10E**). Para respaldar este resultado, se silenció de manera molecular la expresión de la Cx43 a través del uso de RNAs de interferencia (siRNA). Importantemente, el siRNA contra la Cx43 inhibió completamente la captación de Etd inducida por la inflamación prenatal, no así el siRNA control (**Fig.10E**). Interesantemente, ¹⁰Panx1 un péptido mimético que bloquea los HCs de Panx1 y el silenciamiento de Panx1 con siRNA redujeron parcialmente la captación de Etd inducido por la inflamación prenatal (**Fig. 10E**). Esta evidencia sugiere fuertemente que los HCs de Cx43 y Panx1 son los principales contribuidores en esta respuesta.

5.3 Tercer objetivo específico: Determinar si la expresión y distribución de la Cx43 se altera en astrocitos de la descendencia de ratonas expuestas a LPS durante la preñez.

La presencia de HCs funcionales de Cx43 fue apoyada por la detección de la Cx43 por inmunofluorescencia en astrocitos de la descendencia de madres tratadas con LPS (**Fig. 11D-F**). Cabe destacar, que la inflamación prenatal disminuyó la expresión de Cx43 en astrocitos comparado con las condiciones controles (**Fig. 11A-F**). La aparente reducción de la expresión de Cx43 inducida por la inflamación prenatal puede tener relación con los cambios en la expresión de Cx43 que forma CUHs, un fenómeno descrito en astrocitos expuestos a condiciones inflamatorias.

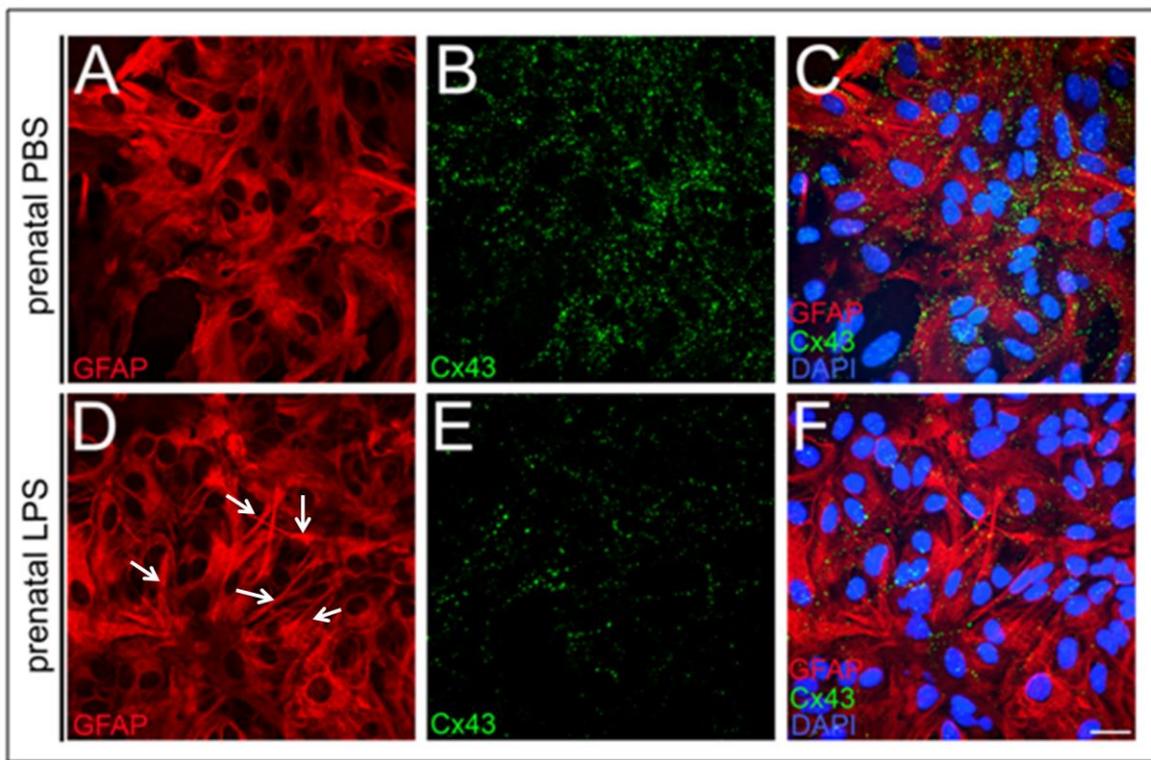


Figura 11. Astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal exhiben un cambio en la expresión de Cx43. (A-F) Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando astrocitos marcados con GFAP (rojo) (A-D) Cx43 (verde) (B-E) y Hoesch/merge (azul) (C-F) de astrocitos control y del grupo prenatal LPS, respectivamente. Astrocitos grupo prenatal LPS, marcados con GFAP (D) donde las flechas blancas indican los procesos de astrocitos activados.

5.4 Cuarto objetivo específico: Estudiar si la actividad de HCs de las CGs observada en la descendencia de madres expuestas a LPS es inhibida por la neutralización de IL-1 β y TNF- α , inhibición de iNOS y/o p38 MAP kinasa.

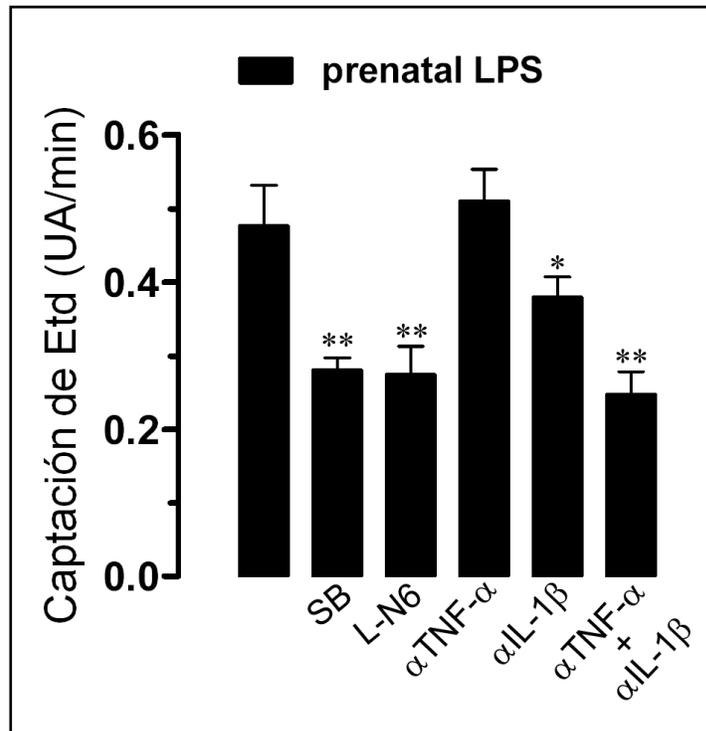


Figura 12. La vía iNOS y p38 MAP kinasa están involucradas en el aumento en la captación de Etd observado en astrocitos de la descendencia de madres expuestas a LPS prenatal. Captación de Etd en astrocitos del modelo de LPS prenatal en condiciones basales o tratados con bloqueadores contra iNOS (L-N6), la vía p38 MAPK con L-N6, la citoquina TNF- α con α TNF- α , IL-1 β con α IL-1 β y mix de citoquinas pro-inflamatorias con α TNF- α / α IL-1 β . *P<0.05, **P<0.005, con respecto al control prenatal LPS.

Dado a que los estudios previos han demostrado que la liberación de IL-1 β y TNF- α , activación de iNOS y p38 MAP kinasa participan en la activación de astrocitos, se examinó si esas vías están involucradas en el aumento de la actividad de HCs en astrocitos inducida por la inflamación prenatal. Importantemente, la captación de Etd inducida por la inflamación prenatal en astrocitos fue parcialmente reducida cuando se inhibió la p38 MAP kinasa y la iNOS con inmunoneutralización de TNF- α y IL- β también disminuyó de manera significativa la captación de Etd observada en astrocitos de madres tratadas con LPS

(Fig.12). Esta idea está de acuerdo con el hecho de que astrocitos de la descendencia del modelo de inflamación prenatal exhibe: 1) un incremento en la liberación de TNF- α y IL- β y 2) un incremento en el nivel de iNOS y producción de ON.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que la inflamación prenatal altera distintas funciones celulares de los astrocitos, incluyendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β y TNF- α), liberación de ON, patrones de Ca²⁺ intracelular evocados por ATP, oscilaciones espontáneas de Ca²⁺ intracelular y actividad de HCs.

Se ha demostrado que el LPS aumenta la expresión de iNOS, la producción de ON y la liberación de IL-1 β y TNF- α en CGs en forma dependiente de la vía NF- κ B (**Han et al., 2001; Possel et al., 2000**). Esto concuerda con nuestros resultados en los cuales se encontró que astrocitos provenientes de la descendencia de madres estimuladas con LPS, exhiben un aumento en la liberación de IL-1 β y TNF- α , mayores niveles de iNOS y un aumento en la producción de NO ¿Cómo el LPS durante la preñez de ratonas genera una respuesta alterada permanente en diversas funciones de los astrocitos de la progeñe? Es muy probable que durante la etapa fetal, el ambiente inflamatorio inducido por el LPS haya modificado de forma epigenética diversos genes relacionados a la respuesta inflamatoria en las células del SNC del feto. En efecto, se ha demostrado que LPS y la subsecuente producción de citoquinas pro-inflamatorias genera cambios epigenéticos en la ruta de NF- κ B que condicionan las respuestas de las células gliales en la progeñe (**Weaver et al., 2004; Zhang and Meaney, 2010**). Además, se ha demostrado que bajo estas condiciones las CGs de la progeñe exhiben una mayor liberación de citoquinas pro-inflamatorias (**Arsenault et al., 2013, Retamal et al., 2007**). Esta evidencia concuerda con el aumento en la liberación de IL-1 β y TNF- α observado en astrocitos provenientes del modelo de inflamación prenatal. En este sentido, se sabe que tanto IL-1 β y TNF- α pueden estimular de forma autocrina a los astrocitos, generando un cambio en el perfil inflamatorio de estos, incluyendo alteraciones en la expresión de iNOS y la producción de ON (**Retamal et al., 2007**). En apoyo a esta idea, aquí encontramos que astrocitos provenientes del modelo de inflamación prenatal exhiben mayores niveles de iNOS y un aumento en la producción de ON.

Estudios previos han demostrado que en condiciones inflamatorias las CGs presentan un nivel basal de [Ca²⁺]_i más alto de lo normal (**Orellana et al., 2013**). Contrario a las expectativas, nuestros resultados no revelaron cambios en los niveles basales de [Ca²⁺]_i

cuando se compraron los astrocitos provenientes del modelo de inflamación prenatal con los astrocitos del grupo control. Una explicación probable a esta discordancia, es que más que cambios en los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$, quizás la inflamación prenatal podría estar cambiando los patrones de respuesta en las dinámicas de Ca^{2+} dependientes de receptores purinérgicos. En efecto, se observó que el número de astrocitos que responden a las transientes de Ca^{2+} evocadas por ATP depende de si ellos provienen de una madre control o expuesta a LPS. Se ha demostrado que el ATP induce un primer transiente (*peak*) en la $[Ca^{2+}]_i$ seguido por un segundo aumento gradual de $[Ca^{2+}]_i$ (Orellana et al., 2013). El primer *peak* estaría dado por la activación de los receptores P2Y y la subsecuente liberación de Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplasmático. Por otro lado, el segundo *peak* obedecería a la activación de los receptores P2X7 y la posterior entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. En este estudio, tanto los astrocitos del grupo prenatal LPS como los controles mostraron 3 patrones distintos de *peaks* de señalización de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a 500 μ M de ATP: 1) 1 *peak* seguido por un ligero aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, 2) 2 *peaks* seguidos por diferentes cambios en el $[Ca^{2+}]_i$. 3) 1 *peak* seguido de una ligera disminución de $[Ca^{2+}]_i$.

Cuando comparamos los astrocitos del grupo prenatal LPS con los astrocitos control, había una menor cantidad de astrocitos del grupo control correspondiente al patrón de 1p S (16% +-2), sin embargo casi la mitad respondió con el patrón 2p, mientras que astrocitos del grupo prenatal LPS respondieron casi en la misma proporción para los 3 patrones de calcio.

Los astrocitos control y astrocitos de las madres tratadas con LPS muestran el patrón de Ca^{2+} 1p S. Los astrocitos del grupo prenatal LPS no se vieron afectados en cuanto a la distribución y a la activación de los receptores P2, ya que las células respondieron en la misma proporción a los patrones de calcio 1p R y 1p S, los cuales coinciden con una respuesta de los receptores estimulados con ATP, P2Y/P2X y P2Y, respectivamente.

Estos resultados concuerdan con el hecho de que las dinámicas de Ca^{2+} evocadas por ATP dependen del perfil inflamatorio de las CGs (Ferrari et al., 1996; Molleret al., 2000; Verderio y Matteoli, 2001). En adición a esto, se observó que bajo condiciones controles pocos astrocitos muestran oscilaciones espontáneas en la $[Ca^{2+}]_i$ y Ca^{+2} , mientras que casi

el 50% de los astrocitos del grupo prenatal LPS sí mostraron oscilaciones. Sin embargo, no se observaron diferencias en el número de oscilaciones espontáneas en la $[Ca^{2+}]_i$, cuando se compararon los astrocitos control con los astrocitos del grupo prenatal LPS. Tomando toda esta evidencia, es posible especular que la inflamación prenatal podría afectar en la progenie la distribución y activación de los receptores purinérgicos de los astrocitos. Apoyando esta idea, recientemente se demostró que astrocitos deficientes para el gen NPC1, el cual es el modelo murino de la enfermedad neurodegenerativa de *Niemann-Pick tipo C*, exhiben un incremento en las oscilaciones espontáneas en la $[Ca^{2+}]_i$ dependientes del receptor P2Y1 (Sáez and cols, 2010). Del mismo modo, diversas condiciones pro-inflamatorias están caracterizadas por un desorden en la señalización de Ca^{2+} intercelular dependiente de receptores purinérgicos en CGs (Marambaud et al., 2009), contribuyendo así al progreso de varias enfermedades neurodegenerativas (Nedergaad et al., 2010).

Durante la última década, se ha demostrado a través de varias investigaciones experimentales la presencia de HCs funcionales en la superficie celular (Sáez et al., 2010). Aunque en condiciones normales, los HCs liberan moléculas fisiológicas relevantes para diversas funciones del SNC, se cree que durante procesos pro-inflamatorios estos canales podrían contribuir al comienzo y desarrollo de diversas patologías cerebrales (Orellana 2012d). En este estudio, se observó que el modelo de inflamación prenatal generó un aumento en la actividad de HCs en astrocitos comparado con el grupo control. Para identificar el tipo de Cx o Panx involucrada en esta respuesta se usó una aproximación farmacológica y molecular. De acuerdo a esto, en este estudio se demostró que la inflamación prenatal aumenta la actividad de HCs astrogliales formados por la Cx43 y Panx1, dado que: i) distintos inhibidores farmacológicos (Cx43^{E2}, TAT-L2 y Gap19) y moleculares (siRNA) contra la Cx43 previnieron completamente el aumento en la actividad de HCs astrogliales inducido por el modelo de inflamación prenatal y ii) la inhibición farmacológica (¹⁰Panx1) y molecular (siRNA) contra la Panx1 previnieron parcialmente el aumento en la actividad de HCs astrogliales inducido por el modelo de inflamación prenatal ¿Cómo se produce el aumento en la actividad de HCs astrogliales inducida por la inflamación prenatal? Existen varios mecanismos que podrían estar dando cuenta de aquello: i) un incremento en la probabilidad de apertura de HCs presentes en la membrana plasmática de los astrocitos, ii) un incremento en el número de HCs disponibles en la

membrana plasmática ya sea por un aumento en la inserción o disminución de internalización de éstos, y (iii) un aumento en la conductancia de los HCs que se encuentran abiertos (**Schalper y cols 2008**). Aunque con nuestros resultados, no se puede dilucidar cual de los anteriores mecanismos contribuyen a este fenómeno, dado que previamente se ha descrito que en condiciones pro-inflamatorias el aumento en la actividad de HCs astrogiales ocurre por aumento en el número de ellos en la membrana plasmática (**Orellana et al., 2010; Orellana et al., 2011a**), es plausible sugerir que este mecanismo podría estar participando en nuestro sistema. En efecto, la presencia de HCs funcionales de Cx43 también se apoya en el hecho de haber detectado su presencia por inmunofluorescencia. No obstante, cabe destacar que el modelo de inflamación prenatal generó una disminución en la expresión de Cx43 comparado con las condiciones controles. Dado que un pequeño porcentaje (5-10%) del total de Cx43 forma HCs en la superficie celular de astrocitos corticales, es muy probable que los HCs de Cx43 también correspondan a un pequeño porcentaje del total de la proteína haciendo difícil su detección por inmunofluorescencia. Por tanto, la reducción en la expresión de Cx43 observado en nuestro sistema, más que reflejar cambios en la expresión de HCs de Cx43, probablemente esté dando cuenta de cambios en la expresión de la Cx43 que está en tráfico celular o formando CUHs.

¿Cuál es la vía de señalización involucrada en la activación de los HCs astrogiales inducida por la inflamación prenatal? Se ha demostrado anteriormente, que en CGs estimuladas con LPS el aumento de la actividad de HCs depende de la activación de iNOS (**Orellana et al., 2013**). En acorde con esto, aquí se encontró que el aumento en la actividad de HCs astrogiales inducido por inflamación prenatal fue prevenida tras inhibir la iNOS, sugiriendo que la producción de ON está involucrada en esta respuesta. Apoyando esta idea, se ha reportado que dadores de ON pueden incrementar la actividad de HCs de Cx43 en astrocitos corticales (**Retamal et al., 2007**). Aún más relevante para este estudio, es que el mismo grupo de investigadores también demostró IL-1 β y TNF- α aumentan la apertura de HCs de Cx43 astrogiales por una vía dependiente de la activación de la p38 MAP kinasa (**Retamal et al., 2007**). En efecto, se ha establecido que TNF- α y IL-1 β inducen la activación de la vía p38 MAP kinasa en astrocitos (**Clerk et al., 1999; Rossa et al., 2006; Mitchell et al., 2007**), la cual a su vez, puede inducir la expresión de iNOS (**Gutierrez-**

Venegas et al., 2005; Xu et al., 2006) y consecuentemente, un aumento en la producción de ON (**Guan et al., 1997; Badger et al., 1998**). En adición, la actividad de p38 MAP kinasa es necesaria para inducir un aumento en la actividad de HCs de Cx43 (**Schalper et al., 2008**), posiblemente usando una vía dependiente de Ca^{2+} (**Mu et al., 2008**) o como consecuencia de un aumento en el estrés oxidativo (**Guyton et al., 1996**). Interesantemente, aquí se observó que la inhibición de la p38 MAP kinasa con SB202190, redujo importantemente la actividad de HCs astrogiales inducida por la inflamación prenatal. Similares resultados se observaron cuando se neutralizó de manera simultánea la acción de IL-1 β y TNF- α con el receptor soluble y el antagonista del receptor, respectivamente. Esto indica que la liberación autocrina de TNF- α y IL-1 β y la activación de iNOS y la vía p38 MAPK son necesarios para la actividad de HCs astrogiales inducida por la inflamación prenatal. Apoyando esta idea, nosotros encontramos que astrocitos del grupo prenatal LPS mostraron un incremento en la liberación de TNF- α y IL-1 β y un incremento en los niveles de iNOS y producción de ON.

En conclusión se puede afirmar que la inflamación prenatal genera un cambio en el perfil inflamatorio de los astrocitos en la descendencia que se caracteriza por: i) un aumento en la producción de citokinas y ON; ii) cambios en la dinámica de Ca^{2+} evocadas por ATP; y iii) un aumento en la actividad de HCs. Las alteraciones en estas funciones astrogiales inducidas por la inflamación prenatal podrían participar en una posible desregulación en la comunicación entre astrocitos y neuronas en el parenquima cerebral de la descendencia. Futuras investigaciones podrán dilucidar cómo estas desregulaciones podrían estar involucradas en el daño neuronal y cognitivo observado en hijos de madres que padecieron infecciones importantes durante su embarazo.

7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Aderem, A., Ulevitch, R.J. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-7.

Ashdown, H., Dumont, Y., Ng, M., Poole, S., Boksa, P., Luheshi, G.N. 2006. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 11: 47-55.

Barres, B.A. 2008. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60: 430-440.

Benarroch, E.E. 2005. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc* 80: 1326-1338.

Boksa, P. 2010. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain, behavior, and immunity* 24: 881-897.

Bruzzone, R., Hormuzdi, S.G., Barbe, M.T., Herb, A., Monyer, H. 2003. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 13644-13649.

Cai, Z., Pan, Z.L., Pang, Y., Evans, O.B., Rhodes, P.G. 2000. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatric research* 47: 64-72.

Cai, Z., Pan, Z.L., Pang, Y., Evans, O.B., Rhodes, P.G. 2000. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatric research* 47: 64-72.

Cherian, P., Siller-Jackson, A.J., Gu, S., Wang, X., Bonewald, L.F., Sprague, E., Jiang, J.X. 2005. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 16: 3100-3106.

Clerk, A., Harrison, J.G., Long, C.S., Sugden, P.H. 1999. Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31:2087-2099.

Contreras, J.E., Sanchez, H.A., Eugenin, E.A., Speidel, D., Theis, M., Willecke, K., Bukauskas, F.F., Bennett, M.V., Saez, J.C. 2002. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 495-500.

Contreras, J.E., Sanchez, H.A., Eugenin, E.A., Speidel, D., Theis, M., Willecke, K., Bukauskas, F.F., Bennett, M.V., Saez, J.C. 2002. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional

communication in cortical astrocytes in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 495-500.

Contreras, J.E., Sanchez, H.A., Veliz, L.P., Bukauskas, F.F., Bennett, M.V., Saez, J.C. 2004. Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. *Brain Res Brain Res Rev* 47: 290-303.

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247: 470-473.

Cotrina, M.L., Lin, J.H., López-García, J.C., Naus, C.C., Nedergaard, M. 2000. ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci* 20: 2835-2844.

Cruciani, V., Mikalsen, S.O. 2005. The connexin gene family in mammals. *Biol Chem.* 386: 325-332.

De Vuyst, E., Decrock, E., De Bock, M., Yamasaki, H., Naus, C.C., Evans, W.H., Leybaert, L. 2007. Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Mol Biol Cell* 18:34-46.

De, Vuyst., E, Decrock., Bock, M., Yamasaki, H., Naus, C.C., Evans, W.H. Leybaert, L. 2007. Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Mol Biol Cell* 18: 34-46.

Domercq, M., Perez-Samartin, A., Aparicio, D., Alberdi, E., Pampliega, O., Matute, C. 2010. P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia* 58: 730-40.

Evans, W.H., Vuyst, E., Leybaert, L. 2006. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *The Biochemical journal* 397: 1-14.

Farber, K., Kettenmann, H. 2006. Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia* 54: 656-665.

Farber, K., Kettenmann, H. 2006. Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia* 54: 656-665.

Fatemi, S.H., Earle, J., Kanodia, R., Kist, D., Emamian, E.S., Patterson, P.H., Shi, L., Sidwell, R. 2002. Prenatal viral infection leads to pyramidal cell atrophy and macrocephaly in adulthood: implications for genesis of autism and schizophrenia. *Cellular and molecular neurobiology* 22: 25-33.

Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S., Di Virgilio, F. 1997. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* 185: 579-582.

Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S., Di Virgilio, F. 1997. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* 185:579-582.

Franke, H., Krügel, U., Illes, P. 2006. P2 receptors and neuronal injury. *Pflügers Arch* 452: 622-44.

Franke, H., Verkhratsky, A., Burnstock, G., Illes, P. 2012. Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic Signal* 8: 629-57.

Gandelman M, Peluffo H, Beckman JS, Cassina P, Barbeito L. 2010. Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroinflammation* 7: 33.

Gandelman, M., Peluffo, H., Beckman, J.S., Cassina, P., Barbeito, L. 2010. Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroinflammation* 7: 33.

Garre, J.M., Retamal, M.A., Cassina, P., Barbeito, L., Bukauskas, F.F., Saez, J.C., Bennett, M.V., Abudara, V. 2010. FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 22659-22664.

Giaume, C. Koulakoff, A. Roux, L. Holcman, D. Rouach, N. 2010. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11: 87-99.

Giaume, C., Theis, M. 2009. Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Res Rev* 63: 160-176.

Gilmore, J.H., Jarskog, L.F. 1997. Exposure to infection and brain development: cytokines in the pathogenesis of schizophrenia. *Schizophrenia research* 24: 365-367.

Girard, S., Kadhim, H., Beaudet, N., Sarret, P., Sebire, G. 2009. Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. *Neuroscience* 158: 673-682.

Golan, H.M., Lev, V., Hallak, M., Sorokin, Y., Huleihel, M. 2005. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology* 48: 903-917.

Gourine, A.V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M.F., Lane, S., Teschemacher A.G., Spyer K.M., Deisseroth, K., Kasparov, S. 2010. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329: 571-575.

Graciarena, M., Depino, A.M., Pitossi, F.J. 2010. Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis and memory related behavior through persistent hippocampal TGFbeta1 downregulation. *Brain, behavior, and immunity* 24: 1301-1309.

Ha, S.K., Lee, P., Park, J.A., Oh, H.R., Lee, S.Y., Park, J.H., Lee, E.H., Ryu, J.H., Lee, K.R., Kim, S.Y. 2008. Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochemistryinternational* 52: 878-886.

Ha, S.K., Lee, P., Park, J.A., Oh, H.R., Lee, S.Y., Park, J.H., Lee, E.H., Ryu, J.H., Lee, K.R., Kim, S.Y. 2008. Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochemistryinternational* 52:878-886.

Haydon, P.G, Carmignoto. G. 2006. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiological reviews* 86: 1009-1031.

Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H., Rusakov, D.A. 2010. Long-term potentiation depends on release of Dserine from astrocytes. *Nature* 463: 232-236.

Hofer, A., Dermietzel, R. 1998. Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes. *Glia* 24: 141-154

Hsiao, H.Y., Mak, O.T., Yang, C.S., Liu, Y.P., Fang, K.M., Tzeng, S.F. 2007. TNF-alpha/IFN-gamma-induced iNOS expression increased by prostaglandin E2 in rat primary astrocytes via EP2-evoked cAMP/PKA and intracellular calcium signaling. *Glia* 55: 214-223.

Hsiao, H.Y., Mak, O.T., Yang, C.S., Liu, Y.P., Fang, K.M., Tzeng, S.F. 2007. TNF-alpha/IFN-gamma-induced iNOS expression increased by prostaglandin E2 in rat primary astrocytes via EP2-evoked cAMP/PKA and intracellular calcium signaling. *Glia* 55:214-223.

Hsiao, H.Y., Mak, O.T., Yang, C.S., Liu, Y.P., Fang, K.M., Tzeng, S.F. 2007. TNF-alpha/IFN-gamma-induced iNOS expression increased by prostaglandin E2 in rat primary astrocytes via EP2-evoked cAMP/PKA and intracellular calcium signaling. *Glia* 55:214-223.

Ida, T., Hara, M., Nakamura, Y., Kozaki, S., Tsunoda, S., Ihara, H. 2008. Cytokine-induced enhancement of calcium-dependent glutamate release from astrocytes mediated by nitric oxide. *Neuroscience letters* 432: 232-236.

Ida, T., Hara, M., Nakamura, Y., Kozaki, S., Tsunoda, S., Ihara, H. 2008. Cytokine-induced enhancement of calcium-dependent glutamate release from astrocytes mediated by nitric oxide. *Neuroscience letters* 432: 232-236.

Jonakait, G.M. 2007. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanisms. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 25: 415-425.

Karpuk, N., Burkovetskaya, M., Fritz, T., Angle, A., Kielian, T. 2011. Neuroinflammation leads to regiondependent alterations in astrocyte gap junction communication and hemichannel activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 414-425

Kuboyama, K., Harada, H., Tozaki-Saitoh, H., Tsuda, M., Ushijima, K., Inoue, K. 2011. Astrocytic P2Y(1) receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine

transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 1930-1941.

Locovei, S., Wang, J., Dahl, G. 2006. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 580: 239-244.

Locovei, S., Wang, J., Dahl, G. 2006. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 580: 239-244.

Maezawa, I., Jin, L.W. 2010. Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate. *J Neurosci* 30: 5346-5356.

Malarkey, E.B., Parpura, V. 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochemistry international* 52: 142-154.

Malarkey, E.B., Parpura, V. 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochemistry international* 52:142-154.

Mandal, M., Donnelly, R., Elkabes, S., Zhang, P., Davini, D., David, B.T., Ponzio, N.M. 2013. Maternal immune stimulation during pregnancy shapes the immunological phenotype of offspring. *Brain Behav Immun* 33: 33-45.

Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U., Vingtdeux, V. 2009. Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 4: 20.

Meyer, U., Murray, P.J., Urwyler, A., Yee, B.K., Schedlowski, M., Feldon, J. 2008. Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between proinflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Molecular psychiatry* 13: 208-221.

Mitchell, C.H., Reigada, D. 2008. Purinergic signalling in the subretinal space: a role in the communication between the retina and the RPE. *Purinergic Signal* 4: 101-107.

Nedergaard, M., Rodriguez, J.J., Verkhratsky, A. 2010. Glial calcium and diseases of the nervous system. *Cell calcium* 47: 140-149.

Nedergaard, M., Rodriguez, J.J., Verkhratsky, A. 2010. Glial calcium and diseases of the nervous system. *Cell calcium* 47:140-149.

Noda, M., Nakanishi, H., Akaike, N. 1999. Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. *Neuroscience* 92: 1465-1474.

Orellana, J.A., Figueroa, X.F., Sanchez, H.A., Contreras-Duarte, S., Velarde, V., Sáez, J.C. 2011a. Hemichannels in the neurovascular unit and white matter under normal and inflamed conditions. *CNS & neurological disorders drug targets* 10: 404-414.

Orellana, J.A., Figueroa, X.F., Sanchez, H.A., Contreras-Duarte, S., Velarde, V., Saez, J.C. 2011a. Hemichannels in the neurovascular unit and white matter under normal and inflamed conditions. *CNS & neurological disorders drug targets* 10: 404-414.

Orellana, J.A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J.X., Bennett, M.V., Naus, C.C., Giaume, C., Saez, J.C. 2011b. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *Journal of neurochemistry* 118: 826-840.

Orellana, J.A., Hernandez, D.E., Ezan, P., Velarde, V., Bennett, M.V., Giaume, C., Saez, J.C. 2010. Hypoxia in high glucose followed by reoxygenation in normal glucose reduces the viability of cortical astrocytes through increased permeability of connexin 43 hemichannels. *Glia* 58:329-343.

Orellana, J.A., Montero, T.D., Von Bernhardt, R. 2013. Astrocytes Inhibit Nitric Oxide-Dependent Ca²⁺ Dynamics in Activated Microglia: Involvement of ATP Released Via Pannexin 1 Channels. *GLIA* 2013;61:2023–2037.

Orellana, J.A., Saez, P.J., Cortes-Campos, C., Elizondo, R.J., Shoji, K.F., Contreras-Duarte, S., Figueroa, V., Velarde, V., Jiang, J.X., Nualart, F., Saez, J.C., Garcia, M.A., 2012. Glucose increases intracellular free Ca²⁺ in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia* 60: 53-68.

Orellana, J.A., Saez, P.J., Shoji, K.F., Schalper, K.A., Palacios-Prado, N., Velarde, V., Giaume, C., Bennett, M.V., Saez, J.C. 2009. Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling* 11: 369-399.

Orellana, J.A., Saez, P.J., Shoji, K.F., Schalper, K.A., Palacios-Prado, N., Velarde, V., Giaume, C., Bennett, M.V., Saez, J.C. 2009. Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling* 11: 369-399.

Orellana, J.A., Shoji, K.F., Abudara, V., Ezan, P., Amigou, E., Saez, P.J., Jiang, J.X., Naus, C.C., Saez, J.C., Giaume, C., 2011c. Amyloid beta-induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 4962-4977.

Patterson, P.H. 2002. Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Current opinion in neurobiology* 12: 115-118.

Pekny, M., Nilsson, M. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50: 427-434.

Perea, G., Navarrete, M., Araque, A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32: 421-431.

Possel, H., Noack, H., Putzke, J., Wolf, G., Sies, H. 2000. Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia* 32: 51-59.

Retamal, M.A., Froger, N., Palacios-Prado, N., Ezan, P., Saez, P.J., Saez, J.C., Giaume, C. 2007. Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *The*

Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27:13781-13792.

Rossa, C., Ehmann, K., Liu, M., Patil, C., Kirkwood, K.L. 2006. MKK3/6-p38 MAPK signaling is required for IL-1beta and TNF-alpha-induced RANKL expression in bone marrow stromal cells. *J Interferon Cytokine Res* 26: 719-29.

Roumier, A., Pascual, O., Bechade, C., Wakselman, S., Ponce, J.C., Real, E., Triller, A., Bessis, A. 2008. Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. *PloS one* 3: e2595.

Rousset, C.I., Chalon, S., Cantagrel, S., Bodard, S., Andres, C., Gressens, P., Saliba, E. 2006. Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. *Pediatric research* 59: 428-433.

Rousset, C.I., Chalon, S., Cantagrel, S., Bodard, S., Andres, C., Gressens, P., Saliba, E. 2006. Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. *Pediatric research* 59: 428-433.

Rousset, C.I., Kassem, J., Olivier, P., Chalon, S., Gressens, P., Saliba, E. 2008. Antenatal bacterial endotoxin sensitizes the immature rat brain to postnatal excitotoxic injury. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67: 994-1000.

Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D., Beyer, E.C. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiological reviews* 83: 1359-1400.

Saez, J.C., Schalper, K.A., Retamal, M.A., Orellana, J.A., Shoji, K.F., Bennett, M.V. 2010. Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Experimental cell research* 316: 2377-2389.

Saez, J.C., Schalper, K.A., Retamal, M.A., Orellana, J.A., Shoji, K.F., Bennett, M.V. 2010. Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Experimental cell research* 316:2377-2389.

Saha, R.N. Pahan, K. 2006. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxidants & redox signaling* 8: 929-947.

Saha, R.N., Pahan, K. 2006. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxidants & redox signaling* 8: 929-947.

Saliba, E., Henrot, A. 2001. Inflammatory mediators and neonatal brain damage. *Biology of the neonate* 79: 224-227.

Scemes, E., Giaume, C. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*. 54: 716-25.

- Schafer, D.P., Stevens, B.** 2013. Phagocytic glial cells: sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 23: 1034-1040.
- Schalper, K.A., Palacios-Prado, N., Retamal, M.A., Shoji, K.F., Martinez, A.D., Saez, J.C.** 2008. Connexin hemichannel composition determines the FGF-1-induced membrane permeability and free $[Ca^{2+}]_i$ responses. *Mol Biol Cell* 19:3501-3513.
- Schalper, KA. Palacios-Prado, N. Retamal, MA. Shoji, KF. Martinez, AD. Saez, JC.** 2008. Connexin hemichannel composition determines the FGF-1-induced membrane permeability and free $[Ca^{2+}]_i$ responses. *Mol Biol Cell* 19: 3501-3513.
- Shi, L., Fatemi, S.H., Sidwell, R.W., Patterson, P.H.** 2003. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 297-302.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V.** 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119: 7-35.
- Sohl, G., Willecke, K.** 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62: 228-232.
- Stevens, B.** 2008. Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. *Neurosignals* 16: 278-288.
- Stolp, H.B., Turnquist, C., Dziegielewska, K.M., Saunders, N.R., Anthony, D.C., Molnar, Z.** 2011. Reduced ventricular proliferation in the fetal cortex following maternal inflammation in the mouse. *Brain: a journal of neurology* 134: 3236-3248.
- Stout, C.E., Costantin, J.L., Naus, C.C., Charles, A.C.** 2002. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *The Journal of biological chemistry* 277: 10482-10488.
- Stout, C.E., Costantin, J.L., Naus, C.C., Charles, A.C.** 2002. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *The Journal of biological chemistry* 277: 10482-10488.
- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T., Suzumura, A.** 2006. Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *The Journal of biological chemistry* 281: 21362-21368.
- Thompson, R.J., Zhou, N., MacVicar, B.A.** 2006. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science* 312: 924-927
- Verderio, C., Matteoli, M.** 2001. ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN- γ . *J Immunol* 166: 6383-6391.
- Verkhatsky, A., Toescu, E.C.** 2006. Neuronal-glia networks as substrate for CNS integration. *Journal of cellular and molecular medicine* 10: 826-836.

Weaver, I.C., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M., Meaney, M.J. 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 7: 847–854.

Wu, S.Z., Bodles, A.M., Porter, M.M., Griffin, W.S., Basile, A.S., Barger, S.W. 2004. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. *Journal of neuroinflammation* 1: 2.

Wuchert, F., Ott, D., Rafalzik, S., Roth, J., Gerstberger, R. 2009. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema. *Journal of neuroimmunology* 206: 44-51.

Wuchert, F., Ott, D., Rafalzik, S., Roth, J., Gerstberger, R. 2009. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema. *Journal of neuroimmunology* 206: 44-51.

Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., Duan, S. 2003. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15194-15199.

Ye, Z.C., Wyeth, M.S., Baltan-Tekkok, S., Ransom, B.R. 2003. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 3588-3596.

Zappala, A., Li, Volti G., Serapide, M.F., Pellitteri, R., Falchi, M., LaDelia, F., Cicirata, V., Cicirata, F. 2007. Expression of pannexin2 protein in healthy and ischemized brain of adult rats. *Neuroscience* 148: 653-667.

Zhang, T.Y., Meaney, M.J. 2010. Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annu. Rev. Psychol.* 61, 439–466.

Zuckerman, L., Rehavi, M., Nachman, R., Weiner, I. 2003. Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28: 1778-1789.