



**Pontificia Universidad Católica de Chile
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Ciencias Fisiológicas**

TESIS DOCTORAL:

“HEMICANALES FORMADOS POR Cx43, Panx1 Y EL RECEPTOR P2X₇ SON CRÍTICOS EN LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA INDUCIDA POR LA EXPOSICIÓN MATERNAL A GLUCOCORTICOIDES Y LA EPILEPSIA”

Por

CAROLA JEANNETTE MATURANA FOURNIEL

Abril, 2016



**Pontificia Universidad Católica De Chile
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Ciencias Fisiológicas**

“HEMICANALES FORMADOS POR Cx43, Panx1 Y EL RECEPTOR P2X₇ SON CRÍTICOS EN LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA INDUCIDA POR LA EXPOSICIÓN MATERNAL A GLUCOCORTICOIDES Y LA EPILEPSIA”

Tesis presentada a la Pontificia Universidad Católica de Chile como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas mención Ciencias Fisiológicas.

Por

CAROLA JEANNETTE MATURANA FOURNIEL

Director de Tesis: Dr. Juan Carlos Sáez

**Comisión de Tesis: Dr. Rodrigo Iturriaga
Dr. Felipe Court
Dr. Jimmy Stehberg**

Abril, 2016

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a las grandes matriarcas, mi abuela Carmen Miranda, mi madre Eliana Fourniel y mi hermana Paola Maturana Fourniel, por ser un ejemplo de mujeres esforzadas y luchadoras.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por darme la salud y la fuerza para seguir adelante y no decaer ante la adversidad. A mi madre y hermana por su amor, apoyo, comprensión y ayuda en los momentos difíciles. Agradecer a los ángeles de mi vida por estar presentes en las distintas etapas de este doctorado: Ernesto por tu infinita paciencia, compañerismo y fortaleza; Valeria por estar siempre presente; Ingrid por tu apoyo incondicional; Fernanda por tus sabias palabras; Kate por creer en mí como profesional y todos aquellos que me brindaron su ayuda cuando lo necesité; Teresa Vergara, Adam Aguirre, Rosalba Escamilla, Micaela Ricca, Carolina Oses, Verónica Aguirre, Marcela Carrasco y Ximena Verges. Quiero agradecer especialmente al Dr. Juan Carlos Sáez por ser un excelente tutor de tesis. El Dr. Sáez colaboró permanentemente en el diseño, supervisión, realización y discusión crítica de los experimentos. Agradezco infinitamente al Dr. Sáez por haberme recibido en su laboratorio, potenciar mi formación no solo como científica, sino que también personal, mediante sus innumerables consejos que me permitieron alcanzar importantes logros como el que concluye en esta instancia. Agradezco de manera especial al Dr. Antonio De Maio por recibirme en su laboratorio y contribuir en mi formación como profesional durante la pasantía realizada en la Universidad de California, San Diego, USA. Finalmente, agradezco a todas las fuentes de financiamiento que hicieron posible la realización de esta tesis.

Fuentes de financiamiento:

Beca CONICYT para estudios de Doctorado (2010-2014)

Beca CONICYT de Apoyo de Tesis Doctoral N° 21100401 (2013)

Beca MECESUP de Estadía de Doctorado en el Extranjero (2013)

Beca de residencia VRI (2014-2015)

Fondos de la Dirección de Postgrado para Estadía de Doctorado en el Extranjero (2013)

Proyecto ACELERADOR UC PMIPUC1206 (2015)

Proyecto FONDECYT 1150291 (2015)

INSTITUTO MILENIO, CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE NEUROCIENCIAS DE
VALPARAISO

ÍNDICE DE MATERIAS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE MATERIAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xxi
INTRODUCCIÓN.....	1
1 Neuroinflamación inducida por estrés prenatal.....	3
1.1. Respuesta al estrés prenatal.....	3
1.2. Estrés prenatal y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal.....	5
1.3. Glucocorticoides y su relación con el sistema inmune en condiciones de estrés.....	8
1.4. El inflamasoma NLRP3 es un importante regulador de la respuesta inflamatoria inducida por estrés.....	10
1.5. Expresión de inflamasoma en células gliales.....	13
1.6. Expresión y regulación de Cxs y Panx1 en células gliales	15
1.7. Deterioro de oligodendrocitos y pérdida de mielina en respuesta a procesos inflamatorios.....	19

1.8.	Las Cxs gliales son claves en el desarrollo de la epilepsia mediada por procesos neuroinflamatorios inducidos por estrés prenatal.....	20
2	Epilepsia: mecanismo neuroinflamatorio inducido por estrés.....	21
2.1.	La epilepsia, un trastorno de la salud mental.....	21
2.2.	Participación de mediadores inflamatorios en la epilepsia.....	22
2.3.	Contribución de los HCs gliales en la epilepsia inducida por estrés prenatal.....	25
2.4.	Estrategias terapéuticas para la epilepsia.....	26
	HIPOTESIS.....	28
	OBJETIVOS.....	28
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1	Materiales.....	31
2	Métodos.....	32
2.1.	Animales.....	32
2.2.	Tratamiento con glucocorticoides	33
2.3.	Modelo de crianza cruzada.....	33
2.4.	Modelo agudo de epilepsia.....	34
2.5.	Determinación de corticosterona plasmática.....	35
2.6.	Cultivos celulares.....	35
2.7.	Medios de cultivo condicionados.....	36
2.8.	Determinación de mediadores inmunes desde medios condicionados.....	37
2.9.	Captación de Etd ⁺ en cultivo celular.....	37
2.10.	qRT-PCR.....	38
2.11.	Preparación de rebanadas de hipocampo.....	39

2.12. Captación de Etd ⁺ en rebanadas de hipocampo.....	39
2.13. Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	40
2.14. Análisis de la morfología dendrítica y densidad de espinas.....	41
2.15. Análisis estadístico de datos.....	42
RESULTADOS.....	43
1 Neuroinflamación inducida por la exposición prenatal a DEX promueve la formación de inflammasoma y la activación a largo plazo de los HCs en oligodendrocitos	43
1.1. La exposición prenatal a DEX aumenta los niveles de corticosterona plasmática y disminuye el peso corporal de las crías durante el desarrollo post-natal	43
1.2. La expresión de las proteínas del inflammasoma NLRP3 incrementan en oligodendrocitos de crías de madres expuestas a DEX.....	46
1.3. La exposición prenatal a DEX crónico incrementa la actividad de los HCs en oligodendrocitos.....	53
1.4. La exposición prenatal a DEX agudo incrementa parcialmente la actividad de los HCs Cx43 y no modifica la sensibilidad al bloqueo de los HCs Panx1 o P2X ₇ R en oligodendrocitos.....	57
1.5. La apertura de los HCs inducida por la exposición prenatal a DEX crónico depende principalmente de Cxs	59
1.6. La administración crónica de DEX induce un aumento de la actividad de los HCs a largo plazo en oligodendrocitos de crías.....	60
1.7. El bloqueo de activación de mastocitos o microglías disminuye la actividad de los HCs en oligodendrocitos inducida por DEX o Ucn II en rebanadas de cerebro de neonatos.....	64

1.8. DEX incrementa la actividad de los HCs en mastocitos, microglías, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas de manera célula y tiempo dependiente.....	68
1.9. IL-1 β y TNF- α incrementan la apertura de los HCs en oligodendrocitos.	69
1.10. Participación de CD14 en la activación de la respuesta inflamatoria mediada por los receptores de TLR4 e inducida en oligodendrocitos de ratones neonatos de madres tratadas con DEX.....	72
1.11. Los niveles del mRNA de Panx1 y P2X ₇ R aumentan en oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX.....	72
1.12. Los niveles de mRNA de Cx29 y Cx32, pero no Cx47, aumentan en oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX.....	75
1.13. Los niveles de IL-1 β e iNOS no cambian en oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX.....	75
1.14. Los medios condicionados de astrocitos o microglías de crías de madres tratadas con DEX aumentan los niveles de mRNA de componentes del inflamasoma en oligodendrocitos.....	78
1.15. Los medios condicionados de microglías o de astrocitos de crías de madres tratadas con DEX inducen un incremento en los niveles de mRNA de IL-1 β , TNF- α e iNOS en oligodendrocitos controles.....	82
1.16. Cultivos de microglías y astrocitos de crías de madres tratadas con DEX liberan citocinas pro-inflamatorias y quimocinas.....	84
1.17. IL-1 β y TNF- α aumentan la expresión del inflamasoma NLRP3 y mediadores pro-inflamatorios en cultivos de oligodendrocitos sanos.....	86
2 La inhibición de los HCs Cxs en células gliales previene la epilepsia inducida PTZ.....	90

2.1. PTZ incrementa la actividad de los HCs en microglías, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas de manera célula y tiempo dependiente.....	90
2.2. Activación de los HCs en células cerebrales inducida por PTZ es bloqueada por carbenoxolona.....	94
2.3. Bloqueador de P2X ₇ R previene las crisis epilépticas y previene la activación de los HCs en células gliales y neuronas del hipocampo	97
2.4. Molécula D4 no afecta viabilidad en ratones C57BL/6.....	100
2.5. Molécula D4 bloquea la actividad de los HCs inducida por PTZ en células cerebrales	101
DISCUSIÓN.....	105
1 Participación del inflammasoma NLRP3 de oligodendrocitos en los mecanismos neuroinflamatorios inducidos por la exposición prenatal a DEX.....	106
2 Los HCs Cx43, HCs Panx1 y el P2X ₇ R de microglías y astrocitos modulan la actividad de los HCs en oligodendrocitos.....	112
3 La respuesta a la exposición prenatal a DEX aguda es mediada por la actividad de los HCs Cx43 de microglías y astrocitos.....	114
4 La actividad de los HCs en oligodendrocitos en respuesta a la exposición prenatal a DEX es dependientes de la señalización de CRHR1 de mastocitos y microglías.....	115
5 Microglías y astrocitos median la apertura de HCs inducida por la exposición prenatal a DEX que se mantiene en el tiempo.....	117
6 Los HCs Cxs de los oligodendrocitos no participarían de la respuesta inflamatoria inducida por la exposición prenatal a DEX crónico.....	121
7 Activación de los HCs en células cerebrales inducida por PTZ es tiempo dependiente...125	

8 Efectos de los bloqueadores de GJs y P2X ₇ R sobre la actividad epiléptica.....	128
9 Molécula D4 bloqueador específico de HCs Cxs como potencial AED.....	130
CONCLUSIÓN.....	133
APÉNDICE.....	134
Apéndice A. DEX prenatal crónico induce en el cerebro de neonatos un aumento de reactividad de NG2 en el cuerpo calloso.....	135
Apéndice B. DEX prenatal crónico induce apoptosis de oligodendrocitos en el hipocampo de las crías	136
Apéndice C. El largo dendrítico y ramificaciones de las neuronas de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo se reduce en las crías de madres tratadas con DEX.....	137
Apéndice D. Protocolo de supervisión para ratones tratados con molécula D4.....	138
Apéndice E. Pretratamiento con la molécula D4 inhibe las crisis convulsivas inducidas por kainato	140
BIBLIOGRAFÍA.....	141

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. La actividad de HCs Cx43 y Panx1 inducida por estrés crónico es mediada por NMDA/P2X ₇ R.....	14
FIGURA 2. Modelo de la participación de mastocitos y microglías en la respuesta neuroinflamatoria y potenciación de sus respuestas al estrés.....	18
FIGURA 3. La inflamación como posible causa y consecuencia de la epilepsia.....	24
FIGURA 4. Crías de madres expuestas a DEX muestran altos niveles de corticosterona y una reducción en la ganancia de peso durante el desarrollo post-natal.....	45
FIGURA 5. La exposición prenatal a DEX crónico incrementa los niveles de NLRP3, ASC y la caspasa-1 en oligodendrocitos de las crías.....	49
FIGURA 6. La exposición prenatal a DEX agudo o crónico aumenta los niveles de las proteínas del inflamasoma NLRP3 en oligodendrocitos de neonatos.....	50
FIGURA 7. La exposición prenatal a DEX agudo aumenta los niveles de las proteínas implicadas en la activación del inflamasoma en oligodendrocitos de neonatos.....	51
FIGURA 8. La exposición prenatal a DEX crónico aumenta los niveles de las proteínas implicadas en la activación del inflamasoma en oligodendrocitos de neonatos.....	52
FIGURA 9. La actividad de los HCs aumenta en oligodendrocitos de cerebro de crías de madres expuestas a DEX crónico.....	56
FIGURA 10. La exposición prenatal a DEX agudo y crónico incrementa la actividad de los HCs Cx43 previniendo la activación de HCs en oligodendrocitos de las crías.....	58

FIGURA 11. D4 bloquea la actividad de los HCs gliales inducida por la exposición prenatal a DEX en rebanadas de cerebro de ratones recién nacidos.....	62
FIGURA 12. La actividad de los HCs de los oligodendrocitos permanece alta en las crías de madres tratadas con DEX y criadas por una madre no tratada.....	63
FIGURA 13. El bloqueo de la activación de los mastocitos y microglías reduce la actividad de los HCs en oligodendrocitos inducida por DEX en rebanadas de cerebro.....	66
FIGURA 14. El bloqueo de la activación de los mastocitos y microglías reduce la actividad de los HCs en oligodendrocitos inducida por Ucn II en rebanadas de cerebro.....	67
FIGURA 15. DEX incrementa la actividad de los HCs en mastocitos, microglías, astrocitos y oligodendrocitos de manera célula y tiempo.....	70
FIGURA 16. TNF- α e IL-1 β inducen apertura de los HCs de oligodendrocitos en cultivo....	71
FIGURA 17. La exposición prenatal a DEX aumenta los niveles de mRNA de proteínas de membrana que participan en la activación del inflamasoma de oligodendrocitos de las crías..	74
FIGURA 18. Los niveles de mRNA de Cx29 y Cx32 aumentan en oligodendrocitos de cultivos de crías de madres tratadas con DEX.....	76
FIGURA 19. Los niveles de mRNA de iNOS, TNF- α e IL-1 β en oligodendrocitos en cultivo crías de madres tratadas con DEX cambian diferencialmente.....	77
FIGURA 20. Medios condicionados de microglías o astrocitos de crías de madres tratadas con DEX aumentan los niveles de mRNA de proteínas de membrana que participan en la activación del inflamasoma en oligodendrocitos.....	80
FIGURA 21. Los medios condicionados de microglías o astrocitos de crías de madres tratadas con DEX aumentan los niveles de mRNA de Cxs en oligodendrocitos de animales controles.....	81

FIGURA 22. Medios condicionados de cultivo de microglías o astrocitos de crías de madres tratadas con DEX aumentan los niveles de mRNA de los productos del inflammasoma en oligodendrocitos controles.....	83
FIGURA 23. La exposición a IL-1 β o TNF- α incrementa los niveles de NLRP3, ASC y la caspasa-1 en oligodendrocitos sanos.....	88
FIGURA 24. La exposición a IL-1 β o TNF- α incrementa los niveles de P2X ₇ R, Panx1 e iNOS en oligodendrocitos sanos.....	89
FIGURA 25. PTZ induce crisis epiléptica caracterizada por diferentes fases conductuales en ratones adultos.....	92
FIGURA 26. PTZ aumenta la actividad de los HCs en diferentes tipos de células del cerebro de una manera dependiente del tiempo.....	93
FIGURA 27. La carbenoxolona bloquea la activación de HCs inducida por PTZ en las células cerebrales.....	96
FIGURA 28. Pretratamiento con el bloqueador de los P2X ₇ R previene el aumento de la actividad de los HCs inducida por PTZ en las células cerebrales.....	99
FIGURA 29. Pretratamiento con D4 previene el aumento de la actividad de los HCs inducido por PTZ en las células cerebrales.....	103
FIGURA 30. D4 bloquea el aumento de la actividad de los HCs inducido por PTZ en las células del cerebro.....	104
FIGURA 31. Esquema de los principales resultados que muestran la participación del receptor de CRH y los diferentes inhibidores de activación celular y actividad de HCs durante la activación de inflammasoma en oligodendrocitos inducida por DEX.....	119

FIGURA 32. Mecanismos moleculares y celulares implicados en la activación de los HCs e inflammasoma NLRP3 en oligodendrocitos en respuesta a la exposición prenatal a DEX.....	123
---	-----

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Altos niveles de citocinas pro-inflamatorias en medios condicionados de microglías y astrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX.....	85
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

A: astrocito
ACM: medio condicionado de astrocitos
ACTH: hormona adrenocorticotrópica
AEDs: drogas antiepilépticas
ALR: receptor tipo AIM-2 o ausente en melanoma 2
AP-1: proteína activadora tipo 1
ASC: proteína que contiene un dominio de reclutamiento CARD y activación de caspasas
ATP: adenosina trifosfato
BBB: barrera hematoencefálica
BBG: azul brillante G
CA: cuerno de Ammón
CARD: dominio de reclutamiento de caspasa
Casp-1: caspasa-1
CD14: "cluster" de diferenciación 14
CLR: receptor tipo lectina C
CMT1X: enfermedad Charcot-Marie-Tooth
COX-2: ciclo-oxigenasa-2
CREB: proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
CRH: hormona liberadora de corticotropina
CRHR: receptor de CRH
Cx: conexina
DAMPs: patrones moleculares endógenos asociados a daño
DEX: dexametasona
DG: giro dentado
DMEM: "Dulbecco's Modified Eagle's Medium"
DMSO: dimetil sulfóxido
GABA: ácido gamma-aminobutírico
GCs: glucocorticoides
GFAP: proteína ácida fibrilar de la glía
GJs: "Gap Junctions"
GMCSF: factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos
GR: receptor de glucocorticoides
GREs: elemento respuesta a glucocorticoides
HCs: hemicanales
HMGB1: proteína de alta movilidad de grupo 1
HPA: hipotálamo-pituitaria-adrenal
HSP90: proteína de shock térmico 90
IBA-1: "ionized calcium binding adaptor molecule 1"
IFN- γ : interferón tipo gamma
IL: interleucina
IL-1RI: receptor de interleucina-1-beta tipo I
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

LCR: líquido cefalorraquídeo
LPS: lipopolisacárido
LRR: repeticiones ricas en leucina
MCM: medio condicionado de microglías
MCP-1: quimiocina o proteína quimiotáctica de monocitos-1
MD-2: proteína de diferenciación mieloide 2
MDD: desorden de depresión severa
MIP-1 α : proteínas inflamatorias de macrófagos
MLCK: cinasa de la cadena ligera de miosina
MRs: receptor de mineralocorticoides
mRNA: ácido ribonucleico tipo mensajero
NAD: dominio asociado a NACHT
NAIP: proteína inhibidora de la apoptosis neuronal
NALP: dominio NACHT
NeuN: proteína nuclear específica neuronal
NF- κ B: factor de transcripción kappa B
NG2: proteoglicano condroitín sulfato
NLRCS: receptores NLR que contienen el dominio CARD
NLRP3: criopirina o NALP3
NLRPs: receptores NLR que contienen el dominio PYD
NLRs: receptores NOD-like (tipo de oligomerización unida a nucleótidos)
NMDA: N-metil-D-aspartato
NPV: núcleo paraventricular
NOD: dominio de oligomerización del nucleósido en los receptores NLR
NO: óxido nítrico
O: oligodendrocito
OPC: células precursoras de oligodendrocitos
11 β -HSD2: enzima 11- β - isoenzima 2 deshidrogenasa
P2X₇R: receptor P2X₇
Panx: panexina
PAMPs: patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos
PLP: proteína proteolipídica
PRRs: receptores de reconocimiento de patrones
P2Y: receptor purinérgico metabotrópico
PTZ: pentilenetetrazol
PYD: dominio de pirinas y que contiene LRR
RIG-I: receptor tipo proteína inducible por ácido retinóico
ROS: especies reactivas de oxígeno
SGT1: supresora del alelo G2 del genSkp1 homólogo de la proteína p19 del ciclo celular
siRNA: ARN silenciador
SNC: sistema nervioso central
TJ: “tight junction”
TLE: epilepsia del lóbulo temporal
TLRs: receptores Toll-like
TNF- α : factor de necrosis tumoral tipo alfa
Ucn: urocortina

RESUMEN

La inflamación se asocia frecuentemente a una respuesta del sistema inmune, dirigida a eliminar agentes infecciosos y señales moleculares de peligro o productos del daño tisular. Sin embargo, la inflamación puede ser causa o consecuencia de un gran número de enfermedades crónicas y es estrictamente controlada por varios complejos multimoleculares citosólicos denominados inflamasoma presentes no sólo en las células del sistema inmune, sino que además han sido detectadas en diversas células parenquimales. Tras la activación del inflamasoma, las células liberan mediadores inflamatorios (Ej.: IL-1 β), que desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la neuroinflamación en trastornos neurodegenerativos y trastornos psiquiátricos, como la epilepsia y la depresión, respectivamente. El aumento de Ca⁺² citoplasmático promueve el ensamblaje de los componentes del inflamasoma y su activación; por lo cual se ha sugerido la participación de los hemicanales (HCs) formados por las conexinas (Cxs) y pannexina 1 (Panx1), así como el receptor de P2X₇ (P2X₇R), en la activación del inflamasoma inducida por ATP. Cabe hacer notar que la epilepsia puede ser consecuencia de una alteración traumática o estrés perinatal y se desconoce si la neuroinflamación desencadenada en dicho período de vida se refleja en la activación de los HCs gliales. Por otro lado, evidencias clínicas y experimentales sugieren una posible conexión entre la epilepsia y la neuroinflamación, que se caracteriza por la acumulación, activación y proliferación de microglías y astrocitos. Sin embargo, los fármacos de uso actual para tratar la epilepsia están dirigidos a blancos moleculares localizados en neuronas y no en las células gliales. En el estrés agudo y en especial el estrés crónico o los altos niveles de

glucocorticoides (GCs) inducen la respuesta neuroinflamatoria, que se refleja en un aumento de la expresión de las proteínas del inflamasoma y la reactividad de microglías y astrocitos. No obstante, la participación de los oligodendrocitos en estos procesos ha sido poco estudiada. Más aun, se desconoce si en oligodendrocitos se expresa y activa un inflamasoma en procesos neurodegenerativos. En base a estos antecedentes, aquí se postula que, “los oligodendrocitos expresan el inflamasoma NLRP3 que se activa con la exposición prenatal a glucocorticoides, y que a su vez, como en la epilepsia inducida por PTZ, promueven la activación de hemicanales y el receptor purinérgico P2X₇R en células cerebrales”. Con el fin de generar información que aclare las incógnitas descritas arriba, en la presente tesis se utilizaron crías (2 días de edad) de madres controles y madres tratadas con dexametasona (DEX, GC sintético) desde el día 12 de gestación. Rebanadas de cerebro de crías controles revelaron la presencia de las proteínas que conforman el complejo multimolecular: la proteína de señalización, NLRP3; la proteína adaptadora, ASC y la proteína de activación, caspasa-1 (Casp-1, forma activa); cuyos niveles incrementaron significativamente en rebanadas de cerebro de crías de madres expuestas a DEX. La actividad de los HCs (ensayos de captación de etidio en cortes de hipocampo) aumentó en microglías, astrocitos y oligodendrocitos de crías de madres expuestas a DEX y fue inhibida por bloqueadores de HCs Panx1 y Cx43 (péptidos 10panx1 y Gap26, respectivamente) y del P2X₇R (A740003). Además, se utilizó D4, un bloqueador selectivo de HCs Cxs identificados por “screening” virtual de la base de datos del NCI y utilizando la estructura cristalina de la Cx26 y boldina como farmacóforo. D4 inhibió completamente la actividad de los HCs en células gliales. La actividad de los HCs inducida por exposición prenatal a DEX persistió durante al menos 8 semanas después del nacimiento y no fue revertida por los cuidados de una nodriza no expuesta a DEX durante el primer mes o la

posterior crianza junto a los hermanos del mismo sexo durante el segundo mes de vida. Por lo tanto, el inflamasoma en las células gliales se activaría por la exposición a DEX y se mantendría durante un largo tiempo postnatal. Se sugiere que estos cambios podrían alterar la neurogénesis y conectómica perinatal.

Para estudiar el posible papel de los HCs en la epilepsia, se utilizaron ratones machos adultos que fueron tratados con pentilentetrazol (PTZ), un agente epileptógeno que actúa como antagonista no selectivo de los receptores GABA_A. Las convulsiones fueron evidentes en ~7 min después de la administración de PTZ seguido por un período de varias horas, en la cual los ratones presentaron actividad motora muy baja y espasmos musculares esporádicos con ~70% de supervivencia. Sin embargo, en los animales pretratados con D4 se previno las convulsiones en su mayoría. Cuando no se previnieron las convulsiones, el período de estatus epiléptico se acotó a ~7 min después de la administración de PTZ. Transcurrida la convulsión, los animales se comportaron como los controles con 100% de supervivencia. Además, D4 inhibió completamente la actividad de los HCs gliales inducida por PTZ. Por otro lado, el pretratamiento con el bloqueador P2X₇R también inhibió la actividad de los HCs inducida por PTZ. En consecuencia, la activación de los HCs inducida por PTZ en neuronas y células gliales involucra la participación de HCs Cxs y P2X₇R. Además, se observó que crías de madres tratadas con DEX durante el período de gestación y luego tratadas con una dosis subepileptógena de PTZ manifiestan convulsiones características de un episodio de epilepsia, sugiriendo que la inflamación desencadenada en la gestación favorece la manifestación de epilepsia en estado adulto. Estos resultados en conjunto apuntan a los HCs gliales como potenciales blancos terapéuticos en estados patológicos cerebrales que conllevan a procesos inflamatorios.

ABSTRACT

Inflammation is frequently associated with an immune system response directed to eliminate infectious agents or handle molecular danger signals or tissue damage products. However inflammation also contributes to the pathogenesis of a great number of chronic diseases and is controlled by cytosolic multimolecular complexes called inflammasomes present not only in immune cells but also in numerous parenchymal cells. After inflammasome activation cells release pro-inflammatory mediators (i.e. IL-1 β) that play a critical role in developing inflammation in neurodegenerative and psychiatric disorders such as epilepsy and depression, respectively. Cytoplasmic increases in $[Ca^{+2}]_i$ promotes the assembly of inflammasome components and activation. Thus, the involvement of connexins (Cxs) and pannexin 1 (Panx1) hemichannels (HCs), as well as P2X₇ receptor (P2X₇R) in the ATP-induced inflammasome activation. It is worth to mention that epilepsy could be caused by traumatic episodes or perinatal stress but it is unknown if the neuroinflammation unleashed in that period of time could be related to glial HCs. Relevant to this issue, clinical and experimental studies suggest a close relationship between epilepsy and neuroinflammation, characterized by accumulation, activation and proliferation of microglia and astrocytes. However, all therapeutic agents currently used to treat epilepsy are directed to molecular targets located in neurons and not in glial cells. Increasing evidences suggest that acute and particularly chronic stress or high levels of glucocorticoids (GCs) induce a neuroinflammatory response, expression of inflammasome and microglia and astrocytes reactivity. However, the participation of oligodendrocytes in neuroinflammatory processes remains poorly understood.

Moreover, it is unknown whether oligodendrocytes express the inflammasome in neurodegenerative processes. Based in this background, it was postulated that “oligodendrocytes express the NLRP3 inflammasome activated after prenatal exposure to glucocorticoids, and in turn, as in PTZ-induced epilepsy, promote the activation of the purinergic receptor hemichannels and P2X₇R in brain cells”. To study the effect of stress on glial HCs, 2 day-old offspring of control and dexamethasone-treated mothers (DEX, synthetic GC) from day 12 of gestation were used. Brain slices from control offspring showed proteins of the multimolecular complex: the signaling protein NLRP3; the adaptor protein ASC and the active form of caspase-1 (Casp-1) and their expression was significantly increased in oligodendrocytes of offspring from mothers treated with DEX. The HCs activity (ethidium uptake assays in hippocampal slices) was increased in microglial, astrocytes and oligodendrocytes from the offspring of mother prenatal exposed to DEX, and was inhibited by Panx1 and Cx43 HC blockers (10panx1 and Gap 26 peptides, respectively) as well as by a P2X₇R blocker (A740003). Also, the selective Cx HC blocker D4 which was used an identified by virtual screening using the NCI database, the crystal structure of Cx26 and boldine as pharmacophore. D4 completely inhibited HC activity in glial cells. HC activity induced by prenatal exposure to DEX persisted at least eight weeks after birth and was not reverted by cross fostering with a control mother during the first month of life or breeding with siblings of the same sex during the second month of life. Therefore, in glial cells the inflammasome would be activated by DEX and is maintained for a long time after birth. It suggested that this response alters neurogenesis and perinatal conectomic.

To study the possible role of glial HCs in epilepsy, male adult mice were treated with pentilentetrazole (PTZ), an epileptogenic agent that acts as a non-selective GABA_A receptors

antagonist. However, animals pre-treated with D4 showed convulsion at ~7 min after PTZ administration and thereafter behave as control animals with 100% survival. Convulsions were evident after ~7 min of PTZ administration followed by several hours in which they showed low motor activity and sporadic muscle spasms with ~70% of survival. Also D4 completely inhibited the PTZ-induced glial HCs activity. On the other hand, pre-treatment with the P2X7R blocker also inhibited the PTZ-induced HCs activity. Thus activation of HCs by PTZ in neurons and glial cells involves the participation of Cx HCs and P2X₇R. In addition, it was observed that offspring of mothers treated with DEX during the gestation period and then treated with a subepileptogen dose of PTZ manifest convulsions characteristics of epilepsy, suggesting that inflammation triggered during pregnancy favors manifestation of epilepsy in adulthood. The results of the present work strongly suggest glial HCs as potential therapeutic targets for pathological conditions that involve neuroinflammatory process.

INTRODUCCIÓN

Neuroinflamación es la inflamación del sistema nervioso central (SNC), que se produce en respuesta al estrés, infecciones y/o enfermedades neurodegenerativas (**Glass y cols., 2010; Frank y cols., 2015**). La neuroinflamación aguda puede ser activada por infecciones o traumatismos mientras que la neuroinflamación crónica se asocia con enfermedades crónicas del SNC como epilepsia, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer entre otras (**Fung y cols., 2012; Lyman y cols., 2014**). La respuesta neuroinflamatoria está regulada por componentes del sistema inmune, como los mastocitos y las microglías (macrófagos residentes del SNC), citocinas y receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) (**Shastri y cols., 2013; Hagberg y cols., 2015**). La unión de PRRs a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) conducen a la activación de múltiples vías de señalización y una variedad de factores de transcripción tales como el factor nuclear (NF)- κ B, a cuales regulan la expresión de los genes inflamatorios e inmunes que resultan finalmente en el desarrollo de la inflamación y la inmunidad del hospedador (**Kawai y Akira, 2009; Liu y cols., 2014**). Entre los DAMPS se incluyen ATP, interleucina (IL) -1 β , ácido úrico y la proteína de alta movilidad de grupo 1 (HMGB1) (**Walker y cols., 2014**). Se han descrito cuatro familias de PRRs que reconocen patógenos: los receptores tipo Toll (TLR), los receptores tipo NOD (proteínas con dominio de oligomerización y unión a nucleótidos) (NLR), los receptores tipo RIG-I (proteína inducible por ácido retinóico) y los receptores tipo lectina C (CLR) (**Takeuchi y Akira, 2010; Minkiewicz y cols., 2013**). Las proteínas NLR se oligomerizan en un complejo

macromolecular conocido como inflamasoma (**Latz y cols., 2013**). Esta plataforma molecular resulta en la generación de caspasas inflamatorias y en el procesamiento de la pro-interleucina 1 β (pro-IL-1 β) y la pro-interleucina 18 (pro-IL-18) hacia sus formas activas: la IL-1 β y la IL-18 (**Schroder y Tschopp, 2010**). Se han identificado 8 miembros de las 23 proteínas NLRs que forman los inflamasomas: la proteína NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP12, NLRC4, ALR (receptor tipo AIM-2 o ausente en melanoma 2) y el sensor citoplasmático RIG-I (**Latz y cols., 2013; Minkiewicz y cols., 2013**). NLRP3 es el único activado por un gran número de estímulos (**Baroja-Mazo y cols., 2013**) y es el principal implicado como sensor ante una noxa estéril (inflamación no provocada por un patógeno tal como puede ocurrir en la epilepsia y la depresión inducida por estrés) (**Rock y cols., 2010; Walker y cols., 2014; Vezzani y cols., 2015; Zhang y cols., 2015**). Si bien el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 requiere una señal de pre-estimulación derivada de los DAMPs y de receptores de citocinas, seguido a su vez de una segunda señal derivada a partir de ATP extracelular, aún no está claro como estas dos señales activan el inflamasoma (**Pelegrin y Surprenant, 2009; Hernandez y cols., 2014**). Se ha planteado que el inflamasoma NLRP3 es regulado de forma positiva por un aumento en la concentración intracelular de Ca⁺² mediado por la actividad de los hemicanales formados por panexina 1 (HCs Panx1) y el receptor P2X₇ (P2X₇R) (**Pelegrin y Surprenant, 2009; Silverman y cols., 2009; Shao y cols., 2015**). Sin embargo, el conocimiento sobre la participación de los HCs Cxs en la activación de inflamasoma presente en enfermedades neurológicas crónicas es limitada y sólo ha sido propuesta en células musculares denervadas (**Cea y cols., 2013**). Actualmente el papel de la inflamación en las comorbilidades de la epilepsia, incluyendo la depresión y el deterioro cognitivo, está bajo investigación. Recientemente se ha descrito, el papel del inflamasoma en la depresión inducida por estrés

(Alcocer-Gomez y cols., 2015) y como el estrés puede exacerbar o gatillar la epilepsia (Huang, 2014) mediante el inflammasoma (Meng y cols., 2014). El estrés agudo puede provocar ataques epilépticos y el estrés crónico aumentar las frecuencias de las crisis (van Campen y cols., 2014). Además del efecto de estrés sobre la susceptibilidad a las crisis en pacientes con epilepsia, el estrés también puede incrementar el riesgo de desarrollar epilepsia, especialmente cuando el estrés es fuerte, prolongado y durante la etapa prenatal (Velisek, 2011; Hashemi y cols., 2013). La comprensión de la relación entre el estrés y la epilepsia puede contribuir en el desarrollo de estrategias centradas en los mecanismos de afrontamiento de la neuroinflamación. En este sentido, los HCs Cxs podrían tener un rol preponderante como posibles blancos moleculares para contribuir en la inhibición del inflammasoma y en consecuencia, la prevención y/o reversión del estrés prenatal y la epilepsia.

1 Neuroinflamación inducida por estrés prenatal

1.1 Respuesta al estrés prenatal.

La vida actual nos somete constantemente a presiones, cambios ambientales y sociales, a los que es difícil adaptarse, provocándonos diversos grados de estrés. El estrés se define como una amenaza a la homeostasis frente a la cual el organismo, para sobrevivir, reacciona con un gran número de respuestas adaptativas, conductuales y fisiológicas, que permiten al organismo responder al estresor de la manera más adaptada posible (Sorrells y cols., 2009; Popoli y cols., 2012). El estrés se considera un problema de primer orden para toda la

sociedad, ya que no solo altera el bienestar de la persona, sino que además, tiene un gran impacto a nivel del desarrollo económico de los países, pues afecta el funcionamiento social y la capacidad laboral de las personas. Si bien durante el diario vivir, las personas pueden exponerse a múltiples y variados estresores psicosociales, la respuesta biológica al estrés es muy parecida. La respuesta al estrés es controlada en gran medida por la activación de los sistemas nervioso y endocrino, los cuales son responsables de la liberación de neurotransmisores y hormonas, que inducen los cambios emocionales, conductuales y fisiológicos en el organismo **(de Kloet y cols., 2005)**. Durante el desarrollo prenatal los neurotransmisores y las hormonas actúan sobre las células indiferenciadas estimulando, modificando o retardando su proceso de diferenciación, razón por la cual, se les ha denominado programadores perinatales **(Lucassen y cols., 2013; Kim y cols., 2015)**.

En el transcurso del embarazo, es frecuente que las mujeres presenten elevados niveles de GCs, hormonas esteroides que se encuentran involucradas en numerosos procesos fisiológicos y que son esenciales para el crecimiento fetal y la inducción de ciertas enzimas, tales como el surfactante pulmonar **(Garbrecht y cols., 2006; Seckl y Holmes, 2007)**. No obstante, bajo una situación de estrés, las concentraciones de GCs maternas pueden alcanzar niveles anormalmente altos, los cuales pueden alterar el desarrollo y crecimiento del feto **(Seckl y Holmes, 2007; Charil y cols., 2010)**. La exposición del feto a estos elevados niveles de GCs maternos circulantes se debe a que el estrés prenatal además reduce la expresión y actividad de la enzima 11- β - isoenzima 2 deshidrogenasa (11 β -HSD2) placentaria, que convierte los GCs activos (ej.: cortisol) en GCs inactivos (ej.: cortisona) **(Mairesse y cols., 2007; Jensen Pena y cols., 2012)**. En el caso del tratamiento con GCs sintéticos, tales como dexametasona o betametasona, que se utilizan durante el embarazo para prevenir el síndrome

de dificultad respiratoria en recién nacidos prematuros, el riesgo de sufrir alteraciones durante el desarrollo fetal es mayor (**Asztalos, 2012; Noorlander y cols., 2014**), ya que los GCs sintéticos no son metabolizados y no se inactivan por la enzima placentaria por lo que cruzan directamente la placenta (**Kajantie y cols., 2004; Davis y cols., 2013**). Los altos niveles de GCs maternos modifican la programación regulatoria de la secreción de GCs y la plasticidad cerebral en el feto, alteraciones que se manifiestan, tanto en el bajo peso al nacer, como en una hipersecreción de GCs en el recién nacido, que dificulta su adaptación al nuevo ambiente y lo hace más susceptible a padecer trastornos afectivos y somáticos (**Charil y cols., 2010; Zhu y cols., 2014**).

1.2 Estrés prenatal y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal.

En la última década, el estrés prenatal y la exposición materna a un exceso de GCs han sido asociados a una variedad de alteraciones en el recién nacido y un incremento en la susceptibilidad a desarrollar trastornos físicos, mentales y sociales en la adolescencia y de adulto bajo estrés (**Barker, 2004; Pincus-Knackstedt y cols., 2006; Drake y cols., 2007; Ehrlich y Rainnie, 2015; Kim y cols., 2015**). Los primeros estudios demostraron que el aumento de GCs maternos durante el embarazo se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con el estrés como la hipertensión, diabetes y trastornos psicológicos (**Phillips y cols., 1998; Seckl, 2004**). Además, en modelos animales se ha demostrado que los niveles de GCs inducidos por estrés prenatal agudo o crónico son cruciales en la patogénesis y/o progresión de trastornos neuroinflamatorios y neurodegenerativos de

diversos modelos de enfermedades humanas, como la epilepsia, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, entre otras (**Smith y cols., 2008; Gardener y cols., 2009; Baier y cols., 2012; Hashemi y cols., 2013; Sierksma y cols., 2013**).

Entre las primeras respuestas al estrés se encuentra la liberación de GCs desde la corteza suprarrenal, como mediador pro-inflamatorio del SNC (**Sorrells y cols., 2009**). Después de una exposición a un factor estresante, la secreción de GCs es controlada por la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA). La rápida liberación de catecolaminas en respuesta a distintas señales (de origen vascular, sensorial o límbico) tiene como principal consecuencia la producción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo (Kovacs, 2013). La liberación de CRH estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la pituitaria, la cual induce producción de GCs, en la corteza de la glándula suprarrenal (**Belda y cols., 2015**). La acción biológica de CRH y Ucn II (urocortina II, miembro de la familia de péptidos CRH) (**Grammatopoulos, 2012**) está mediada por la unión a receptores acoplados a la proteína G, CRHR1 y CRHR2, que se expresan en los mastocitos, microglías, astrocitos y neuronas (**Stevens y cols., 2003; Wang y cols., 2007; Alysandratos y cols., 2012; Tillinger y cols., 2013**). La activación de CRHR1 en el PVN es responsable de la respuesta de huida o lucha, y en la pituitaria anterior, de la liberación de ACTH. El receptor de tipo 2 (CRHR2) sería el responsable de la respuesta adaptativa y recuperación a una situación de estrés (**de Kloet y cols., 2005; Kovacs, 2013**). En este sentido, se ha planteado que CRHR1 actúa como un neurotransmisor/neuromodulador en la propagación e integración de conductas inducidas por estresores como el miedo y la ansiedad (**Wang y cols., 2012; Kovacs, 2013**), así como el

aprendizaje y la memoria espacial (**Wang y cols., 2011**). Por otro lado, los GCs pueden activar dos tipos de receptores intracelulares; los receptores mineralocorticoides (MRs), que tienen alta afinidad y por lo tanto son ocupados a bajos niveles de GCs (**Ong y cols., 2013**), y el receptor de glucocorticoides (GR), que tiene menor afinidad, y por consiguiente requieren mayores concentraciones de GCs para ser activados; razón por la cual se ha propuesto que estarían involucrados en la respuesta de adaptación al estrés (**Drake y cols., 2007; Sze y cols., 2013**). El mecanismo de acción de estos receptores se basa en el control de la tasa de transcripción de genes blancos mediante activación o represión transcripcional (**Hubner y cols., 2015**). Los GR reprimen su propia expresión mediante la unión directa al DNA (GREs; elemento de respuesta a GCs), a través de un mecanismo de acción conocido como “cross talk transcriptional”, que involucra la interacción con factores de transcripción o la competencia con estos por un mismo cofactor, como por ejemplo la interacción con proteína activadora 1 (AP-1), la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB) o NF- κ B (**Kassel y Herrlich, 2007; Grossmann y cols., 2010**). Los factores de transcripción tales como AP-1 y NF- κ B son críticos en la regulación de la expresión de genes pro-inflamatorios (**Silverman y Sternberg, 2012**). Bajo el efecto de otro estresor, como la inmovilización (una situación en la que los niveles de GCs endógenos están elevados), se produce liberación y acumulación de mediadores pro-inflamatorios y neurotóxicos, como el óxido nítrico (NO), prostanoïdes, citocinas y la activación del NF- κ B (**Munhoz y cols., 2008**).

El estrés prenatal afecta el desarrollo de distintas áreas en el cerebro implicadas en la regulación del eje HPA, como el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala, posiblemente porque estas áreas expresan una gran cantidad de GR (**Alkadhi, 2013**). Trabajos previos en animales han demostrado que el estrés prenatal podría causar alteraciones a largo plazo en los

mecanismos de aprendizaje y memoria asociados a una disminución del volumen y del número de neuronas en el giro dentado y una atrofia dendrítica en el área CA3 del hipocampo (**Jia y cols., 2010; Baquedano y cols., 2011; Bock y cols., 2011**). Por otro lado, el estrés prenatal ha sido asociado a patologías conductuales y del estado de ánimo, como la depresión. La depresión es un síndrome en el que predominan los síntomas afectivos, de tipo cognitivo e incluso somático., por lo que podría hablarse de una afectación global de la vida social. La depresión puede llegar a hacerse crónica o recurrente, siendo el desorden de depresión mayor (MDD) la más estudiada en los últimos años por su asociación a una alta tasa de suicidios (**Arsenault-Lapierre y cols., 2004**). Evidencias actuales indican que eventos traumáticos y/o una vida estresante representan un riesgo de desarrollar MDD, incluyendo situaciones de estrés agudo y crónico (**Hammen y cols., 2009**).

1.3 Glucocorticoides y su relación con el sistema inmune en condiciones de estrés.

Un dogma clásico de la neuroendocrinología es que el eje HPA se activa como mecanismo de freno frente a una activación excesiva del sistema inmune, y que los GCs liberados son los agentes anti-inflamatorios más importantes (**Rhen y Cidlowski, 2005; Garcia-Bueno y Leza, 2008**). Sin embargo, actualmente, se ha determinado que los GCs desencadenan procesos pro-inflamatorios e incluso agravan los daños colaterales resultantes de la sobre activación del sistema inmune, que tiene lugar en ciertas neuropatologías agudas (**Asztalos, 2012; Kim y cols., 2015**). Durante las primeras fases de la respuesta al estrés se ha identificado a las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) liberadas en pocos segundos por

el sistema nervioso simpático como agentes potenciadores del sistema inmune y del proceso inflamatorio (**Garcia-Bueno y cols., 2008**), debido a que estimulan la producción de mediadores pro-inflamatorios como las citocinas, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e IL-1 β ; NF-kB y la generación de NO en situaciones de estrés (**Frank y cols., 2011**). Así mismo, las citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α) afectan las funciones monoaminérgicas centrales y activan el eje HPA (**Himmerich y cols., 2009; Diz-Chaves y cols., 2013**), actuando como una señal pro-inflamatoria autocrina/paracrina, que se refleja en el aumento de la producción de citocinas y GCs (**Koo y Duman, 2008**). En consecuencia, se produce una regulación bidireccional, donde el eje HPA ejerce influencia sobre el sistema inmune y por consiguiente sobre moléculas pro-inflamatorias. A su vez, las citocinas pro-inflamatorias influyen la liberación de hormonas capaces de modular la activación del eje HPA (**Silberstein y cols., 2009**).

Numerosos estudios sugieren que el estrés prenatal afecta la comunicación entre los sistemas inmunológico, endocrino y el SNC en los hijos durante el desarrollo que perdura hasta la vida adulta, mientras que puede promover procesos inflamatorios en la edad adulta por se (**Markham y Koenig, 2011**). Además, una exposición previa a GCs puede sensibilizar ("priming") la respuesta inmune a respuestas inflamatorias posteriores (**Frank y cols., 2012**). Es así como los GCs secretados tras la exposición a una condición de estrés producen un aumento en la activación microglial (indicador de neuroinflamación) a través de un mecanismo dependiente de GCs/GR/glutamato (**Nair y Bonneau, 2006**) y potencian el proceso neuroinflamatorio generado por la administración de por ejemplo, LPS (**Park y cols., 2015**), aumentando el grado de micro y astrogliosis, efecto que puede ser bloqueado por antagonistas de GCs (**de Pablos y cols., 2006; Munhoz y cols., 2006; Nair y Bonneau, 2006;**

Espinosa-Oliva y cols., 2011). Dado que los tipos celulares mencionados se mantienen sensibilizados durante mucho tiempo, se ha sugerido que los GCs pueden inducir cambios a largo plazo (**Town y cols., 2005; Branchi y cols., 2014**). Estudios recientes demuestran que el estrés prenatal o la liberación de GCs inducido por estrés induce una reacción astrogial persistente, que se correlaciona con una reducción de la arborización dendrítica y pérdida de sinapsis en el cerebro adulto (**Barros y cols., 2006; Diz-Chaves y cols., 2013; Kierdorf y Prinz, 2013**). De este modo, tanto microglías como astrocitos contribuirían a la persistencia de la respuesta inflamatoria y los cambios morfológicos y/o en número de estas células inducidas por estrés, como signos de un estado neuroinflamatorio alterado (**Dong y Benveniste, 2001; Block y Hong, 2005; Perry y cols., 2007; Cappellano y cols., 2013**).

1.4 El inflammasoma NLRP3 es un importante regulador de la respuesta neuroinflamatoria inducida por estrés.

El inflammasoma NLRP3 es el mejor caracterizado en macrófagos y microglías (**Busillo y cols., 2011; Frank y cols., 2014**), donde se ha demostrado que los GCs o DEX regulan positivamente tanto los niveles de mRNA como la expresión de la proteína NLRP3 (**Busillo y cols., 2011**). El inflammasoma NLRP3 está constituido por la proteína receptora NLRP3 (también conocida como NALP3 y criopirina), la proteína adaptadora ASC, proteína que contiene un dominio de reclutamiento y activación de caspasa 1 (Casp-1). La oligomerización de NLRP3-ASC resulta en el reclutamiento de la procaspasa-1 al complejo (**Jha y cols., 2010**), lo cual promueve el corte de la misma en un mecanismo auto catalítico que permite la

generación del heterodímero activo de Casp-1 (**Segovia y cols., 2012**), el cual luego regula el corte y la maduración de interleucinas (**Silverman y cols., 2009; Zhang y cols., 2015**). El procesamiento proteolítico gatillado por Casp-1 induce muerte celular programada de tipo inflamatoria conocida como piroptosis (**Lamkanfi, 2011**). Este tipo de muerte programada se asocia con una respuesta durante la inflamación y tiene características de muerte tanto apoptótica como necrótica, como la fragmentación del DNA, liberación de citocromo C y la activación de la enzima caspasa-3, ruptura de la membrana plasmática, además de edema celular, formación de poros y la lisis celular así como la liberación de Casp-1 (**Miao y cols., 2011; Latz y cols., 2013**). NLRP3 en reposo se encuentra localizado en el citosol (**Sakhon y cols., 2013**) e inactivo unido a dos proteínas, SGT1 (supresora del alelo G2 del genSkp1 homólogo de la proteína p19 del ciclo celular) y la HSP90 (proteína de shock térmico 90) en una conformación autoinhibitoria (**Jin y Flavell, 2010**). La activación del inflamasoma se encuentra dirigida por dos señales, una primera señal o pre-estimuladora mediada por PRRs a través de los PAMPs o las señales de peligro o de estrés llamadas DAMPs. La inducción de los PRRs resulta en la activación de la vía NF- κ B que promueve la expresión de la pro-IL-1 β y de los genes asociados a las proteínas del inflamasoma (**Hung y cols., 2013; Sutterwala y cols., 2014**). La segunda señal o estímulo sería conferida por señales de daño como ATP (**Gombault y cols., 2012; Murakami y cols., 2012; Riteau y cols., 2012**) y glutamato a través del receptor de NMDA, HMGB1 (**Weber y cols., 2015; Zou y T. Crews, 2015**). En astrocitos, la activación del inflamasoma inducida por ATP exógeno gatilla un incremento en la producción de IL-1 β (**Silverman y cols., 2009**). También, se ha propuesto que los HCs Panx1 y P2X₇R desempeñan un papel relevante en la activación del inflamasoma inducida por ATP, que puede ser inhibida por probenecid, un inhibidor no selectivo y de muy baja afinidad

de los HCs Panx1 y BBG, un antagonista de P2X₇R, que también inhibe HCs Panx1 (Minkiewicz y cols., 2013).

Recientemente, se propuso que la neuroinflamación inducida por estrés podría estar mediada por los TLRs (Caso y cols., 2008; Garate y cols., 2013; Mouihate y Mehdawi, 2015). El receptor de tipo Toll 4 (TLR4) se expresa en mastocitos, microglia, astrocitos y oligodendrocitos (Aguirre y cols., 2013), el cual responde predominante al lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas (Krishnan, 2015) a través de los co-receptores, la proteína-2 de diferenciación mieloide (MD-2) y la proteína anclada a glicofosfatidilinositol (CD14) (Park y cols., 2009; Zanoni y cols., 2011). Por otro lado, se ha propuesto que el estrés induce la activación de TLR4, sensibilizando con ello al inflamasoma NLRP3 (Singhal y cols., 2014). La activación de TLR4 conduce a la activación del factor de transcripción NF- κ B, que regula la expresión de citocinas pro-inflamatorias, incluyendo la IL-1 β , la IL-18 y varias otras proteínas pro-inflamatorias tales como P2X₇R, HCs Panx1 e iNOS (Pelegriin y Surprenant, 2009; Frank y cols., 2012; Aguirre y cols., 2013; Garate y cols., 2013). La activación de P2X₇R por ATP extracelular conduce al influjo de Ca²⁺, que activa HCs Panx1, que a su vez permiten la liberación de ATP al medio extracelular y consecuentemente la activación de P2X₇R, generando un sistema de retroalimentación positiva (Baroja-Mazo y cols., 2013), que en consecuencia mantiene la respuesta inflamatoria (Pelegriin y Surprenant, 2009; Dahl y Keane, 2012). Bajo el mismo punto de vista, hemos demostrado recientemente que el estrés por restricción aumenta la actividad de HCs Cx43 y HCs Panx1 en diferentes tipos celulares del cerebro, la cual es mediada por los receptores NMDA/P2X₇ (Figura 1) (Orellana y cols., 2015). Enfatizando este punto, anteriormente se había propuesto que el aumento de la concentración de Ca²⁺ citoplasmático promueve el ensamblaje de los

componentes del inflamasoma (**Lee y cols., 2012**); por tanto, el incremento de Ca^{2+} sería una señal intracelular derivada de la actividad de los receptores NMDA/P2X₇ que podría mediar la activación y/o regulación del inflamasoma.

1.5 Expresión de inflamasoma en células gliales.

Las microglías son los macrófagos residentes del cerebro y los astrocitos, son las células más abundantes del cerebro, las cuales mantienen la homeostasis del SNC y proporcionan soporte neuronal importante (**Gustin y cols., 2015**). Estos tipos celulares expresan el complejo de inflamasoma NLRP3 y NLRP2, respectivamente, por lo que secretan IL-1 β y son considerados claves en el desarrollo de daño cerebral perinatal (**Minkiewicz y cols., 2013; Mallard y cols., 2014**). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que cultivos de astrocitos de rata y ratón libres de microglías no secretan IL-1 β o IL-18 (**Facci y cols., 2014; Gustin y cols., 2015**) y se ha propuesto que la carencia de la proteína adaptadora ASC en astrocitos podría explicar la diferencia de estos hallazgos (**Gustin y cols., 2015**). Por ejemplo, NLRP1 y NLRC4, miembros de la familia NLRs, se ensamblan como inflamasoma en forma independiente de la proteína ASC y pueden unirse directamente a la Casp-1 promoviendo el procesamiento y la secreción de IL-18 e induciendo piroptosis (**Gustin y cols., 2015**). Si bien los oligodendrocitos, un tipo de macroglías del SNC, tienen un rol importante en la neuroprotección, comunicación interneuronal y la mantención de la mielina, la cual es crucial para la conducción del impulso nervioso (**Jakovcevski y cols., 2009; Traka y cols., 2016**), se desconoce su participación en los procesos inflamatorios y si expresan inflamasomas.

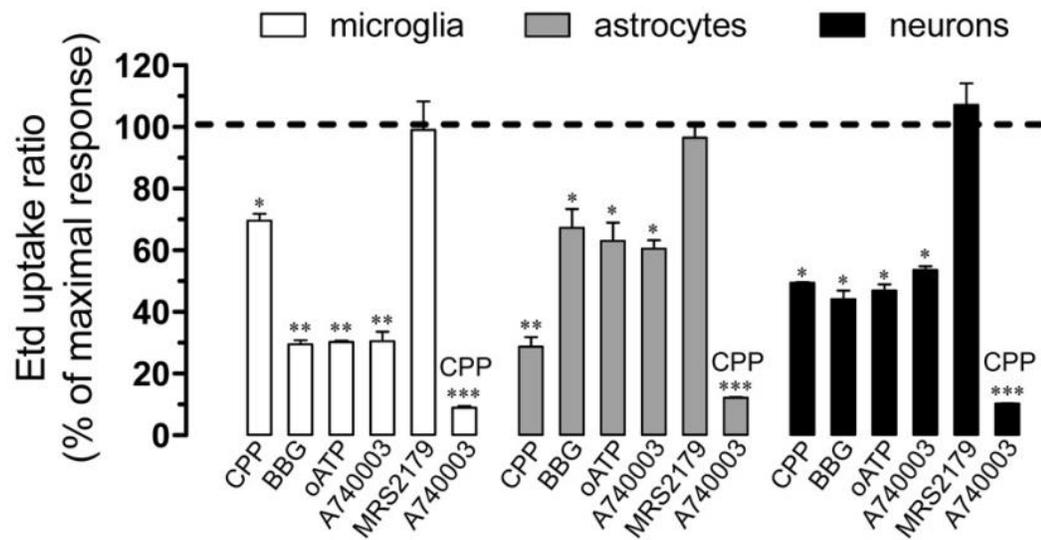


Figura 1. La actividad de HCs Cx43 y Panx1 inducida por estrés crónico es mediada por NMDA/P2X₇R. Promedio de datos normalizados a la razón de la máxima captación de Etd⁺ (línea discontinua) obtenida después del estrés por inmovilización crónico en microglías (barras blancas), astrocitos (barras grises) y neuronas (barras negras) tratados con los siguientes bloqueadores durante el ensayo de captación de Etd: CPP (20 μM); BBG (10 μM), oATP (200 μM), A740003 (10 μM), MRS2179 (10 μM) o CPP (20 μM) más A740003 (10 μM). CPP: bloqueador del receptor NMDA, BBG, oATP, A740003: bloqueadores del receptor P2X₇, MRS2179: bloqueador del receptor P2Y₁. * p<0,05, ** p<0,01; *** p<0,001, efecto de cada bloqueador en comparación con el efecto respectivo inducido por estrés crónico. Datos promediados se obtuvieron a partir de cuatro experimentos independientes (Orellana y cols., 2015).

1.6 Expresión y regulación de Cxs y Panx1 en células gliales.

La intercomunicación celular en el SNC está mediada en parte por canales presentes en la membrana plasmática denominados uniones en hendidura (“Gap junctions”: GJs) (**Herve y cols., 2012**), que comunican el citoplasma de dos células adyacentes. Cada uno de estos canales está compuesto de dos conexones o HCs, y cada uno de ellos es aportado por una de las células en contacto. Las GJs constituyen una vía de intercambio difusional de iones y moléculas pequeñas entre células contiguas (**Giaume y cols., 2013**). Cada conexón lo constituyen seis proteínas integrales de membrana denominadas Cxs y Panxs, que comunican directamente el citoplasma con el espacio extracelular (**Orellana y cols., 2013; Cheung y cols., 2014**). Consecuentemente, permiten la comunicación intercelular a través de un proceso autocrino y/o paracrino, ya que permiten la liberación de sustancias neuroactivas, denominadas gliotransmisores (**Giaume y cols., 2013; Orellana y cols., 2013; Cheung y cols., 2014**). Debido a que los HCs poseen un poro poco selectivo y por tanto permeable a numerosas moléculas de bajo peso molecular, su apertura es comúnmente considerada como perjudicial, ya que las células perderían su integridad citoplasmática y provocarían daño neurotóxico que puede ser inducido por los factores liberados (gliotransmisores, ATP y glutamato) (**Giaume y cols., 2013; Montero y Orellana, 2015**). La mayoría de las evidencias indican que las Panxs endógenas, en mamíferos forman sólo HCs, y que las Cxs forman tanto GJs, como HCs (**Orellana y cols., 2009a**). La apertura de los HCs Cxs es regulada por varios mecanismos, incluyendo activación por voltaje positivos, defosforilación y bajas concentración extracelular de Ca^{2+} (**Herve y cols., 2012**).

Se han identificado 21 genes de Cxs en humanos y 20 genes en ratón, de las cuales la Cx26, Cx29, Cx30, Cx32, Cx33, Cx37, Cx36, Cx40, Cx43, Cx45 y Cx47 se expresan en el cerebro. Por otro lado, las Panxs se expresan en todos los tipos celulares del SNC e incluyen solo 3 subtipos denominados Panxs 1, 2 y 3 (**Bruzzone y cols., 2003; Baranova y cols., 2004**). La Panx1 presenta una amplia expresión en el cerebro, retina y tejidos no neuronales (corteza cerebral, cerebelo y ojo). Se ha determinado que en la corteza cerebral e hipocampo, la Panx1 se localiza en la membrana postsináptica (**Zoidl y cols., 2008**). Los HCs Cxs y HCs Panx1 se expresan en diferentes tipos celulares, incluyendo las microglías (Cx43, Cx32, y Panx1), las macroglías: astrocitos (Cx30, Cx43 y Panx1) y oligodendrocitos (Cx29, Cx32, Cx47 y Panx1), y en neuronas (Cx36 y Panx1) (**Aguirre y cols., 2013; Cheung y cols., 2014; Freitas-Andrade y Naus, 2015**).

Los HCs Panx1 han sido implicados en la fisiopatología de varias enfermedades debido a que participan en un circuito de retroalimentación positiva en respuestas a procesos inflamatorios agudos o crónicos (**Baroja-Mazo y cols., 2013; Mahi y cols., 2015**). Los HCs Panx1 podrían servir como vías de intercambio de iones y moléculas incluyendo metabolitos y señales intercelulares que modifican el micro-ambiente celular (**Makarenkova y Shestopalov, 2014**). En este sentido, se ha propuesto que la apertura de los HCs Cxs inducida por inflamación es clave en la regulación de eventos que inician un círculo vicioso de excesiva liberación de ATP, el cual se relaciona con un deterioro de astrocitos y una activación persistente de microglías, que podrían inducir daño neuronal, axonal y muerte de oligodendrocitos (**Figura 2**) (**Aguirre y cols., 2013; Mallard y cols., 2014**).

Los oligodendrocitos (O) exhiben una variedad de interacciones mediadas por GJs con astrocitos (A) (O:A, Cx32/Cx30 y Cx47/Cx43) (**Magnotti y cols., 2011; Wasseff y Scherer,**

2014), entre oligodendrocitos cercanos (O:O, Cx32/Cx32 y Cx47/Cx47) (Maglione y cols., 2010; Wasseff y Scherer, 2011) y entre las capas de mielina (Cx32/Cx32), denominadas GJs reflexivos (Magnotti y cols., 2011). En conjunto, esta red facilita la remoción del medio extracelular y dilución dentro del sincicio del K^+ y glutamato liberado durante la actividad neuronal, lo que se conoce como tamponamiento espacial (Kamasawa y cols., 2005).

En el SNC, la Cx32 se localiza en las regiones paranodales donde es más probable que forme canales reflexivos (Cx32/Cx32). Sin embargo, no se sabe si la Cx32 forma canales reflexivos en otras zonas de la fibra mielinizada, como es el caso de la mielina periférica (Meier y cols., 2004). Los niveles de expresión de las Cx29 y Cx32 aumentan durante las primeras semanas postnatales, concomitante con el proceso de mielinización en el cerebro y se mantiene altamente expresada en la adultez (Parenti y cols., 2010). La Cx29 se localiza en la membrana axonal de la vaina de mielina, pero no forma GJs (Kamasawa y cols., 2005; Li y cols., 2014). La Cx47 se expresa en oligodendrocitos durante el comienzo del desarrollo embrionario, lo cual sugiere un rol clave en la diferenciación de precursores de oligodendrocitos y la síntesis de mielina. Además, la expresión de Cx47 es dinámica conforme a cambios de demielinización y remielinización, procesos de pérdida de mielina y nueva formación de mielina, respectivamente (Parenti y cols., 2010).

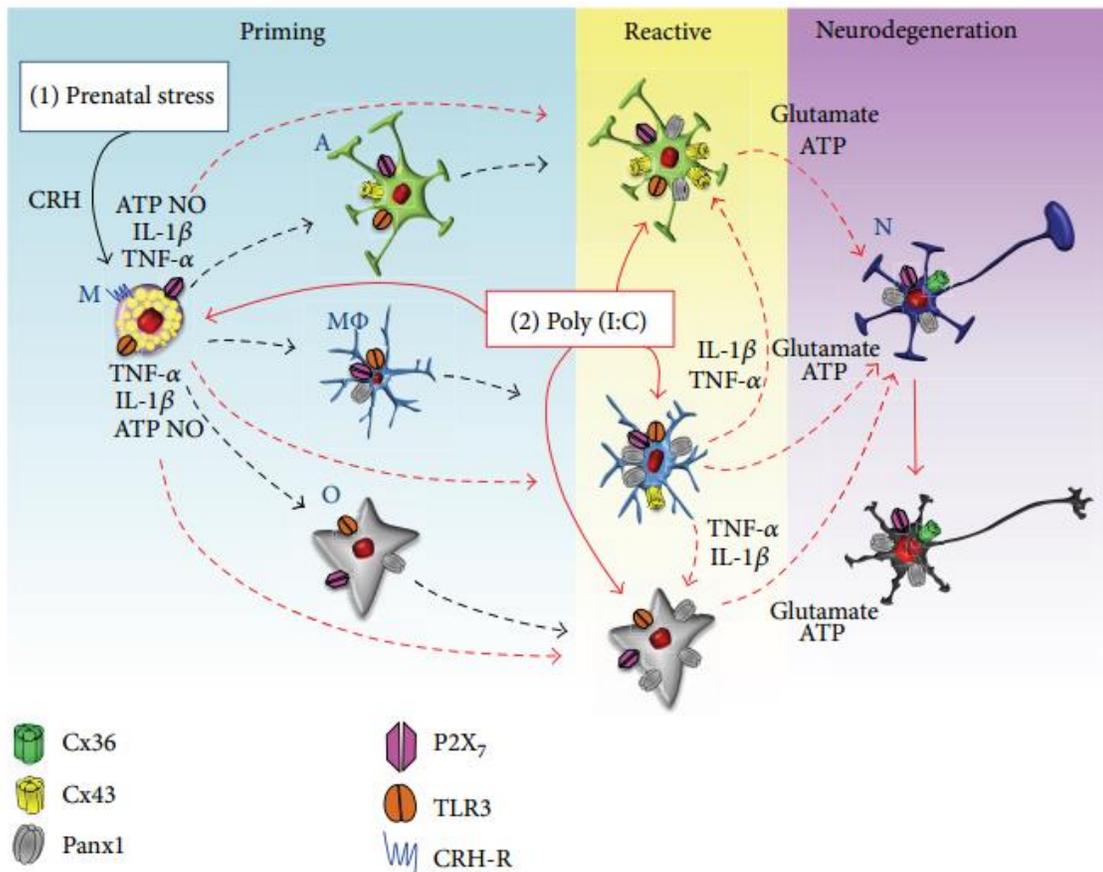


Figura 2. Modelo de la participación de mastocitos y microglías en la respuesta neuroinflamatoria y potenciación de sus respuestas al estrés. El estrés incrementa los niveles de CRH y GCs los cuales son críticos en la degranulación de mastocitos inducidos por estrés y la potenciación de la respuesta inflamatoria glial (sensibilización). La actividad de HCs en mastocitos (M) y microglías (M Φ) incrementa la reactividad de astrocitos (A) y oligodendrocitos (O). Microglías y astrocitos liberan ATP y glutamato que inducen neurodegeneración mediante la activación de los HCs Panx1 y P2X₇R en neuronas (N) (Aguirre y cols., 2013).

1.7 Deterioro de oligodendrocitos y pérdida de mielina en respuesta a procesos neuroinflamatorios.

Durante la isquemia (condición pro-inflamatoria que induce cambios similares a los producidos por citocinas pro-inflamatorias), cultivos de oligodendrocitos expuestos a privación de oxígeno y glucosa muestran una sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, que es parcialmente mediado por P2X₇R (**Domercq y cols., 2010**). En efecto, la liberación de ATP bajo la condición isquémica sería a través de la apertura de HCs Panxs. Consecuentemente, se ha propuesto que la isquemia induce despolarización mitocondrial, así como estrés oxidativo provocando la muerte celular, lo cual es parcialmente prevenido por antagonistas de los P2X₇R y bloqueadores de HCs Panx1 (**Domercq y cols., 2010**).

Por otro lado, la administración prenatal del GC sintético dexametasona (DEX), induce neuroinflamación, disminución de la maduración glial y síntesis de mielina, lo que resulta en la muerte neuronal (**Huang y cols., 2001; Tauber y cols., 2006; Antonow-Schlorke y cols., 2009; Sze y cols., 2013; Noorlander y cols., 2014**). Estudios recientes en animales han relacionado los altos niveles de ansiedad y neofobia en las crías de madres estresadas con una reducción de la mielina y expresión de astrocitos en la región CA1 del hipocampo (**Bennett y cols., 2015**). No obstante, la contribución de los oligodendrocitos en la respuesta inflamatoria no ha sido estudiada. Por lo tanto, se planteó investigar si los oligodendrocitos participan en la red neuroinflamatoria inducida por estrés prenatal mediante la activación de inflammasoma. En el presente trabajo de tesis, se evaluó el efecto de la exposición prenatal a DEX como principal mediador pro-inflamatorio y la expresión de inflammasoma en oligodendrocitos de las crías. Se determinó que el inflammasoma se expresa en

oligodendrocitos y sería activado vía CRHR1 presente en los mastocitos y los HCs Panx1 y Cx43 presentes en microglia y astrocitos mediante la liberación de citocinas pro-inflamatorias. Se observó que la activación de HCs persiste durante al menos 8 semanas después del nacimiento. En consecuencia, todos los cambios mencionados anteriormente podrían ser factores relevantes que alteran la neurogénesis perinatal.

1.8 Las Cxs gliales son claves en el desarrollo de la epilepsia mediada por procesos neuroinflamatorios inducidos por estrés prenatal.

Publicaciones recientes sugieren que las Cx43 y Cx32 presentes en células gliales como astrocitos y oligodendrocitos, respectivamente, tienen un papel crucial en las primeras etapas del desarrollo de una crisis epiléptica (**Laura y cols., 2015**). Por ejemplo, estudios en ratones deficientes de la Cx32 revelan defectos en la mielinización, hiperexcitabilidad neuronal y una reducción de las ondas de calcio (**Sutor y cols., 2000**). Las células gliales pueden liberar moléculas neuroactivas por activación del inflamasoma que promueven un incremento de la excitabilidad neuronal y disminución del umbral convulsivo (**Edye, 2014; Meng y cols., 2014**). En adición, se ha descrito que la neuroinflamación puede ser inducida por estrés o la exposición excesiva a GCs en las primeras etapas del desarrollo fetal, condicionando al individuo a desarrollar epilepsia frente a una situación de estrés, infección o trauma en edades posteriores (**Velisek, 2011; van Campen y cols., 2014**).

2 Epilepsia: mecanismo neuroinflamatorio inducido por estrés

2.1 La epilepsia, un trastorno de salud mental.

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos crónicos más comunes en el mundo, que se caracteriza por convulsiones recurrentes espontáneas que se generan por una actividad anormal sincrónica de las neuronas (**Scharfman, 2007; Vezzani y cols., 2011a; Staley, 2015**). El desarrollo de este trastorno (epileptogénesis) implica procesos tales como el aumento de la excitabilidad de la red neuronal (por aumento de los niveles y la sensibilidad al glutamato y una reducción de la inhibición GABAérgica), interrupción de la barrera hematoencefálica (BBB), gliosis, pérdida neuronal y surgimiento de fibra musgosas en el hipocampo (**Scharfman, 2007; Foresti y cols., 2011; Vezzani y cols., 2013**). La epilepsia del lóbulo temporal (TLE) es la más frecuente en el adulto (**Beletsky y Mirsattari, 2012**). Más de un 75% de ellas evolucionan a la refractariedad y producen deterioro progresivo psicológico, neurobiológico y social (**Kellinghaus y cols., 2008**). La epilepsia refractaria o resistente a fármacos, hace referencia a los pacientes que no responden al tratamiento con uno o dos fármacos (monoterapia o terapia combinada) y continúan con crisis pese a dosis máximas toleradas (**Kwan y cols., 2010**). Los pacientes con epilepsia refractaria habitualmente reciben múltiples drogas antiepilépticas (AEDs) que, en combinación, pueden provocar efectos adversos como sedación o alteraciones del comportamiento (**Laxer y cols., 2014**). La epilepsia refractaria continúa siendo el mayor problema clínico, con una afectación de más del 35% de los pacientes (**Boison, 2007**). El tratamiento quirúrgico aísla o elimina el o las regiones del cerebro que están afectadas; sin embargo pueden presentar alteraciones funcionales postoperatorias (por ejemplo, disminución de la memoria y de deterioro del campo visual); así

como infecciones, hemorragias y accidentes cerebrovasculares (**Kuzniecky y Devinsky, 2007; Laxer y cols., 2014**). Más aún, de esta población de pacientes, se podría esperar una tasa de remisión de las crisis convulsivas postoperatorias del 70% al 90% (**Baldauf y cols., 2006**).

2.2 Participación de mediadores inflamatorios en la epilepsia.

Actualmente, evidencia clínica y experimental sugiere una posible conexión entre la epilepsia y la neuroinflamación, que se caracteriza por la acumulación, la activación y proliferación de microglías y astrocitos (**Jabs y cols., 2008; Wetherington y cols., 2008; Najjar y cols., 2011; Devinsky y cols., 2013**). En adición, recientemente se ha sugerido que la densidad celular de oligodendrocitos presentes en la sustancia blanca del hipocampo y en el lóbulo temporal incrementa en pacientes con TLE (**Stefanits y cols., 2012**). La iniciación de una respuesta inflamatoria podría ser una consecuencia, así como una causa de la epilepsia (**Vezzani y cols., 2011a; Dupuis y Auvin, 2015**). Una crisis epiléptica puede provocar una respuesta inflamatoria, incrementando la entrada de Ca^{2+} en las neuronas, aumentando la concentración de glutamato y K^+ extracelular, disminución en la captación de K^+ y glutamato por las células gliales e inducción de una mayor respuesta inflamatoria por medio del deterioro de la BBB. Esta respuesta inflamatoria promovería hiperexcitabilidad neuronal y disminuiría el umbral convulsivo, conduciendo al desarrollo de epilepsia refractaria. De este modo, las crisis epilépticas y los mediadores inflamatorios pueden formar un asa de retroalimentación positiva (**Shimada y cols., 2014**). Cabe mencionar que tanto el glutamato como el ATP liberado por las neuronas pueden activar microglías que contribuyen con mayor liberación de ATP y glutamato que conllevan a la neurodegeneración (**Loane y Byrnes, 2010**).

Las crisis epilépticas en sí pueden inducir inflamación aumentando la liberación de mediadores inflamatorios claves como la IL-1 β , IL-6 y TNF- α . El estudio de tejido cerebral de pacientes con epilepsias refractarias, incluyendo la TLE y epilepsia cortical muestran un aumento en la expresión de IL-1 β y el receptor IL-1RI en glías y neuronas (**Aronica y Crino, 2011**). Después de las convulsiones se produce un rápido aumento del IL-1RI en las neuronas y más tarde en los astrocitos, evidenciando la acción autocrina y paracrina de IL-1 β que actúa como un mediador soluble de la red glioneuronal en el tejido epileptógeno (**Hubbard y cols., 2013**).

Estudios recientes, sugieren que la activación del inflamasoma media los daños neurodegenerativos inducidos por las crisis epilépticas en humanos y en el modelo animal de TLE (**Figura 3**), por lo cual se ha planteado que la inhibición de NLRP1 (**Tan y cols., 2015**) o NLRP3 (**Meng y cols., 2014**) con ARN silenciador (siRNA) o la neutralización de la IL-1 β , mediante el uso de péptidos sintéticos o anticuerpos dirigidos contra componentes del inflamasoma (**Coll y cols., 2015; Youm y cols., 2015**), representan una estrategia prometedora para el tratamiento de TLE. Sin embargo, dichas aproximaciones experimentales no han sido implementadas para su uso en humanos, posiblemente porque su uso crónico podría generar una respuesta alérgica o de rechazo.

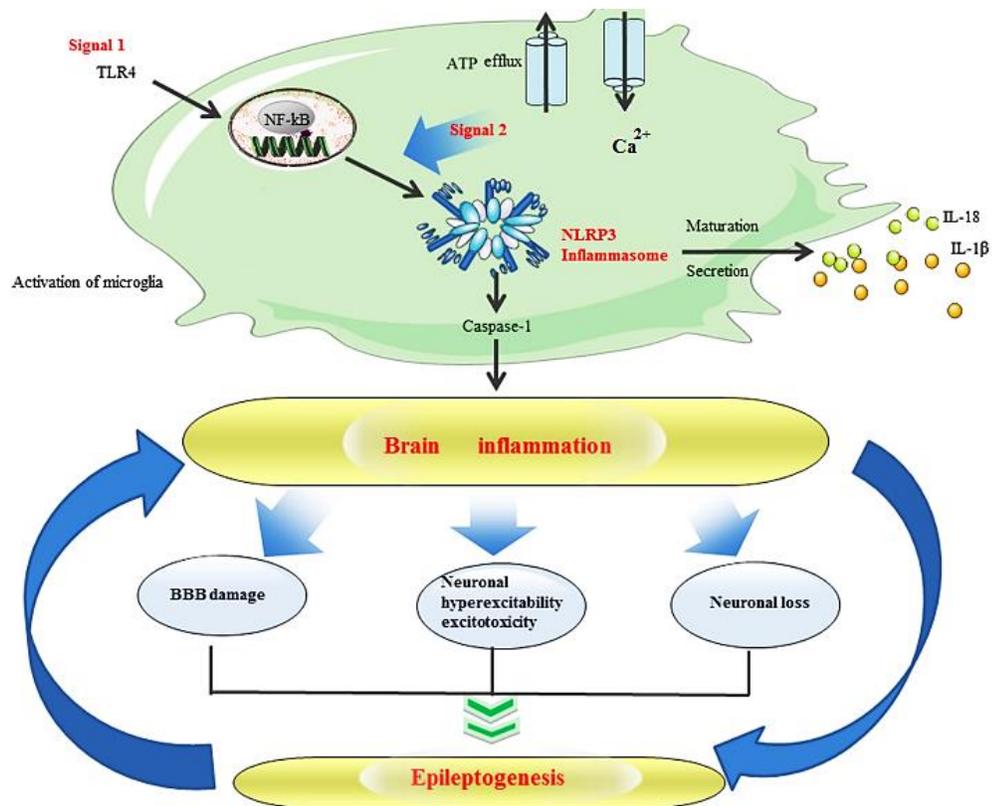


Figura 3. La inflamación puede ser causa o consecuencia de la epilepsia. La activación de la inflammasoma NLRP3 requiere típicamente una vía de señalización bimodal. Una primera señal (Signal 1) dependiente del receptor de tipo Toll (TLR) que activa la transcripción de NLRP3 dependiente de NF-κB y las proformas de las citocinas pro-inflamatorias (IL-1β y IL-18). La segunda señal (Signal 2) sería conferida por señales de daño como ATP. La oligomerización del inflammasoma NLRP3 es seguida por el reclutamiento de la proteína adaptadora ASC y la pro-forma de la Casp-1, que conduce a su activación. Casp-1 activada a su vez cataliza la maduración y secreción de las IL-1β e IL-18. Este evento puede conducir a cambios en el parénquima cerebral, tales como aumento en la permeabilidad de la barrera hematocefálica (BBB), la hiperexcitabilidad neuronal y excitotoxicidad, así como el daño neuronal que conlleva a una reducción del umbral convulsivo y desencadenar epileptogénesis. El desarrollo de epilepsia puede a su vez promover aún más inflamación a través de la producción de citocinas pro-inflamatorias activando así un círculo vicioso que a su vez fomenta la hiperexcitabilidad aberrante (Meng y cols., 2014; modificado).

2.3 Contribución de los HCs gliales en la epilepsia inducida por estrés prenatal.

Estudios epidemiológicos han demostrado que eventos estresantes en la vida temprana pueden ser un factor de riesgo en la aparición de crisis convulsivas y epileptogénesis en niños y adultos (Swinkels y cols., 1998; Bosnjak y cols., 2002; van Campen y cols., 2012). Se ha descrito que el estrés en etapas tempranas de la vida, incluyendo prenatal, postnatal y adolescencia, pueden incrementar permanentemente la susceptibilidad a padecer epilepsia mediante un incremento de las hormonas del estrés, CRH y GCs (Kumar y cols., 2007; Velisek, 2011), alteración del eje HPA (Joels, 2009), neuroinflamación (Vezzani y cols., 2013), alteración en la activación de receptores de membrana y como GABA (Reddy, 2013), NMDA (Velisek y cols., 2007) y AMPA (Rogawski, 2013). Múltiples estudios han determinado los niveles de las hormonas del estrés en pacientes con epilepsia, directamente después de una crisis convulsiva, encontrando un aumento constante del cortisol y ACTH (van Campen y cols., 2014). Por su parte, los altos niveles de cortisol pueden inducir la hiperexcitabilidad e hipersincronía neuronal (Hashemi y cols., 2013).

La actividad neuronal hipersincrónica es promovida por las GJs entre neuronas (Mylvaganam y cols., 2014). Sin embargo, estudios recientes plantean la participación de células gliales, especialmente microglia y astrocitos en la inducción de hiperexcitabilidad neuronal (Devinsky y cols., 2013). Interesantemente, los HCs Cxs y Panxs han sido propuestos como factores relevantes en la conducción sincrónica de la actividad epileptógena (Mylvaganam y cols., 2014). La liberación de ATP y glutamato desde microglia reactiva a través HCs (Tynan y cols., 2010; Saez y cols., 2013), induce la liberación de citocinas pro-inflamatorias, que median de forma autocrina y paracrina la activación de los HCs en

microglías y astrocitos (**Orellana y cols., 2011a**). Los astrocitos reactivos también pueden ser promotores de la respuesta inflamatoria luego de su activación, liberando por su parte, neurotransmisores que median la alteración de la transmisión sináptica y la plasticidad en el hipocampo (**Huang, 2014; Orellana y Stehberg, 2014; Orellana y cols., 2015**). Mediante el uso de ratones deficientes de Panx1 se ha propuesto que la activación de los HCs Panx1 contribuye en la hiperactividad neuronal durante el episodio epileptogénico (**Santiago y cols., 2011**). Sin embargo, no se ha estudiado la posible contribución de los HCs en células gliales durante una convulsión epiléptica.

2.4 Estrategias terapéuticas para la epilepsia.

A pesar de los recientes avances en el desarrollo de AEDs, se conocen pocas terapias que atacan el proceso subyacente a la enfermedad. Los AEDs actuales se han focalizado de forma clásica en combatir las crisis epilépticas en las terminaciones postsinápticas, actuando especialmente sobre los canales del ion sodio involucrados en la conducción nerviosa de impulsos eléctricos y en la modulación de los sistemas de neurotransmisores (**Catterall, 2014**). No obstante, y a pesar de lograr un tratamiento óptimo con los AEDs actualmente disponibles, el desarrollo de la tolerancia y los marcados efectos colaterales continúan siendo problemas importantes. De acuerdo a lo descrito en el estudio del estado del arte (CL 1556-2014) se indica que a pesar de que se conocen numerosos moduladores de Cxs y varias líneas de investigación, sugieren que su uso puede tener utilidad terapéutica en el tratamiento de la epilepsia, arritmias cardíacas, cáncer, accidente cerebrovascular u otras condiciones (**Spray y cols., 2002**). No obstante, todos estos bloqueadores son inespecíficos, afectando la actividad

no solo de los HCs, sino también de GJs (**Chen y cols., 2013**). Debido a lo anterior, los compuestos existentes actualmente presentan baja eficacia y mecanismos de acción inespecíficos o secundarios a la acción farmacológica en otros blancos terapéuticos que modifican la actividad de los HCs Cxs y son por lo tanto, responsables de efectos secundarios que no permiten usarlos en forma crónica ni en dosis superiores para controlar efectivamente las patologías de interés (**Mylvaganam y cols., 2014**). En base a lo anteriormente descrito, en este trabajo de tesis se plantea que el aumento de la actividad neuronal produce una alta liberación de neurotransmisores y de iones potasio que activan HCs Cxs gliales (micro- y macro-glias), las que inician un estado inflamatorio, que se perpetúa favoreciendo la recurrencia del aumento de actividad neuronal. Así, evaluamos el efecto de un inhibidor selectivo para HCs Cxs en la reversión y/o prevención del estado epiléptico en un modelo agudo inducido por pentylenetetrazol (PTZ).

En el presente trabajo se demostró que el inhibidor selectivo D4, inhibe completamente la actividad de HCs gliales inducida PTZ. Además, los animales pre-tratados con D4 mostraron sólo un breve período de convulsiones ~7 min después de la administración de PTZ y, a continuación se comportaron como animales controles y mostraron 100% de supervivencia. Por lo tanto, se proponen a los HCs Cxs gliales como nuevos blancos terapéuticos anticonvulsionantes.

HIPÓTESIS

“Los oligodendrocitos expresan el inflamasoma NLRP3 que se activa con la exposición prenatal a glucocorticoides, y que a su vez, como en la epilepsia inducida por PTZ, promueven la activación de hemicanales y el receptor purinérgico P2X₇R en células cerebrales”.

OBJETIVOS

1. Evaluar si la exposición prenatal a DEX induce activación del inflamasoma NLRP3 y aumento de actividad de los HCs en oligodendrocitos de hipocampo.

1.1 Determinar si los oligodendrocitos de hipocampo expresan las proteínas del inflamasoma NLRP3 y si la exposición prenatal a DEX induce activación del inflamasoma en los neonatos.

1.2 Determinar si la exposición prenatal a DEX incrementa la actividad de los HCs formados por Cxs y/o Panx1 en oligodendrocitos de hipocampo en neonatos.

1.3 Determinar si el aumento de actividad de los HCs en oligodendrocitos de crías de madres expuestas crónicamente a DEX se mantiene hasta edad adulta y si es revertido por los cuidados de una nodriza control.

2. Determinar si la actividad de los HCs en oligodendrocitos de crías de madres expuestas a DEX crónico ocurre por la activación de mastocitos, microglías o astrocitos.

2.1 Determinar si DEX o Ucn II activan HCs en oligodendrocitos de rebanadas de hipocampo en neonatos.

2.2 Determinar el patrón temporal de la activación de los HCs inducida por DEX en los distintos tipos celulares.

2.3 Evaluar si $\text{TNF-}\alpha$ o $\text{IL-1}\beta$ afectan la actividad de los HCs en oligodendrocitos en cultivo.

2.4 Determinar si la condición inflamatoria de los oligodendrocitos se mantienen en condiciones *in vitro*.

2.5 Evaluar si microglías o astrocitos de crías de madres expuestas a DEX crónico liberan factores solubles que modifiquen los niveles de mRNA de los mediadores inflamatorios en oligodendrocitos.

3 Evaluar la participación de los HCs Cxs de células cerebrales en la epilepsia inducida por PTZ.

3.1 Determinar el patrón temporal de la activación de los HCs inducida por PTZ en las células gliales y neuronas.

3.2 Evaluar si el bloqueo de P2X₇R previene las crisis epilépticas y previene el efecto de PTZ sobre los HCs en las células gliales y neuronas.

3.3 Evaluar si el bloqueo de los HCs Cxs previene las crisis epilépticas y previene el efecto de PTZ en las células gliales y neuronas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Materiales

LaCl₃ (La³⁺), A740003, minociclina, antalarmina, urocortina II, bromuro de etidio y PTZ fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los péptidos miméticos Gap26 (VCYDKSFPISHVR) y ¹⁰panx1 (WRQAAFVDSY) fueron adquiridos de SBSBIO (Beijín, China). Dexametasona fue obtenida de VEDCO (USA). DAPI-Fluoromount-G fue obtenido de Electron Microscopy Sciences (St Joseph, MO, USA). El anticuerpo policlonal anti-Cx29 fue obtenido de Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). Los siguientes anticuerpos fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, MA, USA): policlonal anti-Cx32, policlonal anti-PLP, policlonal anti-mielina oligodendrocito, monoclonal anti-caspasa-1, policlonal anti-CIAS1/NALP3, policlonal anti-IL-1 β , policlonal anti-P2X₇R y monoclonal anti-NG2. El anticuerpo monoclonal anti-Cx47 fue obtenido de Invitrogen (Camarillo, CA, USA). El anticuerpo policlonal anti-Panx1 fue obtenido de Diatheva (Fano, Italia). El anticuerpo monoclonal anti-ASC fue obtenido de Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA). El anticuerpo monoclonal anti-TNF- α fue obtenido de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). El anticuerpo policlonal anti-iNOS fue obtenido de Novus Biologicals (Littleton, CO, USA). El anticuerpo monoclonal anti-NeuN fue obtenido de Millipore Bioscience Research Reagents (Temecula, CA, USA). El anticuerpo monoclonal anti-GFAP fue obtenido de Abbiotec (San Diego, CA, USA). El anticuerpo monoclonal anti-CD117 y anti-CD11b fueron obtenidos de eBioscience (San Diego, CA, USA). El anticuerpo policlonal anti-Iba1, de Wako Chemical

(Richmond, VA, USA). El suero normal de burro y los anticuerpo secundarios hechos en burro: anti-ratón IgG conjugado a Alexa Fluor 488, anti-conejo IgG conjugado a Alexa Fluor 488, anti-cabra IgG conjugado a Cy2, anti-ratón IgG conjugado a Cy3, anti-conejo IgG conjugado a Cy3, anti-cabra IgG conjugado a TRITC y anti-pollo IgG conjugado a Cy3 fueron obtenidos de Jackson ImmunoResearch Inc. (Indianápolis, IN, USA).

Métodos

2.1 Animales

Ratones adultos (6 a 8 semanas de edad y ~22 g) C57BL/6 fueron obtenidos del vivero central de la Pontificia Universidad Católica de Chile, mantenidos bajo condiciones controladas (24°C, ciclos de 12 h de luz/oscuridad y luz desde las 6 a.m.) con comida y agua *ad libitum*. Para las cruzas, dos hembras fueron enjauladas con un macho y la preñez fue confirmada por la presencia del tapón seminal el cual fue registrado como el día gestacional (GD) 1. Se tomó especial cuidado para minimizar el sufrimiento y para reducir el número de animales usados al mínimo requerido para los análisis estadísticos. Los estudios se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos aprobados por el comité de bioética de la Pontificia Universidad Católica de Chile (CBB-124/2013).

2.2 Tratamiento con glucocorticoides

Las ratonas preñados fueron tratados los últimos 8 días de gestación (que equivalen al último tercio de la preñez) y el día 18 de gestación con DEX (0,5 mg/kg/día) por vía intraperitoneal. El grupo control fue tratado con solución salina. Al día postnatal (P) 2 la camada completa fue retirada de su jaula y transferida a un cuarto adyacente donde fueron eutanasiados por decapitación y su sangre fue colectada en tubos heparinizados y centrifugada a 10,000 x g por 20 min. El plasma fue colectado y guardado a -80°C.

2.3 Modelo de crianza cruzada

Las hembras controles y tratadas con DEX fueron ubicadas en jaulas separadas y apropiadamente marcadas para facilitar la identificación de las crías al momento del destete. En el día de nacimiento las camadas fueron reubicadas de acuerdo a cuatro grupos experimentales: dos grupos control y dos experimentales. En el grupo control 1, la madre cuidó a sus propias crías (control simulado). En el grupo control 2, las crías de una madre tratada con DEX fueron mantenidas con su misma madre mientras que en el grupo experimental 3, las crías de una madre tratada con DEX fueron mantenidas por una madre no-tratada. En el grupo experimental 4, las crías de una madre no-tratadas fueron mantenidas por una madre tratada con DEX. Las madres tratadas y no-tratadas con DEX fueron retiradas de sus jaulas y ubicadas en jaulas separadas y limpias. La camada que fue cruzada fue tomada

suavemente y mezclada con el material de anidación. La jaula fue monitoreada visualmente cada 60 minutos por las primeras 6 horas. Después de las primeras 24 horas, todas las jaulas fueron observadas diariamente. A cualquier ratón encontrado muerto se le practicó necropsia para determinar la causa de muerte. Las crías fueron pesadas regularmente y mantenidas hasta aproximadamente los dos meses de edad.

2.4 Modelo agudo de epilepsia

Ratones machos adultos (2 meses de edad y ~22 g) fueron separados en jaulas individuales para la administración por vía intraperitoneal única de PTZ (65 mg/kg) o tampón fosfato salino (PBS) como control. Después de inyectar a los animales, se observó y registro con una cámara digital el comportamiento durante 90 min. La calificación de la convulsión se evaluó mediante una escala previamente descrita (**Itoh y Watanabe, 2009**): 0= normal; 1= inmovilización, olfateo; 2= asentimiento de cabeza, fase clónica (movimientos faciales y de la extremidad anterior), fase mioclónica corta (contracciones musculares repentinas); 3= fase mioclónica continua, cola erecta; 4= fase clónica generalizada (extremidad anterior y posterior) con postura de canguro o convulsión violenta; 5= convulsiones generalizadas continuas, fase tónica (hipertonía muscular generalizada y caída brusca) o tónico-clónicas; 6= muerte. Transcurrido 30 min post inyección, los ratones fueron eutanasiados por decapitación para extraer los cerebros y posterior procesamiento.

2.5 Determinación de corticosterona plasmática.

Los niveles de corticosterona plasmática en los ratones recién nacidos y en los criados por dos meses fueron determinados por un kit de EIA (Cayman, USA) de acuerdo al protocolo del proveedor. Todas las determinaciones fueron realizadas en duplicados.

2.6 Cultivos celulares

Los cultivos celulares gliales (astrocitos, microglia y oligodendrocitos) fueron preparados a partir de la corteza cerebral de crías de ratón en P2, como ha sido descrito previamente (**Welser y Milner, 2012**). En breve, las cortezas cerebrales fueron ubicadas en medio MEM/HEPES frío y digeridas con tripsina al 0,2% y DNasaI (40 mg/ml). Las células disociadas de una cría fueron transferidas a un frasco previamente cubierto con poli-D-lisina, que contiene medio de cultivo DMEM con 10% de suero fetal bovino (FBS) y penicilina/estreptomicina al 1%. Cada tres días el medio fue reemplazado por medio fresco. Luego de nueve días de cultivo, las células precursoras de oligodendrocitos (OPC) fueron aisladas de acuerdo a un protocolo de adhesión diferencial (**O'Meara y cols., 2011**). Brevemente, un frasco con cultivo celular glial fue agitado a 50 x g por 45 min para remover las microglia. El medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco y el frasco e incubado por una hora, fue agitado otra vez a 200 x g por 16 h para remover las OPC. El medio que contiene las OPC fue transferido a una placa nueva y se incubó por 30 min para permitir la

adhesión de las microglías remanentes. El medio libre de microglías que contiene las OPC en suspensión fue transferido a un tubo cónico de 15 ml y las células fueron colectadas por centrifugación a 300 x g por 5 min. Las OPC fueron sembradas a una densidad de 20,000 células por ml en medio OPCDM (ScienCell), que contenía OPCDS al 1% (ScienCell). Una vez que las OPC fueron retiradas del cultivo celular glial, se agregó medio de cultivo fresco y se agitó otra vez a 200 x g por 18 h para aislar astrocitos.

Las poblaciones colectadas contienen <97% de células GFAP+ (astrocitos), CD11b+ (microglías) y PLP+ (oligodendrocitos), determinado por citometría de flujo (FACSCanto, Beckton-Dickinson, San Diego, CA, USA). Los datos fueron analizados utilizando el programa FCS Express v5.

2.7 Medios de cultivo condicionados

Los cultivos de microglías y astrocitos fueron lavados dos veces con HBSS y el medio fue reemplazado por medio DMEM con 1% de suplemento N1 (Sigma), 4 mM L-glutamina y penicilina/estreptomicina al 1% sin suero. Luego de dos días, los medios de microglías y astrocitos fueron colectados, filtrados e identificados como medio condicionado de microglías (MCM) y astrocitos (ACM), respectivamente. Los cultivos de oligodendrocitos de crías de madres no-tratadas con DEX fueron estimulados por 48 h con medios condicionados ya sea de microglías, oligodendrocitos o astrocitos provenientes de cultivos obtenidos de cortezas cerebrales de crías de madres tratadas y no-tratadas con DEX (Welsch y Milner, 2012).

2.8 Determinación de mediadores inmunes desde medios condicionados

Las concentraciones de citocinas y quimocinas presentes en los medios condicionados fueron cuantificadas usando el sistema Q-Plex Array Chemiluminescent (Quansys Biosciences, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las siguientes citocinas fueron determinadas en un único pocillo: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-17, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α , GM-CSF y RANTES. La placa multiplex fue leída usando el Quansys Q-View Imager con el programa Q-View (Quansys Biosciences, USA). Cada muestra fue determinada en duplicado en una dilución 1:2.

2.9 Captación de Etd en cultivo celular

En los ensayos de captación de etidio (Etd⁺), los cultivos de oligodendrocitos fueron lavados con la solución Krebs tamponada (en mM: 145 NaCl, 5 KCl, 3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5,6 glucosa, 10 HEPES-Na, pH 7.4), se incubaron 5 min en la solución Krebs tamponada que contenía 5 μ M Etd⁺. Luego, la fluorescencia fue registrada en regiones de interés que correspondían a diferentes núcleos de oligodendrocitos inspeccionados en un microscopio invertido provisto de objetivos de inmersión en agua Olympus 51W11. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital monocromática de enfriamiento rápido Q Imaging modelo Retiga 13001 (12-bit) (Qimaging, Burnaby, BC, Canadá) cada 30 s (tiempo de exposición = 30 ms, ganancia = 0,5). Durante el registro fue agregado un inhibidor de la captación de Etd⁺

mediada por HCs (sensible a La^{3+}). El procesamiento de las imágenes fue realizado con el software ImageJ (NIH, Bethesda, USA).

2.10 qRT-PCR

El RNA total fue aislado desde los cultivos de oligodendrocitos usando TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El RNA total fue tratado con DNase I (DNA-free kit, Ambion, Austin, TX, USA) para eliminar el DNA cromosómico. El cDNA fue sintetizado a partir de 2 μg utilizando el sistema High Capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Las reacciones de qPCR fueron llevadas a cabo con el sistema QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) y para su detección el 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los juegos de partidores validados (QIAGEN) para la cuantificación de los genes seleccionados fueron los siguientes: CD14 (QT00246190), Cx29 (QT00168581), Cx32 (QT00254527), Cx47 (QT00122227), IL-1 β (QT01048355), iNOS (QT01547980), P2X₇R (QT00130900), TLR4 (QT00259042), TNF- α (QT00104006), Panx1 (QT00138845) y Gapdh (QT01658692). Los datos fueron normalizados por la expresión de Gapdh y analizados utilizando el método de Ct comparativo. Todas las determinaciones fueron realizadas en duplicados.

2.11 Preparación de rebanadas de hipocampo

Las crías en P2 fueron eutanasiadas por decapitación y sus cerebros fueron disecados y ubicados en fluido espinal cerebral artificial (ACSF) frío que contiene (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 glucosa, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ y burbujeado con 95% O₂/5% CO₂ a pH 7.4. Se realizaron cortes hipocampales coronales (400 µm) usando un vibrátomo (Leica, VT 1000GS; Leica, Wetzlar, Germany) llenado con ACSF frío. Los cortes fueron transferidos a temperatura ambiente (20-22°C) a una cámara de mantención y sumergidos en ACSF oxigenado en presencia de 2 mM piruvato y pH 7.4 por un período de estabilización de 1 h antes de su uso.

2.12 Captación de Etd⁺ en rebanadas de hipocampo

Los cortes de hipocampo fueron tratados con diferentes drogas por 20 min a temperatura ambiente bajo ACSF burbujeado (95% O₂/5% CO₂). Los cortes de cerebro fueron incubados por 30 min con 0,01 µM DEX y luego con bromuro de Etd⁺ 5 µM por 10 min. Finalmente, los cortes fueron lavados tres veces por 5 min con ACSF y fijados por 1 h con 4% paraformaldehído a 4°C.

2.13 Inmufluorescencia y microscopía confocal.

Los cortes de cerebro fueron incubados por 1 h en solución de bloqueo (PBS que contenía 0,2% gelatina y 1% Tritón X-100). Luego, las muestras fueron incubadas toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo que contenía suero de burro normal al 10%. Posteriormente, las secciones fueron incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal anti-Cx29 de conejo (1:150), policlonal anti-Cx32 de conejo (1:150), policlonal anti-Cx47 de ratón (1:300), policlonal anti-Panx1 de pollo (1:300), policlonal anti-P2X₇R de conejo (1:150), policlonal anti-CIAS1/NALP3 de cabra (1:150), monoclonal anti-ASC de ratón (1:300), policlonal anti-caspasa-1 de conejo (1:150), policlonal anti-iNOS de conejo (1:100), policlonal anti-PLP de conejo (1:150), policlonal anti-mielina oligodendrocito de cabra (1:150), monoclonal anti-GFAP de ratón (1:300), policlonal anti-Iba1 de conejo (1:100), monoclonal anti-CD11b de ratón (1:100), monoclonal anti-CD117 de ratón (1:75) o monoclonal anti-NeuN de ratón (1:300). Las muestras fueron lavadas con PBS e incubadas a temperatura ambiente con anti-ratón Alexa Fluor 488 (1:500), anti-conejo Alexa Fluor 488 (1:500), anti-cabra Cy2 (1:300), anti-ratón Cy3 (1:500), anti-conejo Cy3 (1:500), anti-cabra TRITC (1:100) o anti-pollo Cy3 (1:300). Luego, las muestras fueron lavadas y montadas con DAPI-Fluoromount-G y las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Eclipse Ti-E Nikon. Las secciones de imágenes consecutivas fueron tomadas con un objetivo 60X, con intervalo de distancia de 250 nm, con tres láseres (405, 488 y 561 nm de longitud de onda) y las proyecciones en el eje Z fueron reconstruidas con el software de Leica. Los niveles de proteínas de NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 β , TNF- α , P2X₇R, Panx1, Cx29,

Cx32 and Cx47, y la captación de colorante en las células control y tratadas con DEX fueron comparadas utilizando el software ImageJ para calcular la fluorescencia celular total corregida (Ildfonso y cols., 2016). Se dibujó el contorno de cada célula y se midió la densidad, el área y la fluorescencia media, junto con varias lecturas de fondo adyacentes. La fluorescencia celular total corregida se representa como la intensidad relativa de fluorescencia (RFI) = densidad integrada - (área seleccionada de la célula \times fluorescencia media de las lecturas de fondo). El número total (n) de células contadas para cada grupo fue de aproximadamente 60. Al menos tres campos fueron seleccionados por cada rebanada.

2.14 Análisis de la morfología dendrítica y densidad de espinas.

Se determinó la morfología de las neuronas hipocampales por la tinción de Golgi. Para esto se utilizó el FD Rapid Golgi Stain kit (FD NeuroTechnologies, USA). Brevemente, cerebros frescos y disecados fueron inmersos en solución A y B por una semana a temperatura ambiente y transferidos a la solución C por 48 h a 4°C. Los cerebros fueron rebanados usando un vibrátomo (VT1000S, Leica) a un grosor de 300 μ m. Se tomaron imágenes de microscopía de campo claro (magnificación 63X) de neuronas CA1 y CA3. Las imágenes fueron analizadas utilizando el método de Sholl. De los cortes se seleccionaron 60 neuronas según el siguiente protocolo: (1) no deben tener dendritas cortadas, (2) su tinción debe ser oscura y pareja a lo largo del campo dendrítico y (3) deben estar relativamente aisladas de neuronas vecinas teñidas para evitar interrupciones. El análisis morfométrico se restringió a las neuronas piramidales CA1 y CA3. El número de puntos de ramificación se contabilizó

partiendo por las primarias (que nacen en el soma), siguiendo con las secundarias (que nacen de las primarias), hasta las últimas ramificaciones.

2.15 Análisis estadístico de datos

Todos los datos fueron presentados como promedio \pm SEM. Para los análisis estadísticos, cada tratamiento fue comparado con su correspondiente control y n se refiere al número de experimentos independientes. La significancia fue determinada usando el test de t de Student (sólo si dos grupos fueron comparados) o el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por un test de Dunnett's (si más de dos grupos fueron comparados). Todos los resultados fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

1 Neuroinflamación inducida por la exposición prenatal a DEX promueve la formación de inflammasoma y la activación a largo plazo de los HCs en oligodendrocitos.

1.1 La exposición prenatal a DEX aumenta los niveles de corticosterona plasmática y disminuye el peso corporal de las crías durante el desarrollo post-natal.

En animales y humanos se ha demostrado que la exposición maternal a repetidos episodios de estrés o a elevados niveles de GCs (por ejemplo, DEX), el cual cruza la barrera placentaria (**Charil y cols., 2010**), incrementa la exposición a GCs en el útero, lo cual parece estar asociado con alteraciones en el crecimiento fetal (**Cottrell y cols., 2012**). Se ha propuesto que el bajo peso del recién nacido se asocia con una disminución en la relación GR/MR a nivel de mRNA y proteína en el hipocampo (**Ong y cols., 2013**). Se piensa que la disminución de la expresión de GR reduce la sensibilidad de la retroalimentación negativa del eje HPA, el cual induce hiperactividad de este eje y una mayor concentración de GCs (**Drake y cols., 2007; Zhu y cols., 2014**). Por lo tanto, se evaluó si la administración prenatal de una

dosis única (agudo) o de dosis repetidas (crónico) de DEX, tal como en una condición de estrés prenatal agudo y crónico, respectivamente; incrementan los niveles de corticosterona en las crías y disminuye el peso del recién nacido. Elevados niveles de corticosterona fueron encontrados en las crías P2 de madres tratadas con DEX agudo (13 ± 1 ng/ml, $n=19$, $p<0,01$) (**Figura 4A**) y DEX crónico (17 ± 3 ng/ml, $n=30$, $p<0,05$) comparadas con las crías controles (6 ± 1 ng/ml, $n=48$) (**Figura 4A**). Las madres tratadas con DEX crónico tuvieron crías con un peso al nacer significativamente menor comparado con los controles a P16 (ctrl: 8 ± 1 g vs. DEX: 5 ± 1 g, $n=8$, $p<0,05$), P23 (ctrl: 10 ± 1 g vs. DEX: 6 ± 1 g, $n=8$, $p<0,01$), P30 (ctrl: 17 ± 2 g vs. DEX: 13 ± 1 g, $n=8$, $p<0,01$), P60 (ctrl: 22 ± 2 g vs. DEX: 16 ± 1 g, $n=8$, $p<0,01$) y P90 (ctrl: 25 ± 3 g vs. DEX: 17 ± 2 g, $n=8$, $p<0,01$) (**Figura 4B**). En P2 y P9 los pesos corporales no fueron significativamente distintos comparados con el grupo control (**Figura 4B**). Estos resultados sugieren que la exposición prenatal aguda y crónica a DEX altera la actividad del eje HPA en las crías tal como se ha descrito en los modelos de estrés prenatal agudo y crónico.

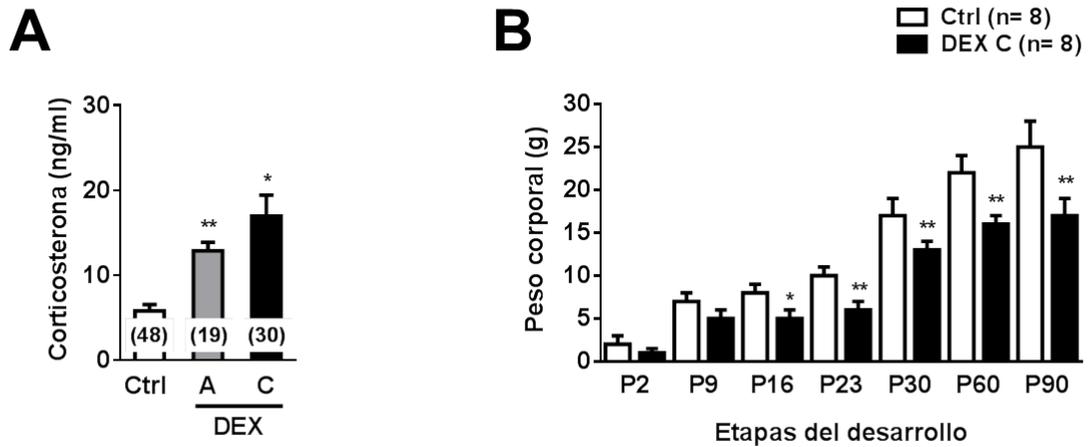


Figura 4. Crías de madres expuestas a DEX muestran altos niveles de corticosterona y una reducción en la ganancia de peso durante el desarrollo post-natal. (A) Los niveles de corticosterona se midieron el día P2 en las crías de madres tratadas el día 18 (Agudo, $n = 19$) y los últimos 8 días (Crónico, $n = 30$) de gestación con DEX (0,5 mg/kg/día) y control (Ctrl, $n = 48$). (B) Curva de crecimiento de las ratones crías controles ($n = 8$) y de madres expuestas a DEX crónico ($n = 8$). A: agudo, C: crónico, DEX: dexametasona, P: día postnatal. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente a la condición control. Estadística: test de t de Student y ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

1.2 La expresión de las proteínas del inflammasoma NLRP3 incrementan en oligodendrocitos de crías de madres expuestas a DEX.

Para establecer si las proteínas del inflammasoma NLRP3 son expresadas en oligodendrocitos, se evaluó la inmunoreactividad de las tres proteínas que conforman dicho complejo multiproteico en rebanadas de hipocampo de crías en P2 de madres controles y de madres expuestas a DEX agudo y crónico. Se determinó que los oligodendrocitos de animales controles expresan las proteínas del inflammasoma NLRP3 llamados NLRP3, ASC y Casp-1 (**Figura 5A-L**). Además, se determinó que la exposición prenatal a DEX aguda (datos no mostrados) y crónico (**Figuras 5M-X**) incrementa la reactividad de las proteínas del inflammasoma NLRP3 en las crías de madres expuestas a DEX en forma aguda y crónica. Se analizó la intensidad de fluorescencia relativa (RFI) que refleja la cantidad relativa de proteínas del inflammasoma (promedio \pm SEM) por separado en las tres muestras analizadas (60 células en cada muestra). La cantidad relativa de NLRP3, ASC y Casp-1 de las crías de madres expuestas a DEX agudo incrementó comparado con la de los animales controles (ctrl: 9231 ± 1064 RFI vs. DEX agudo: 37959 ± 1577 RFI, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 6A**), (ctrl: 22316 ± 1519 RFI vs. DEX agudo: 98179 ± 2517 RFI, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 6B**) y (ctrl: 12099 ± 1070 RFI vs. DEX agudo: 56004 ± 2708 RFI, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 6C**), respectivamente. Del mismo modo, la exposición prenatal a DEX crónico incrementó la expresión de las proteínas del inflammasoma NLRP3.

La cantidad relativa de NLRP3, ASC y Casp-1 de las crías de madres expuestas a DEX crónico incrementó comparado con la de los animales controles (ctrl: 7398 ± 825 RFI vs.

DEX crónico: 56472 ± 2549 RFI, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 6D**), (ctrl: 32885 ± 1217 RFI vs. DEX crónico: 87946 ± 3531 RFI, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 6E**) y (ctrl: 12809 ± 629 RFI vs. DEX crónico: 48727 ± 2300 RFI, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 6F**), respectivamente.

Debido a que la vía de señalización del inflamasoma NLRP3 ha sido asociada a la activación de P2X₇R y Panx1 por ATP (**Pelegri y Surprenant, 2009; Minkiewicz y cols., 2013**), se examinó la expresión de P2X₇R y Panx1, en oligodendrocitos de crías de madres expuestas a DEX agudo. Los niveles relativos de P2X₇R y Panx1 incrementaron significativamente con respecto al control (ctrl: 32731 ± 1623 RFI vs. DEX agudo: 55392 ± 1627 RFI, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 7A**) y (ctrl: 18475 ± 1561 RFI vs. DEX agudo: 112917 ± 1705 RFI, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 7B**), respectivamente. Además, se evaluó la reactividad de Cxs presentes en oligodendrocitos. Las reactividades relativa de las Cx29, Cx32 y Cx47 en cerebro de animales tratados con DEX agudo incrementaron significativamente en comparación con la de los animales controles (ctrl: 422645 ± 1946 RFI vs. DEX agudo: 53131 ± 2171 RFI, $n=3$, $p<0,001$) (**Figura 7C**), (ctrl: 26946 ± 1692 RFI vs. DEX agudo: 31612 ± 1490 RFI, $n=3$, $p<0,05$) (**Figura 7D**) y (ctrl: 12534 ± 1020 RFI vs. DEX agudo: 22582 ± 2102 RFI, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 7E**), respectivamente. Por otro lado, con el fin de determinar si DEX agudo activa el inflamasoma y estimula una respuesta inflamatoria más general, se evaluó la expresión de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α , respectivamente. Los niveles relativos de IL-1 β y TNF- α también se incrementaron significativamente debido al tratamiento con DEX agudo (ctrl: 363 ± 94 RFI vs. DEX agudo: 8498 ± 678 RFI, $n = 3$, $p <0,0001$) y (ctrl: 21043 ± 1809 RFI vs. DEX agudo: 134931 ± 1341 RFI, $n = 3$, $p <0,0001$) (**Figuras 7F y 7G**, respectivamente), lo que indica la activación inflamasoma (**Savage y cols., 2012**).

En oligodendrocitos de crías de madres expuestas a DEX crónico los niveles relativos de P2X₇R y Panx1 incrementaron significativamente con respecto al control (ctrl: 18227 ± 746 RFI vs. DEX crónico: 36020 ± 959 RFI, n=3, p<0,0001) (**Figura 8A**) y (ctrl: 6591 ± 908 RFI vs. DEX crónico: 14501 ± 1015 RFI, n=3, p<0,001) (**Figura 8B**), respectivamente. Con respecto a las Cxs presentes en oligodendrocitos, la reactividad relativa de Cx29 no fue significativamente diferente en comparación con la de los animales controles (ctrl: 12790 ± 987 RFI vs. DEX crónico: 13961 ± 995 RFI, n=3, ns) (**Figura 8D**). Mientras que los niveles relativos de Cx32 y Cx47 se encontraron reducidos con respecto a los controles (ctrl: 38475 ± 1944 RFI vs. DEX crónico: 33058 ± 1486 RFI, n=3, p<0,05) (**Figura 8E**) y (ctrl: 52421 ± 2980 RFI vs. DEX crónico: 17281 ± 1252 RFI, n=3, p<0,0001) (**Figura 8F**), respectivamente. Por otro lado, los niveles relativos IL-1 β aumentaron significativamente con respecto al control (ctrl: 2987 ± 1826 RFI vs. DEX crónico: 28160 ± 2428 RFI, n=3, p<0,0001) (**Figura 8G**). Así mismo, la reactividad relativa de la citocina TNF- α incrementa significativamente comparado con el control (ctrl: 31079 ± 1999 RFI vs. DEX crónico: 165416 ± 2668 RFI, n=3, p<0,0001) (**Figura 8H**). Estos resultados en conjunto sugieren que el oligodendrocito expresa el inflamasoma NLRP3 y su activación inducida por la exposición prenatal a DEX sería dependiente de HCs Panx1 y P2X₇R, permitiendo la secreción de IL-1 β y el incremento en la expresión de TNF- α .

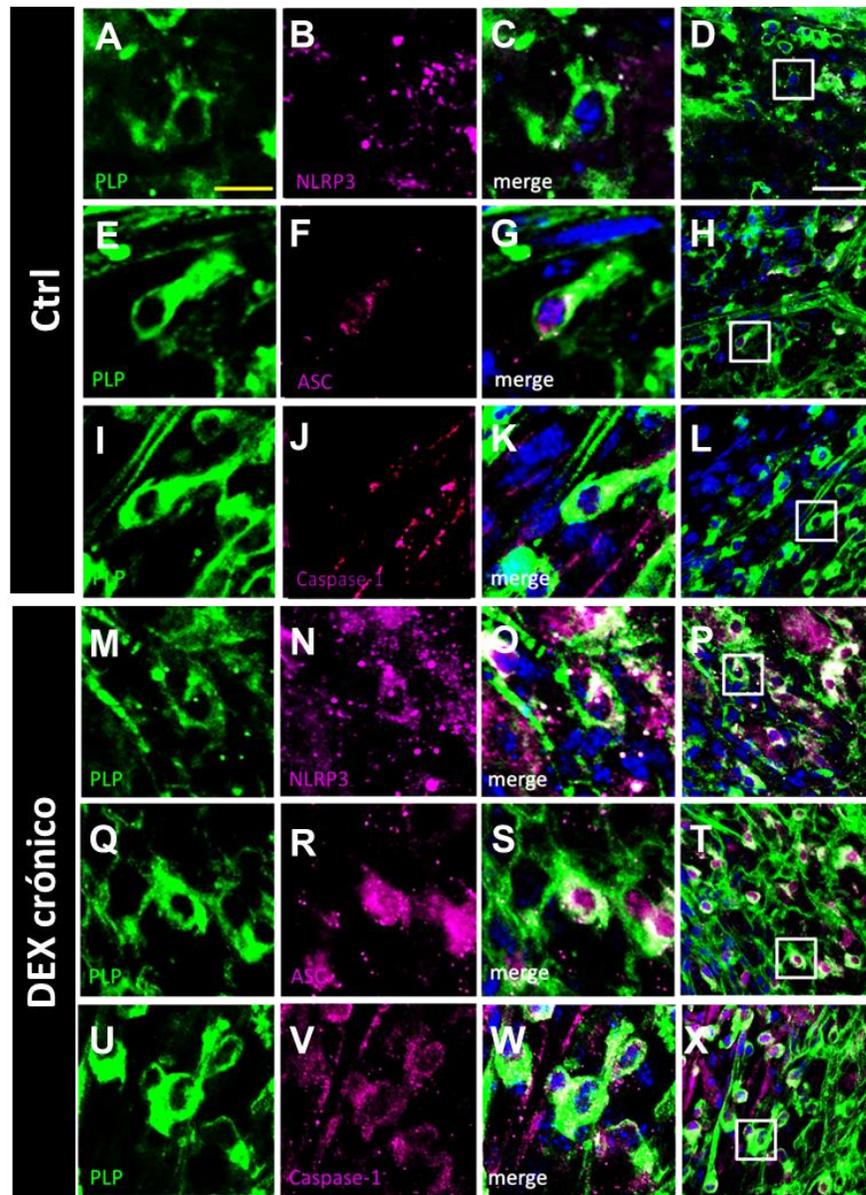


Figura 5. La exposición prenatal a DEX crónico incrementa los niveles de NLRP3, ASC y la caspasa-1 en oligodendrocitos de las crías. Imágenes representativas muestran los oligodendrocitos en cortes de hipocampo. La inmunodetección de NLRP3, ASC y la caspasa-1 (magenta) y DAPI (azul) en oligodendrocitos PLP positivos (verde) de crías de ratones control (A-L) y de madre expuestas a DEX crónico (M-X). D, H, L, P, T y X muestran ampliaciones de las áreas demarcadas dentro del cuadro blanco de los paneles C, G, K, O, S y W, respectivamente. Barras de calibración: amarillo = 10 μm y blanco = 30 μm . Datos representativos obtenidos en tres experimentos independientes.

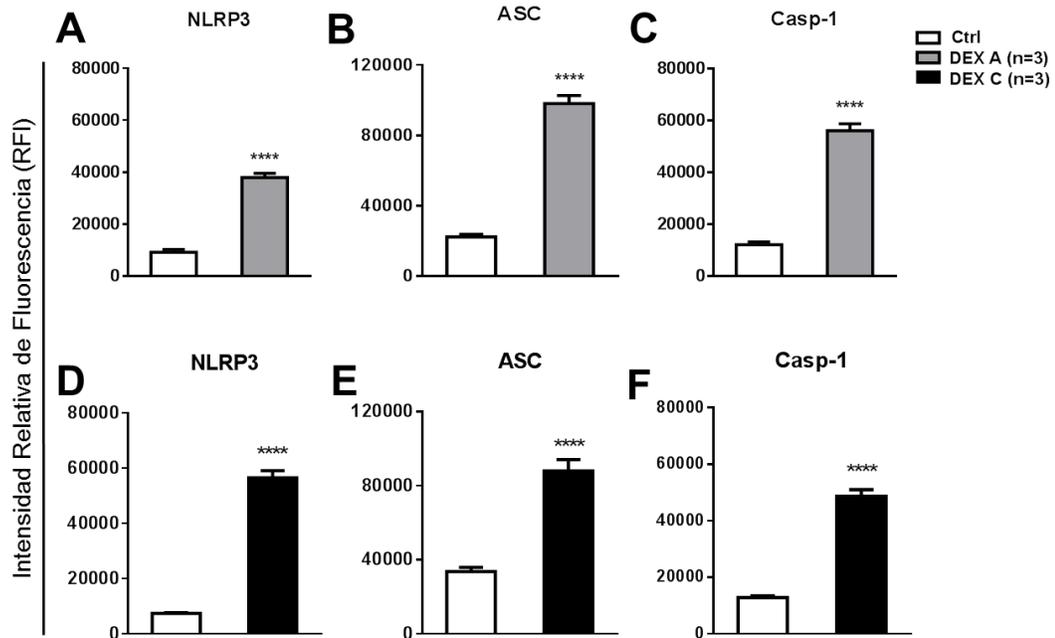


Figura 6. La exposición prenatal a DEX agudo o crónico aumenta los niveles de las proteínas del inflammasoma NLRP3 en oligodendrocitos de neonatos. Intensidad de fluorescencia de (A, D) NLRP3, (B, E) ASC (C, F) Casp-1, reactividad en oligodendrocitos positivos PLP en cortes de cerebro de crías de madres controles y madres expuestas a DEX agudo (DEX A) y crónico (DEX C). **** $p < 0,0001$, efecto de la exposición de DEX en comparación a la condición control. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de datos obtenidos en tres experimentos independientes. Estadística: test de t de Student.

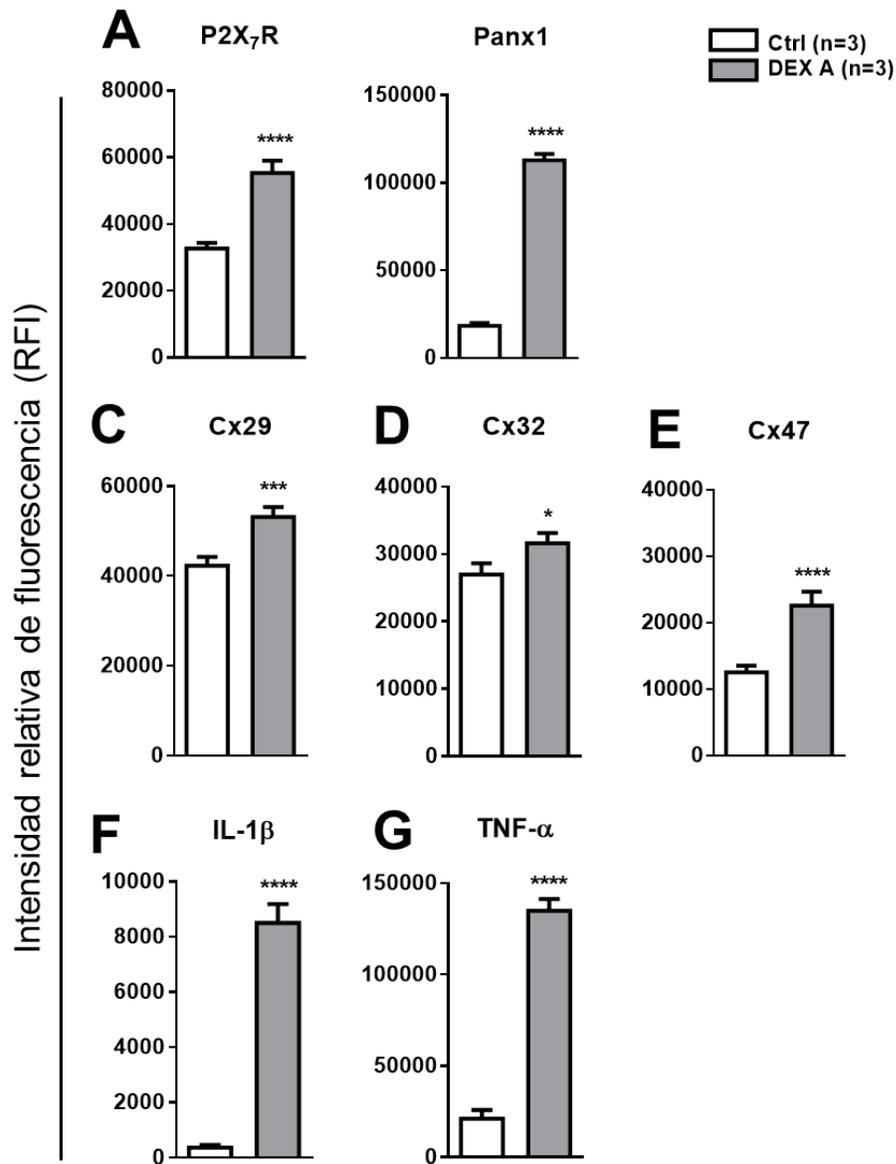


Figura 7. La exposición prenatal a DEX agudo aumenta los niveles de las proteínas implicadas en la activación del inflammasoma en oligodendrocitos de neonatos. Intensidad de fluorescencia de (A) P2X₇R, (B) Panx1, (C) Cx29, (D) Cx32, (E) Cx47, (F) IL-1 β y (G) TNF- α en oligodendrocitos positivos PLP en cortes de cerebro de crías de madres controles y madres expuestas a DEX agudo (DEX A). * p<0,05, *** p<0,001, **** p<0,0001, efecto de la exposición de DEX agudo en comparación a la condición control. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de datos obtenidos en tres experimentos independientes. Estadística: test de *t* de Student.

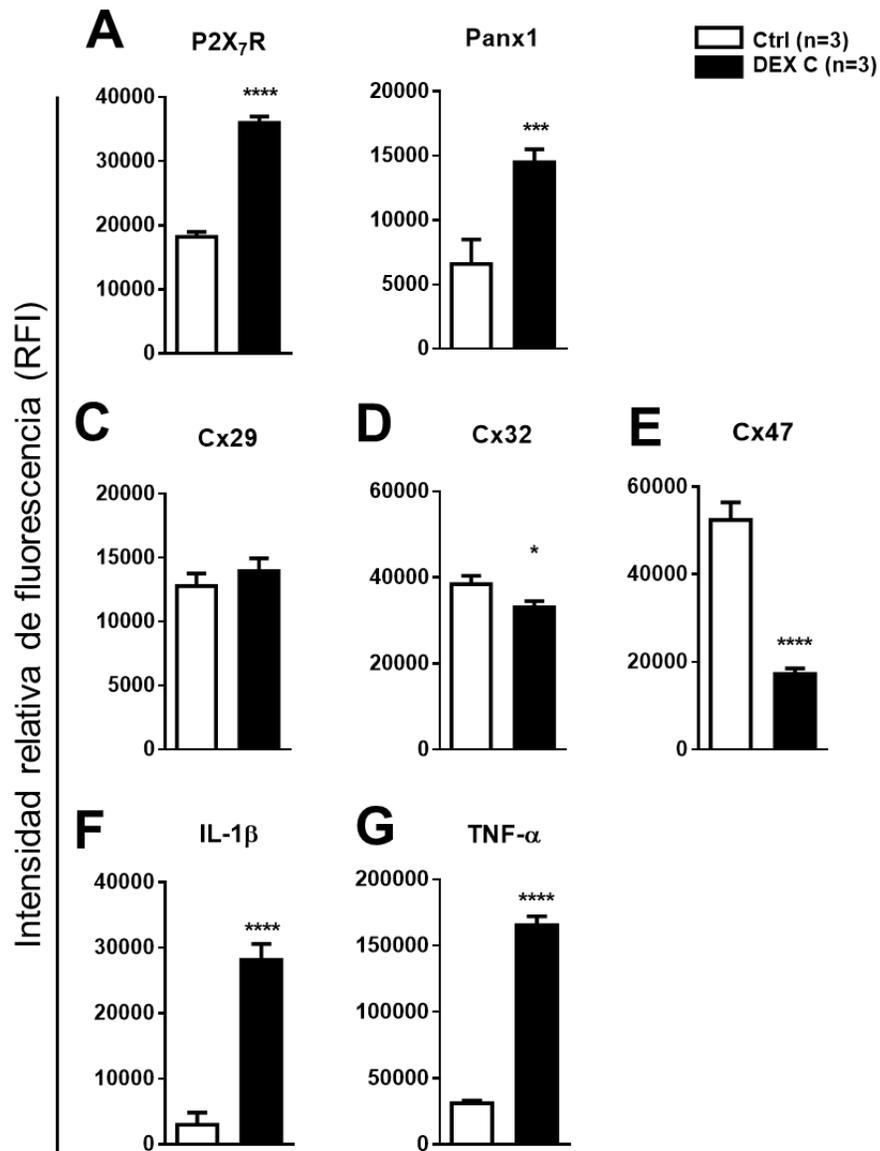


Figura 8. La exposición prenatal a DEX crónico aumenta los niveles de las proteínas implicadas en la activación del inflammasoma en oligodendrocitos de neonatos. Intensidad de fluorescencia de (A) P2X₇R, (B) Panx1, (C) Cx29, (D) Cx32, (E) Cx47, (F) IL-1 β y (G) TNF- α en oligodendrocitos positivos PLP en cortes de cerebro de crías de madres controles y madres expuestas a DEX crónico (DEX C). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, efecto de la exposición de DEX crónico en comparación a la condición control. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de datos obtenidos en tres experimentos independientes. Estadística: test de t de Student.

1.3 La exposición prenatal a DEX crónico incrementa la actividad de los HCs en oligodendrocitos.

Un creciente número de estudios ha implicado la microgliosis (Shijie y cols., 2009) y astrogliosis (Moreno y cols., 2013) en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas asociadas al estrés, tal como la esclerosis múltiple (Gardener y cols., 2009), una enfermedad inflamatoria crónica demielizante del SNC. Además, la disfunción y desregulación de los HCs en células gliales contribuye a la activación de éstas, lo que conduce a muerte neuronal (Brand-Schieber y cols., 2005; Orellana y cols., 2011a; Negoro y cols., 2013; Takeuchi y Suzumura, 2014). Por otro lado, se ha propuesto que los oligodendrocitos se activarían como consecuencia de microglías y astrocitos activados (Patel y Balabanov, 2012). Sin embargo, la contribución de los oligodendrocitos y la mielina permanecen poco entendidas. Por esto, se determinó si los oligodendrocitos de crías provenientes de madres expuestas a DEX crónico presentan cambios en la actividad de los HCs. La actividad de HCs fue determinada en condiciones *ex vivo* mediante ensayo de captación de Etd⁺ en células PLP positivas de rebanadas hipocampales. Bajo condiciones controles los oligodendrocitos mostraron una baja captación de Etd⁺ (Figura 9A 1-5). Sin embargo, la exposición prenatal a DEX crónico incrementó la captación de Etd⁺ en los oligodendrocitos de las crías (262 ± 19%, comparados con el control, n=3, p<0,0001) (Figura 9B 1-5).

La apertura de los HCs bajo condiciones pro-inflamatorias ha sido asociada con la actividad de los HCs Panx1 y HCs Cx43 en microglías y astrocitos (Orellana y cols., 2011a; Saez y cols., 2013; Orellana y cols., 2015). Por tanto, se examinó si la actividad de estos canales de membrana se afecta por la exposición prenatal a DEX crónico en los

oligodendrocitos de las crías. Para probar la participación de cada tipo de canal sobre la captación de Etd⁺ inducida por DEX se utilizó el péptido mimético ¹⁰panx1, bloqueador de HCs Panx1 (**Pelegri y Surprenant, 2006**), La³⁺, un bloqueador de HCs Cxs y el péptido mimético Gap26, bloqueador de HCs Cx43 (**Wang y cols., 2013**). El péptido ¹⁰Panx1 (200 µM) (92,2 ± 8,8%, n = 3, p<0,0001) y La³⁺ (200 µM) (73,5 ± 6,2%, n = 3, p<0,0001) bloquearon la captación de Etd⁺ en los oligodendrocitos de crías de madres expuestas a DEX crónico (**Figura 9C**). Además, la captación de Etd⁺ inducida por DEX prenatal crónico fue completamente bloqueada por Gap26 (200 µM) (77,1 ± 9,3%, n=3, p<0,0001) (**Figura 9C**). Estos hallazgos sugieren que HCs Panx1 y HCs Cx43 median el incremento de la captación de Etd⁺ en los oligodendrocitos de los neonatos inducida por DEX prenatal crónico.

El P2X₇R es expresado por oligodendrocitos (**Matute, 2008**) y el uso de antagonistas selectivos disminuye la captación de Etd⁺ inducida por estrés crónico de restricción de movimiento en microglías, astrocitos y neuronas en ratones adultos (**Orellana y cols., 2015**). Por tanto, se evaluó la contribución de P2X₇R sobre la captación de Etd⁺ inducida por la exposición a DEX prenatal crónico en oligodendrocitos de crías usando A740003, un antagonista competitivo de P2X₇R (**Honore y cols., 2006**). A740003 (10 µM) bloqueó la captación de Etd⁺ en los oligodendrocitos de crías provenientes de madres tratadas con DEX crónico (71,3 ± 10,9%, n=3, p<0,0001) (**Figura 9C**).

Previamente, se propuso que el estrés prenatal podría inducir la activación de mastocitos y prepara la respuesta inflamatoria de las células gliales (**Aguirre y cols., 2013**). Adicionalmente, se sabe que los mastocitos activados inducen demielinización y apoptosis de oligodendrocitos, mientras que la mielina misma estimula la degranulación de mastocitos (**Medic y cols., 2008; Skaper y cols., 2012**). Debido a que el estrés por restricción de

movimiento provoca una rápida degranulación de los mastocitos cerebrales (**Theoharides y cols., 1995**), se evaluó la participación de estas células en la captación de Etd⁺ inducida por DEX prenatal crónico usando masitinib, un bloqueador de la activación de los mastocitos que inhibe al receptor tirosina quinasa c-kit/PDGF (**Dubreuil y cols., 2009**). El tratamiento de rebanadas de cerebro con masitinib (10 μ M) bloqueó el incremento de la captación de Etd⁺ en oligodendrocitos inducido por DEX prenatal crónico ($70,1 \pm 5,3\%$, n=3, p<0,0001) (**Figura 9C**). Así, estos resultados indican que la exposición a DEX prenatal crónico promueve la actividad de los HCs Panx1 y Cxs junto con la activación de P2X₇R en mastocitos, microglías y astrocitos.

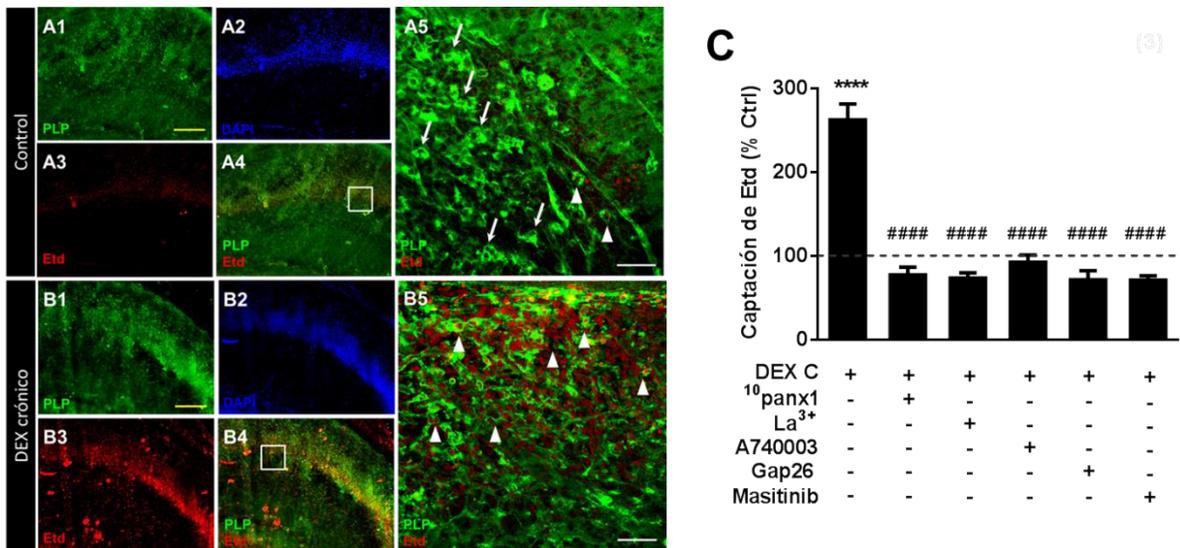


Figura 9. La actividad de los HCs aumenta en oligodendrocitos de cerebro de crías de madres expuestas a DEX crónico. Imágenes representativas que muestran la reactividad a PLP (verde), DAPI (azul) y la captación de Etd⁺ (rojo) en cortes coronales del hipocampo de crías de madres controles (A 1-5) y de madres expuestas a DEX crónico (B 1-5). (A5) y (B5) con una magnificación (60X) de la zona encuadrada en los paneles A4 y B4 (10X), respectivamente. Flecha indica reactividad de oligodendrocitos y la punta de flecha captación de Etd⁺. (C) Promedio de la captación de Etd⁺ de oligodendrocitos de crías de madres expuestas a DEX crónico (DEX C) normalizada a la condición control (línea discontinua) y el efecto de los bloqueadores aplicados previo al ensayo captación de Etd⁺: ¹⁰Panx1 (200 μM), La³⁺ (200 μM), A740003 (10 μM), Gap26 (200 μM) o masitinib (10 μM). Los datos corresponden al promedio ± SEM. ****p<0,0001 frente a la condición control; #####p<0,0001 efecto de cada bloqueador comparado con el efecto inducido por la exposición a DEX crónico. Datos promediados se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes. Barras de calibración: barra blanca: 25 μm; barra amarilla = 150 μm. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

1.4 La exposición prenatal a DEX agudo incrementa parcialmente la actividad de los HCs Cx43 y no modifica la sensibilidad al bloqueo de los HCs Panx1 o P2X₇R en oligodendrocitos.

En las células gliales, el estrés de movimiento agudo y crónico incrementa la actividad de los HCs Cx43 en microglías y astrocitos (Orellana y cols., 2015). Sin embargo, los HCs Cx43 o HCs Panx1 en astrocitos son activados por estrés por restricción de movimiento crónico en ratones adultos (Orellana y cols., 2015). Para determinar la contribución de los HCs Panx1 y HCs Cx43 en oligodendrocitos de crías en respuesta a la exposición prenatal a DEX agudo se utilizaron ¹⁰Panx1 y Gap26 como bloqueadores de HCs Panx1 y HCs Cx43, respectivamente. Se encontró que la exposición prenatal a DEX agudo incrementa la captación de Etd⁺ en los oligodendrocitos de las crías ($174,2 \pm 5,1\%$ comparado con el control, $n=3$, $p<0,001$) (Figura 10), pero comparación con la prominente actividad de HCs inducida por la exposición prenatal a DEX crónico, la condición aguda indujo aumento menor pero aun significativo en la captación de Etd⁺ de los oligodendrocitos ($262,1 \pm 18,9\%$ vs. $174,2 \pm 5,1\%$, respectivamente, $n=3$) (Figura 10). Sin embargo, ¹⁰Panx1 no afectó la captación de Etd⁺ inducida por la exposición prenatal a DEX agudo ($173,9 \pm 14,8\%$; $n=3$) (Figura 10) y Gap26 redujo parcialmente la captación de Etd⁺ promovida por la condición aguda en los oligodendrocitos ($133,1 \pm 4,3\%$, $n=3$, $p<0,05$) (Figura 10). Estos datos sugieren que los HCs Cx43, pero no los HCs Panx1, median la captación de Etd⁺ inducida por la exposición prenatal a DEX agudo en los oligodendrocitos de las crías. Contrario a la observación hecha en oligodendrocitos de crías de madres sometidas a la exposición de DEX crónico, A74003 no afectó la captación de Etd⁺ inducida por la condición aguda ($176,3 \pm 4,3\%$, $n=3$) (Figura 10).

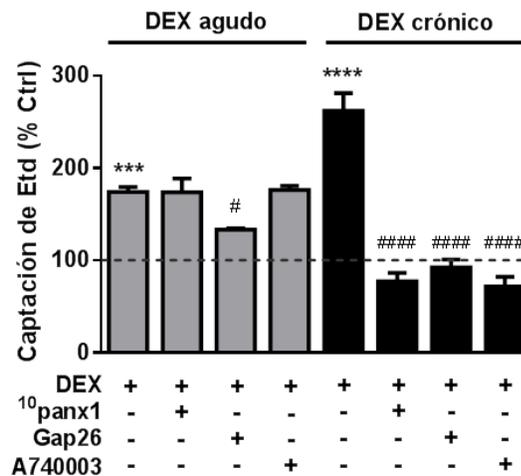


Figura 10. La exposición prenatal a DEX agudo y crónico incrementa la actividad de los HCs Cx43 previniendo la activación de HCs en oligodendrocitos de las crías. Captación de Etd⁺ normalizada a la condición control (línea discontinua) de los oligodendrocitos de crías de madres expuesta a DEX agudo (barras blancas) y crónico (barras negras). También se muestran el efecto de los siguientes bloqueadores aplicados previo al ensayo de captación de Etd⁺: ¹⁰Panx1 (200 μM), Gap26 (200 μM) o A740003 (10 μM). Los HCs Cx43 se expresan en microglías y astrogliás y son bloqueados por Gap26, mientras que los HCs Panx1 y P2X₇R se expresan en todas las células cerebrales y son bloqueados por ¹⁰Panx1 A740003, respectivamente. Los datos corresponden al promedio ± SEM. ***p<0,001, ****p<0,0001 frente a la condición control; #p<0,05, #####p<0,0001 efecto de cada bloqueador comparado con el efecto inducido por la exposición a DEX prenatal. Datos promediados se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

En consecuencia, la respuesta a la exposición prenatal a DEX agudo es mediada por HCs Cx43 presentes en mastocitos, microglías o astrocitos.

1.5 La apertura de los HCs inducida por la exposición prenatal a DEX crónico depende principalmente de Cxs.

Actualmente se sabe que una condición de estrés activa las microglías, las cuales permanecen activas por mucho tiempo, causando un estado pro-inflamatorio crónico y no existe a la fecha un tratamiento que lo revierta (**Kato y Kanba, 2013**). Sin embargo, nosotros hemos descubierto que la activación de las microglías depende de la actividad de los HCs, por lo cual un bloqueo de estos revierte las microglías a su estado de reposo. No obstante, los actuales bloqueadores son péptidos, que si bien son selectivos de HCs Cxs no funcionan como tratamiento farmacológico, ya que no diferencian entre HCs Cxs y HCs Panx1 o GJs. Con este fin, se determinó el efecto de un bloqueador selectivo de HCs Cxs en rebanadas de hipocampo de crías de madres expuestas a DEX agudo y crónico, para lo cual se utilizó la molécula D4, identificada por modelamiento molecular de la estructura cristalina de la Cx26 (**Maeda y cols., 2009**), que se encuentra en la base de datos NCI y en una patente solicitada (Fecha de publicación internacional 17 de diciembre de 2015 (17.12.2015) WIPO/PCT; Número de publicación internacional W0 2015/ 1882888 A1). Se encontró que la captación de Etd⁺ inducida por la exposición prenatal a DEX agudo fue inhibida prominentemente por D4 (10 nM) en microglías (de $189 \pm 12\%$ a $39 \pm 3\%$, n=120, p<0,0001) (**Figura 11A**), astrocitos (de $251 \pm 15\%$ a $81 \pm 8\%$, n=120, p<0,0001) (**Figura 11B**) y oligodendrocitos (de $217 \pm 9\%$ a $112 \pm 6\%$, n=120, p<0,0001) (**Figura 11C**). Así mismo, la captación de Etd⁺ inducida por la

exposición prenatal a DEX crónico fue inhibida significativamente en microglías (de $331 \pm 18\%$ a $257 \pm 14\%$, $n=120$, $p<0,0001$) (**Figura 11D**), astrocitos (de $400 \pm 26\%$ a $236 \pm 15\%$, $n=120$, $p<0,0001$) (**Figura 11E**) y oligodendrocitos (de $382 \pm 28\%$ a $257 \pm 13\%$, $n=120$, $p<0,0001$) (**Figura 11F**). Esta evidencia sugiere que la captación de Etd⁺ inducida por la exposición prenatal a DEX agudo y crónico depende principalmente de la apertura de los HCs Cxs en células gliales.

1.6 La administración crónica de DEX induce un aumento de la actividad de los HCs a largo plazo en oligodendrocitos de crías.

Es sabido que el estrés prenatal induce cambios en el cerebro de las crías que persisten hasta la edad adulta (**Xu y cols., 2013**). Por tanto, se decidió investigar si la actividad de los HCs en oligodendrocitos inducida por la administración de DEX crónico persiste más allá del día de nacimiento. Además, se investigó si el incremento de la actividad de HCs es revertido en oligodendrocitos de camadas criadas por madres no tratadas con DEX o aumenta en crías sanas cuidadas por madres tratadas con DEX.

La captación de Etd⁺ inducida en los oligodendrocitos de crías de madres control y criados por una madre control fue aproximadamente un 50% menor que la de los oligodendrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX y criados hasta P30 por una madre tratada con DEX (Grupo 2, P30 c/madre: $210 \pm 14\%$, $n = 3$, $p <0,0001$) (**Figura 12A**, comparar los grupos 1 y 2, P30 c/madre). Por otra parte, la captación de Etd⁺ registrada en oligodendrocitos de descendientes de madres tratadas con DEX y criados hasta P30 por una madre control (Grupo 3, P30 c/madre: $249 \pm 30\%$, $n = 3$, $p <0,0001$) (**Figura 12A**, grupo 3)

fue similar a la registrada en el grupo 2 de ratones. Además, los oligodendrocitos provenientes de crías de una madre control y amamantados hasta P30 por una madre tratadas con DEX mostró una captación de Etd⁺ más prominente que la observada en animales del Grupo 1 (Grupo 4, P30 c/madre: $175 \pm 10\%$, $n = 3$, $p < 0,0001$) (**Figura 12A**, grupo 4) y ligeramente menor que la de los grupos 2 y 3. En P60, la captación de Etd⁺ en oligodendrocitos de los grupos 2 y 4 fueron similares y ligeramente más altos que en P30 (grupo 2, P30- P60 s/madre: $175 \pm 10\%$, $n = 3$, $p < 0,0001$) (**Figura 12B**) y el grupo 4, P30-P60 s/madre: $233 \pm 24\%$, $n = 3$, $p < 0,0001$) (**Figura 12B**). Sin embargo, los oligodendrocitos del grupo 3 mostraron una captación de Etd⁺ significativamente mayor que los de cualquier otro grupo, ya sea en P30 o P60 (grupo 3, P30-P60 s/madre: $442 \pm 12\%$, $n = 3$, $p < 0,0001$) (**Figura 12B**). Estos resultados dan cuenta del efecto de la exposición maternal a DEX sobre la activación de los HCs inducida durante la gestación, la crianza maternal o entre crías de igual condición.

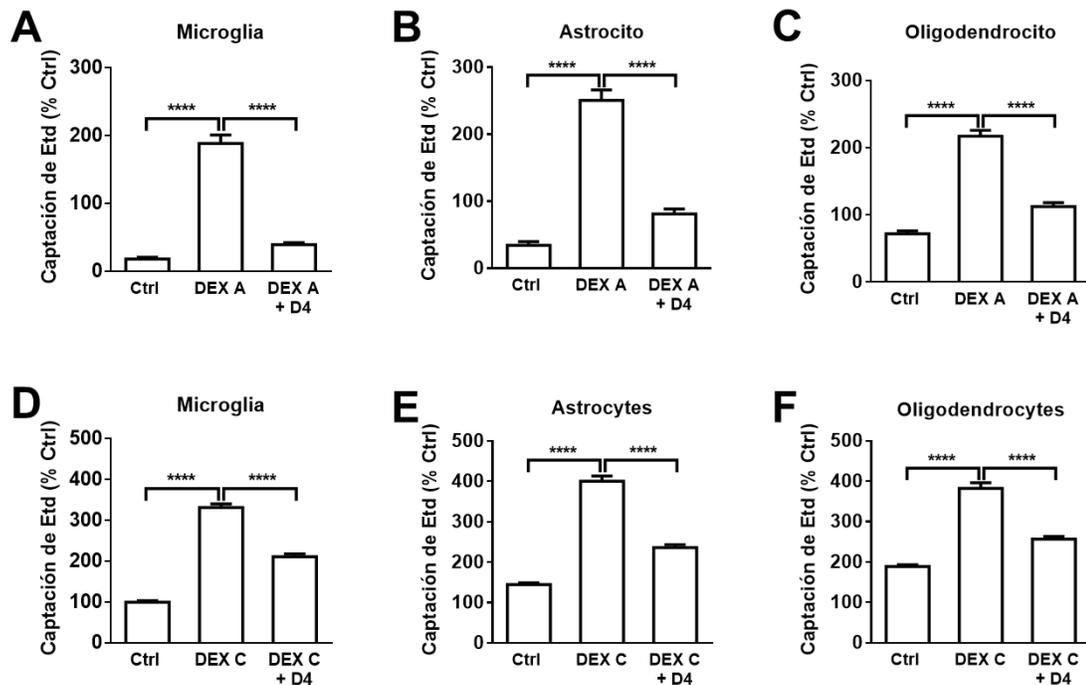


Figura 11. D4 bloquea la actividad de los HCs gliales inducida por la exposición prenatal a DEX en rebanadas de cerebro de ratones recién nacidos. Los datos corresponden al promedio de la captación de Etd+ expresado como porcentaje de cambio en relación a la condición control de (A) microglías, (B) astrocitos y (C) oligodendrocitos en cortes de hipocampo de crías controles, tratadas con DEX agudo (DEX A), DEX crónico (DEX C) y el efecto de D4 (10 nM) aplicado previo al ensayo de captación de Etd+. Los datos se presentan como la media \pm SEM. **** $p < 0,0001$ en comparación a la condición control o el efecto del bloqueador. Datos promediados se obtuvieron a partir de 120 células. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

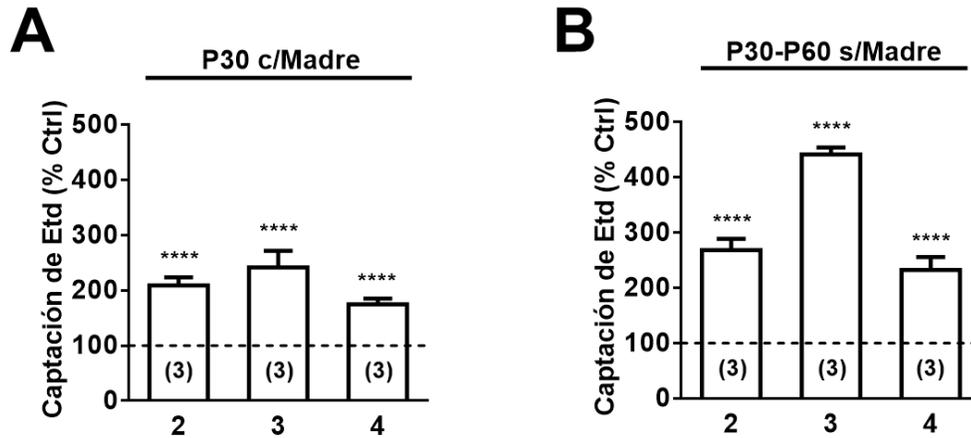


Figura 12. La actividad de los HCs de los oligodendrocitos permanece alta en las crías de madres tratadas con DEX y criadas por una madre no tratada. Los datos corresponden al promedio de la captación de Etd⁺ normalizado a la condición control de oligodendrocitos de crías controles (grupo 1, línea discontinua), tratadas con DEX (grupo 2) y sometidas a experimentación (grupos 3 y 4) al día (A) P30 y (B) P60. Las camadas fueron entrecruzadas de acuerdo a cuatro grupos experimentales de animales: grupo de control 1, la madre control crío sus propias camadas (control simulado); grupo de control 2, madre tratada con DEX cuidó sus propias crías; grupo experimental 3, crías de una madre tratada con DEX que fueron criadas por una madre no tratada y grupo experimental 4, crías de una madre no tratada que fueron criadas por una madre tratada con DEX. P: día postnatal, c/madre: con madre, s/madre: sin madre. Los s/madre se mantuvieron durante el segundo mes de vida junto a sus hermanos del mismo sexo. **** p<0,0001 comparado a la condición control de cada edad respectiva. Datos promediados se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

1.7 El bloqueo de activación de mastocitos o microglías disminuye la actividad de los HCs en oligodendrocitos inducida por DEX o Ucn II en rebanadas de cerebro de neonatos.

Para identificar los tipos celulares involucrados en el aumento de la actividad de los HCs inducida por estrés prenatal en oligodendrocitos se estudió si el bloqueo de CRHR, presente en mastocitos, microglías y astrocitos (Stevens y cols., 2003; Wang y cols., 2007; Alysandratos y cols., 2012) afecta la respuesta inducida por DEX o Ucn II en rebanadas de hipocampo. Se utilizó antalarmina, un antagonista no peptídico de CRFR1 (Dermitzaki y cols., 2014), masitinib, un inhibidor del receptor tirosina cinasa c-kit/PDGF y minociclina, bloqueador principalmente la activación de microglías (Dutta y cols., 2008). La captación de Etd⁺ fue evaluada en experimentos de “snapshot” en oligodendrocitos PLP positivos presentes en rebanadas hipocampales de neonatos sanos. No se detectó un cambio evidente de la captación de Etd⁺ en oligodendrocitos incubados por 10 o 20 min con DEX (10 nM) (Chen y cols., 2003), comparado con la condición control (Figura 13). Sin embargo, a los 30 min de tratamiento con DEX se observó un prominente aumento en la captación de Etd⁺ ($271 \pm 17\%$ comparado con el control, $n=3$, $p<0,0001$) (Figura 13A). La captación de Etd⁺ inducida por DEX (30 min) fue bloqueada con ¹⁰panx1 (200 μ M), Gap26 (200 μ M) o A740003 (10 μ M) ($75 \pm 10\%$; $94 \pm 23\%$; $105 \pm 5\%$ comparado con DEX, respectivamente, $n=3$, $p<0,0001$) (Figura 13B). Además, la captación de Etd⁺ inducida por DEX no se detectó en los oligodendrocitos pretratados por 20 min con antalarmina (10 μ M), masitinib (10 μ M) o minociclina (10 μ M)

($114 \pm 7\%$; $74 \pm 6\%$; $95 \pm 7\%$ comparado con los tratados con DEX, respectivamente, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 13B**).

Bajo estrés prenatal, la degranulación de los mastocitos inducida por CRH es muy rápida y libera potentes mediadores pro-inflamatorios pre-formados (**Theoharides y cols., 1995; Theoharides y cols., 2004; Wang y cols., 2007**). Por tanto, se estudió el efecto de Ucn II sobre la actividad de HCs de los oligodendrocitos en rebanadas de hipocampo. El tratamiento con Ucn II (10 nM, 30 min) aumentó la captación de Etd⁺ en oligodendrocitos ($362 \pm 23\%$ comparado con el control, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 14**). Además, la captación de Etd⁺ inducida por Ucn II fue casi completamente bloqueada por ¹⁰Panx1 (200 μM), Gap26 (200 μM) o A740003 (10 μM) ($78 \pm 8\%$; $87 \pm 13\%$; $82 \pm 12\%$ comparado con DEX, respectivamente, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 14**). La captación de Etd⁺ inducida por Ucn II en oligodendrocitos también fue bloqueada por antalarmina (10 μM), masitinib (10 μM) o minociclina (10 μM) ($102 \pm 5\%$; $124 \pm 12\%$; $92 \pm 5\%$ comparado con DEX, respectivamente, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 14**). Cabe destacar que los oligodendrocitos no presentaron cambio morfológicos entre el control y las 3 h de exposición a DEX, a lo cual se pudiera atribuir el aumento en la captación de Etd⁺ después de los 30 min de estimulación con DEX (datos no mostrados). Por consiguiente, la actividad de los HCs en los oligodendrocitos es inducida por los mastocitos, microglias y astrocito vía CRHR1/Cx43/Panx1.

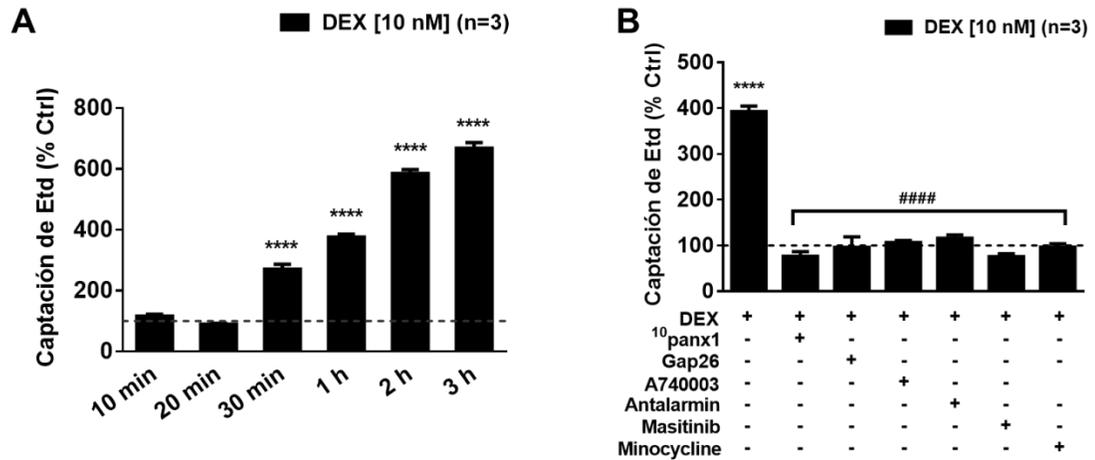


Figura 13. El bloqueo de la activación de los mastocitos y microglías reduce la actividad de los HCs en oligodendrocitos inducida por DEX en rebanadas de cerebro. (A) las rebanadas del cerebro se trataron con 10 nM DEX o vehículo (control) durante 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h y 3 h. Los datos se presentan como las veces de cambio relativo al control para cada punto en el tiempo. Los datos corresponden al promedio de la captación de Etd⁺ normalizado a la condición control (línea discontinua) de oligodendrocitos presentes en rebanadas de cerebros (B) tratadas con DEX (10 nM; 30 min) y el efecto de bloqueadores aplicados previo al ensayo captación de Etd⁺: ¹⁰panx1 (200 μM), Gap26 (200 μM), A740003 (10 μM), antalarmina (10 μM), masitinib (10 μM) o minociclina (10 μM). DEX: dexametasona. Los datos corresponden al promedio ± SEM obtenidos de tres experimentos independientes. ****p<0,0001 con respecto a la condición control; #####p<0,0001 efecto de cada bloqueador en comparación con el efecto inducido por DEX. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

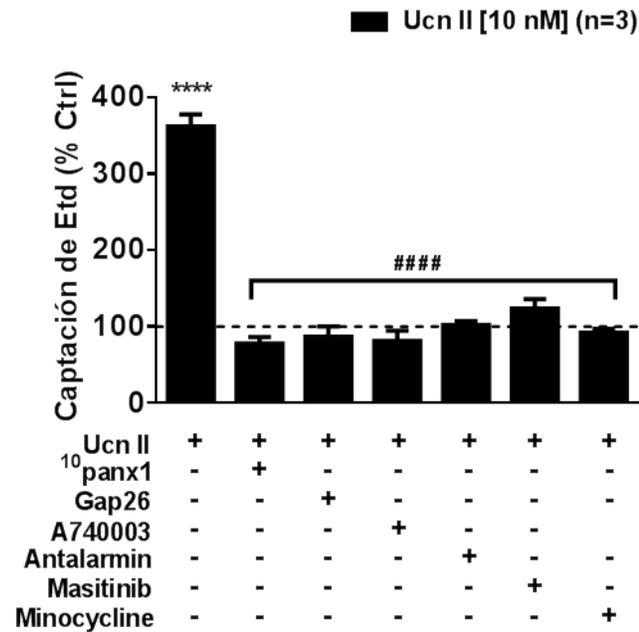


Figura 14. El bloqueo de la activación de los mastocitos y microglías reduce la actividad de los HCs en oligodendrocitos inducida por Ucn II en rebanadas de cerebro. Los datos se presentan como las veces de cambio relativo al control para cada punto en el tiempo. Los datos corresponden al promedio de la captación de Etd⁺ normalizado a la condición control (línea discontinua) de oligodendrocitos presentes en rebanadas de cerebros tratadas con Ucn II (10 nM; 30 min) y el efecto de bloqueadores de HCs y P2X₇R aplicados previo al ensayo captación de Etd⁺: ¹⁰panx1 (200 μM), Gap26 (200 μM) o A740003 (10 μM) y el efecto de los inhibidores de actividad celular antalarmina (10 μM), masitinib (10 μM) o minociclina (10 μM) aplicados previo al ensayo de captación Etd⁺. Ucn II: urocortina. Los datos corresponden al promedio ± SEM obtenidos de tres experimentos independientes. ****p<0,0001 con respecto a la condición control; ####p<0,0001 efecto de cada bloqueador en comparación con el efecto inducido por Ucn II. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

1.8 DEX incrementa la actividad de los HCs en mastocitos, microglías, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas de manera célula y tiempo dependiente.

De acuerdo a los resultados descritos en el punto 1.3, el bloqueo de HCs Panxs y Cxs inhibe el aumento de la actividad de estos en respuesta a un estímulo de DEX durante 1h en oligodendrocitos, evidenciando una posible vía de señalización río arriba de los oligodendrocitos en respuesta al estrés. En base a lo anterior, se evaluó si existe un incremento de la actividad de HCs en relación al tiempo de exposición a DEX en los diferentes tipos celulares del cerebro. Rebanadas de cerebro de neonatos sanos P2 fueron incubadas con DEX (10 nM) durante 10, 20 y 30 min previo al ensayo de captación de Etd⁺. Mediante inmunofluorescencia se evaluó la actividad de HCs en los distintos tipos celulares utilizando anticuerpo específico para mastocitos (M), microglías (MΦ), astrocitos (A), oligodendrocitos (O) y neuronas (N). El tratamiento con DEX durante 10 min no aumentó la captación de Etd⁺ en ningún tipo celular con respecto a su control celular (**Figura 15A**). Sin embargo, luego de 20 min de tratamiento con DEX los mastocitos son las primeras células en aumentar la captación de Etd⁺ (317 ± 17% comparado con el control, n=3, p<0,001) (**Figura 15B**). Mientras que a los 30 min de tratamiento con DEX, los mastocitos mantienen la captación de Etd⁺ (314 ± 1% comparado con el control, n=3, p<0,001) (**Figura 15C**) y tanto las microglías, astrocitos como los oligodendrocitos incrementan la captación de Etd⁺; microglías (309 ± 9% comparado con el control, n=3, p<0,001) (**Figura 15C**), astrocitos (305 ± 13% comparado con el control, n=3, p<0,001) (**Figura 15C**) y oligodendrocitos (329 ± 11% comparado con el control, n=3, p<0,001) (**Figura 15C**). No se observó captación de Etd⁺

durante todo el curso temporal en las neuronas (**Figura 15**). Estos resultados en conjunto demuestran un patrón de orden de respuesta de los distintos tipos celular en función del tiempo inducido por DEX.

1.9 IL-1 β y TNF- α incrementan la apertura de los HCs en oligodendrocitos.

Se ha descrito que las citocinas pro-inflamatorias, IL-1 β y TNF- α , inducen activación de HCs Cx43 en astrocitos y su inhibición tiene un efecto neuroprotectivo (**Froger y cols., 2010**). Para determinar si las citocinas secretadas durante la activación del inflamasoma afectan el estado funcional de los HCs de oligodendrocitos, se evaluó la tasa de captación de Etd⁺ en oligodendrocitos en cultivo. Las células se estimularon con IL-1 β (1 ng/ml) o TNF- α (1 ng/ml) y a la captación de Etd⁺ se evaluó 1, 6, 12, 24 y 48 h post-tratamiento. IL-1 β aumentó significativamente la captación de Etd⁺ comparada al tiempo cero a 1, 24 y 48 h (**Figura 16A**). Sin embargo no se observó un aumento a las 6 y 12 h post-tratamiento (**Figura 16A**). Por otra parte, TNF- α aumentó la actividad de los HCs sólo a las 48 h con respecto al tiempo cero (**Figura 16B**). El tratamiento por 48 h con IL-1 β o TNF- α aumentó significativamente la actividad de los HCs, respuesta que fue bloqueada completamente por La³⁺ (**Figura 16C**). Estos resultados indican que las citocinas pro-inflamatorias participan en la activación de HCs Cxs y HCs Panx presentes en oligodendrocitos.

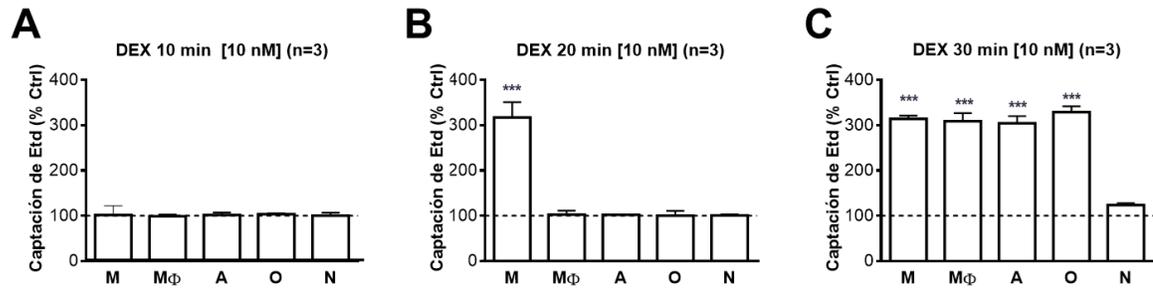


Figura 15. DEX incrementa la actividad de los HCs en mastocitos, microglías, astrocitos y oligodendrocitos de manera célula y tiempo dependiente. Las rebanadas de cerebro se trataron con 10 nM DEX o vehículo (control) durante (A) 10 min, (B) 20 min y (C) 30 min. Los datos se presentan como las veces de cambio relativo al control para cada punto en el tiempo. Los datos corresponden al promedio de la captación de Etd⁺ normalizada a la condición control (línea discontinua) de mastocitos (M), microglías (MΦ), astrocitos (A), oligodendrocitos (O) y neuronas (N) en rebanadas de cerebro tratadas con DEX. Los datos corresponden al promedio \pm SEM obtenidos de tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$ con respecto a la condición control. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

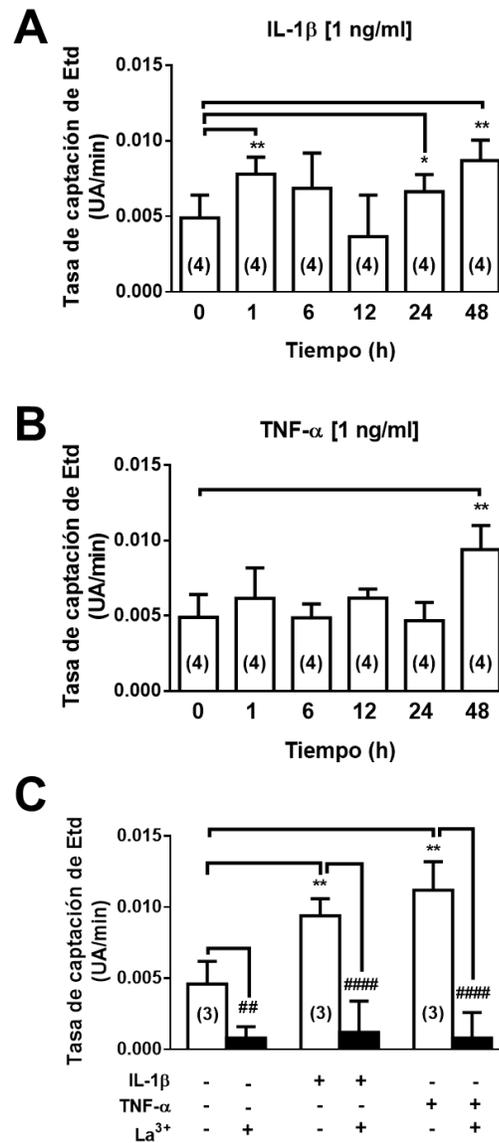


Figura 16. TNF- α e IL-1 β inducen apertura de los HCs de oligodendrocitos en cultivo.

Curso temporal de la captación de Etd⁺ en oligodendrocitos en cultivo tratados con (A) IL-1 β (1 ng/ml) y (B) TNF- α (1 ng/ml) evaluada 1, 6, 12, 24 y 48 h post-tratamiento. El número en cada barra indica el valor de experimentos independientes. UA: unidades arbitrarias. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. **p<0,01 con respecto al tiempo cero. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

1.10 Participación de CD14 en la activación de la respuesta inflamatoria mediada por los receptores de TLR4 e inducida en oligodendrocitos de ratones neonatos de madres tratadas con DEX.

Se ha propuesto que el estrés induce un aumento en la permeabilidad intestinal que permite la translocación de LPS desde enterobacterias Gram negativas a través de la barrera epitelial y que activa una respuesta inmune en la mucosa (**Krishnan, 2015**). Bayley y cols. (2004) demostraron que el estrés prenatal en monos Rhesus induce una perturbación en la microflora intestinal de los recién nacidos. Por tanto, se estudió si CD14 contribuye a la activación de TLR4 inducida por DEX crónico. Se determinó por qRT-PCR la expresión a nivel de mRNA de TLR4 y CD14 en oligodendrocitos de ratones recién nacidos de madres tratadas con DEX. Los niveles de mRNA de TLR4 y CD14 aumentaron significativamente con respecto a los niveles controles. El nivel de mRNA de TLR4 incrementó ~17 veces (**Figura 17A**) y de CD14 aumentó ~4 veces (**Figura 17B**). Estos resultados sugieren que el aumento de TLR4 y CD14 es inducido por la exposición prenatal a GCs y además sugieren un rol potencial de TLR4 en la neuroinflamación inducida por estrés.

1.11 Los niveles del mRNA de Panx1 y P2X₇R aumentan en oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX.

Se ha descrito que la estimulación con ATP puede activar a los inflammasomas NLRP2 (**Minkiewicz y cols., 2013**) y NLRP3 (**Silverman y cols., 2009**) a través de P2X₇R. En el

presente trabajo se utilizó la técnica de qRT-PCR para examinar los niveles de mRNA de dos componentes claves para la activación del inflamasoma en oligodendrocitos de ratones recién nacidos de madres tratadas con DEX crónico. Los niveles de mRNA de ambas proteínas de membrana mostraron un aumento significativo en comparación con los respectivos valores controles. El nivel de mRNA de P2X₇R aumentó ~3 veces (**Figura 17C**) y Panx1 aumentó ~5 veces (**Figura 17D**). Esta evidencia sugiere una asociación entre el inflamasoma, Panx1 y P2X₇R en cultivos de oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX.

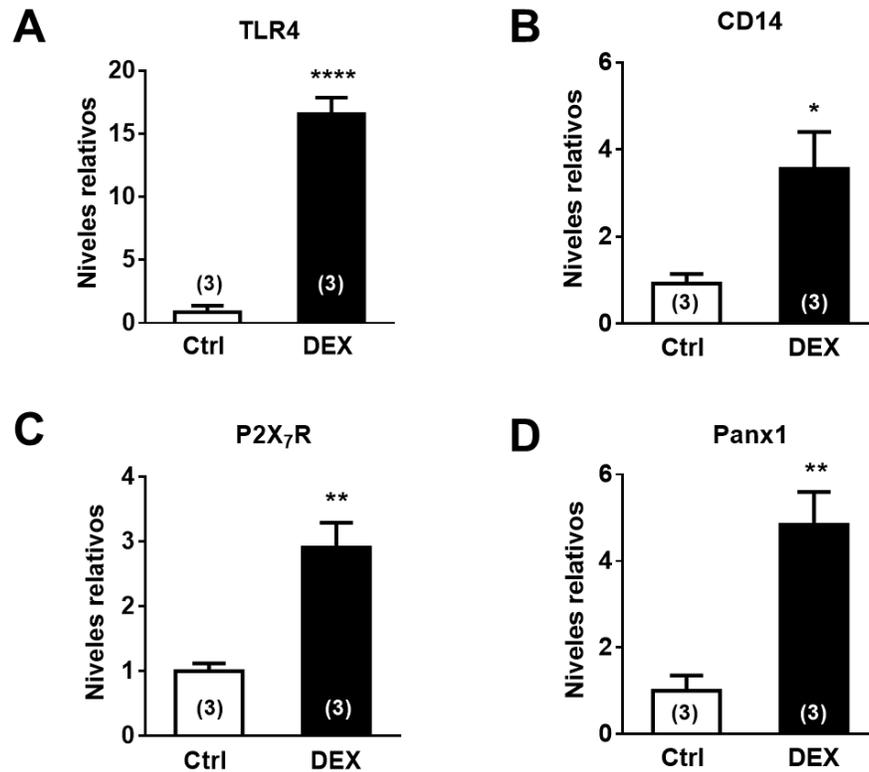


Figura 17. La exposición prenatal a DEX aumenta los niveles de mRNA de proteínas de membrana que participan en la activación del inflamasoma de oligodendrocitos de las crías. A partir de cultivos de oligodendrocitos de ratones crías de madres controles o tratadas con DEX se extrajo el RNA total y se transcribió el cDNA. Los niveles de mRNA se determinaron mediante Q-PCR utilizando una curva estándar: (A) TLR4, (B) CD14, (C) P2X₇R y (D) Panx1. El gen GAPDH se utilizó para normalizar los datos. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. * p < 0,05, ** p < 0,01, **** p < 0,0001 en comparación a la condición control. Estadística: test de *t* de Student.

1.12 Los niveles de mRNA de Cx29 y Cx32, pero no Cx47, aumentan en oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX.

Se ha descrito que los oligodendrocitos expresan Cx29, Cx32 y Cx47 (**Nualart-Martí y cols., 2013; Li y cols., 2014**). Si bien no existe evidencia de la participación de los HCs Cxs en la formación del inflamasoma en oligodendrocitos se estudió si la exposición prenatal a DEX crónico afecta a los niveles de mRNA de Cx29, Cx32 y Cx47 por qRT-PCR en oligodendrocitos de crías de madres tratadas. Se encontró que el nivel de mRNA de la Cx29 aumenta 1,6 veces (**Figura 18A**) y el de la Cx32 aumenta 14 veces (**Figura 18B**), mientras que Cx47 no presentó un cambio significativo con respecto al control (**Figura 18C**).

1.13 Los niveles de IL-1 β e iNOS no cambian en oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX.

La activación de la vía de señalización de TLR4 (**Singhal y cols., 2014**), requerida como prerequisite para la formación del inflamasoma, puede desencadenar la inducción transcripcional de genes que codifican para citocinas, como TNF- α , IL-6 y mediadores inflamatorios, como iNOS y COX-2 (**Krishnan, 2015**). Por tanto, se decidió evaluar los niveles de mRNA de TNF- α , IL-1 β y el mediador inflamatorio iNOS por qRT-PCR en oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX crónico. Los niveles del transcrito de TNF- α aumentaron significativamente con respecto al valor control (~7 veces) (**Figura 19B**). Sin embargo, los niveles del mensajero de iNOS disminuyeron significativamente, mientras

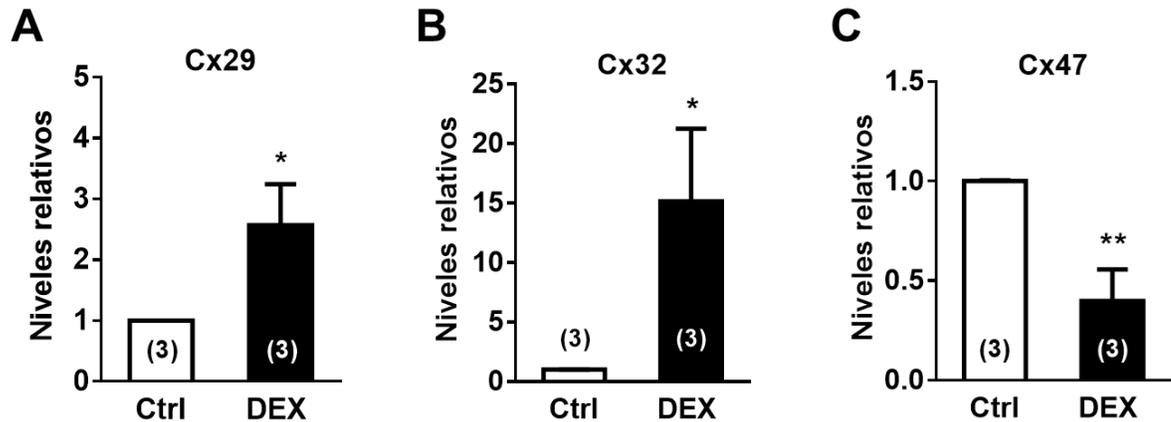


Figura 18. Los niveles de mRNA de Cx29 y Cx32 aumentan en oligodendrocitos de cultivos de crías de madres tratadas con DEX. A partir de cultivos de oligodendrocitos de ratones de crías de madres controles o tratadas con DEX se extrajo el RNA total y se transcribió el cDNA. Los niveles de mRNA se determinaron mediante qRT-PCR utilizando una curva estándar: (A) Cx29, (B) Cx32 y (C) Cx47. El gen GAPDH se utilizó para normalizar los datos. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ en comparación con las condiciones controles. Estadística: test de *t* de Student.

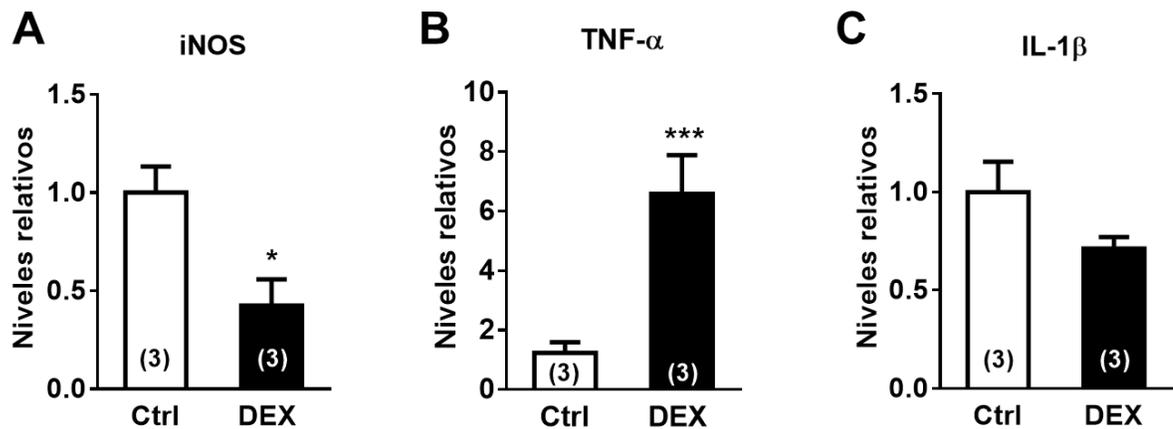


Figura 19. Los niveles de mRNA de iNOS, TNF- α e IL-1 β en oligodendrocitos en cultivo crías de madres tratadas con DEX cambian diferencialmente. A partir de cultivos de oligodendrocitos de ratones de crías de madres controles o tratadas con DEX se extrajo el RNA total y se transcribió el cDNA. Los niveles de mRNA se determinaron mediante qRT-PCR utilizando una curva estándar: (A) iNOS, (B) TNF- α y (C) IL-1 β . El gen GAPDH se utilizó para normalizar los datos. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ frente a las condiciones controles. Estadística: test de t de Student.

que los de IL-1 β no cambiaron significativamente con respecto a la condición control (**Figura 19A-C**).

1.14 Los medios condicionados de astrocitos o microglías de crías de madres tratadas con DEX aumentan los niveles de mRNA de componentes del inflammasoma en oligodendrocitos.

Los astrocitos y microglías expresan los inflammasomas NLRP2 (**Minkiewicz y cols., 2013**) y NLRP3 (**Pan y cols., 2014**), respectivamente. En ambos tipos celulares se ha demostrado la maduración y liberación de IL-1 β . Sin embargo, en un trabajo reciente se planteó que cultivos de astrocitos de rata y ratón libres de microglías no secretan IL-1 β o IL-18 (**Facci y cols., 2014; Gustin y cols., 2015**). Además, se desconoce si estos tipos celulares promueven la activación del inflammasoma en oligodendrocitos. Por tanto, se estudió el efecto de los medios condicionados de microglías o astrocitos sobre los niveles de los mensajeros que codifican para componentes del inflammasoma en oligodendrocitos.

Los medios condicionados de microglías o astrocitos de crías de madres tratadas con DEX aumentaron significativamente los niveles de mRNA de componentes del inflammasoma en oligodendrocitos controles. Además, se encontró un aumento de ~12 y 13 veces en el mensajero de TLR4 en oligodendrocitos estimulados con medios condicionados de microglía y astrocitos, respectivamente (**Figura 20A**); un aumento de ~7 y 10 en el nivel del mensajero de CD14 en oligodendrocitos estimulados con medios condicionados de microglía y astrocitos, respectivamente (**Figura 20B**); un aumento de ~3 y 4 veces en los niveles del mensajero de P2X₇R en oligodendrocitos estimulados con medios condicionados de microglía y astrocitos,

respectivamente (**Figura 20C**) y un aumento de ~19 y 20 veces en los niveles del mensajero de Panx1 en oligodendrocitos estimulados con medios condicionados de microglia y astrocitos, respectivamente (**Figura 20D**). Sin embargo, los medios condicionados de oligodendrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX solo aumentaron los niveles del mRNA de Panx1 en oligodendrocitos controles (**Figura 20C**). Además, se encontró un aumento de ~8 y 12 veces en los niveles del mensajero de Cx29 (**Figura 21A**), un aumento de ~7 y 9 veces en los niveles del mensajero de Cx32 (**Figura 21B**); y un aumento de ~4 y 5 veces en los niveles del mensajero de Cx47 (**Figura 21C**) en oligodendrocitos estimulados con medios condicionados de microglia y astrocitos, respectivamente. Por lo tanto, productos liberados por microglia y/o astrocitos podrían inducir el aumento en los niveles de mRNA de las proteínas que participan de la activación de inflamasoma en oligodendrocitos.

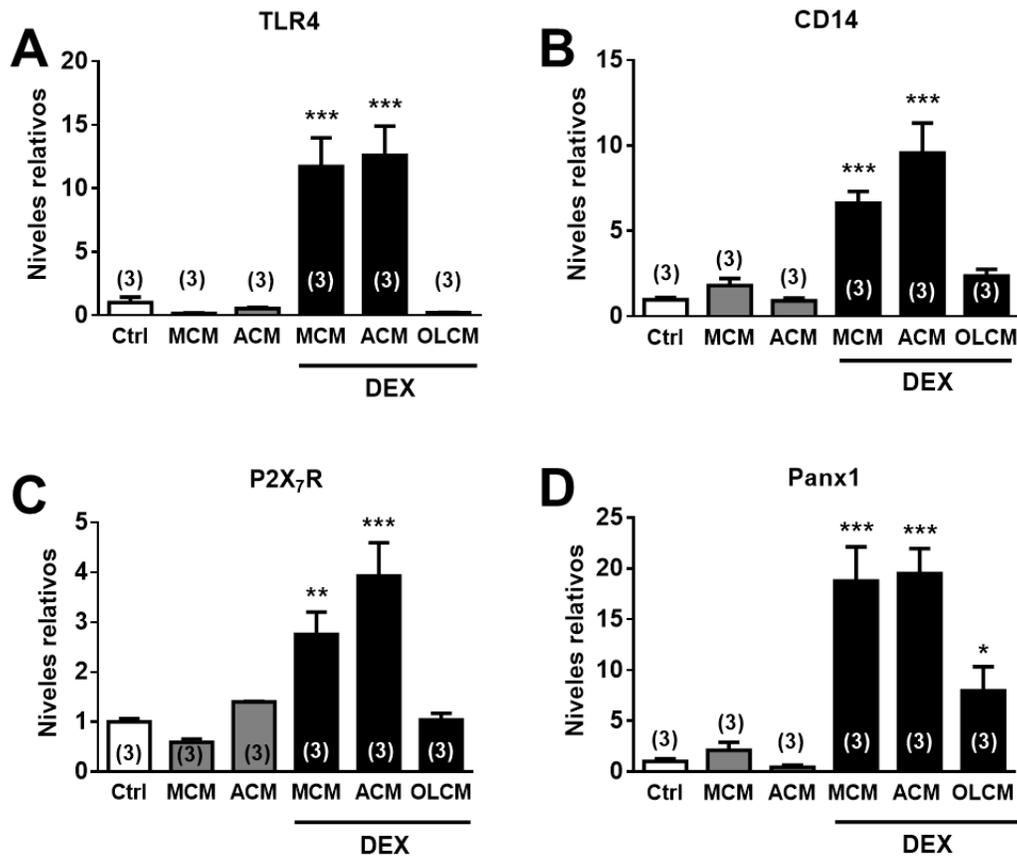


Figura 20. Medios condicionados de microglías o astrocitos de crías de madres tratadas con DEX aumentan los niveles de mRNA de proteínas de membrana que participan en la activación del inflammasoma en oligodendrocitos. A partir de cultivos de oligodendrocitos de ratones de crías de madres controles o tratadas con DEX se extrajo el RNA total y se transcribió el cDNA. Los niveles de mRNA se determinaron mediante qRT-PCR utilizando una curva estándar. Cultivos de oligodendrocitos fueron estimulados con el medio condicionado de microglías, astrocitos u oligodendrocitos de crías de madres controles y tratadas con DEX. MCM (Medio condicionado de microglías), ACM (Medio condicionado de astrocyto), OLCM (Medio condicionado de oligodendrocito). Cuarenta y ocho horas más tarde se determinaron los niveles de mRNA de (A) TLR4, (B) CD14, (C) P2X₇R y (D) Panx1. El mRNA de GAPDH se utilizó para normalizar los datos. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ frente a las condiciones controles. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

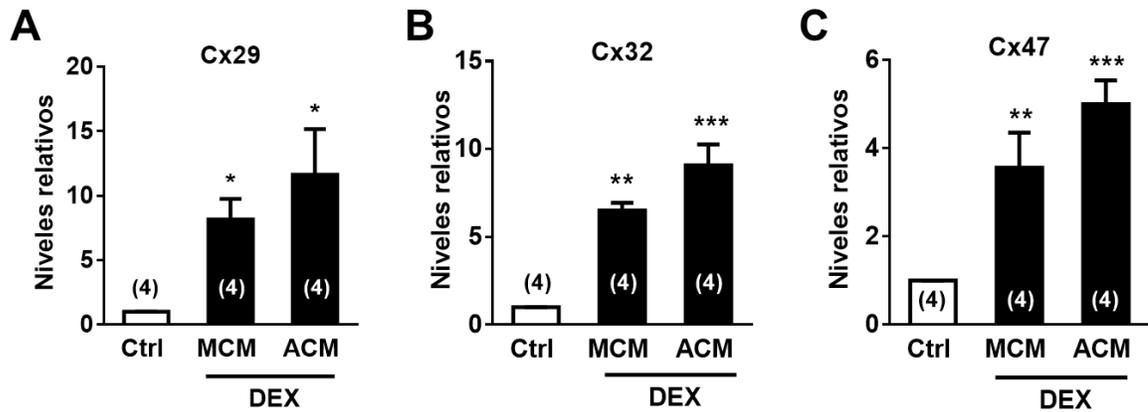


Figura 21. Los medios condicionados de microglías o astrocitos de crías de madres tratadas con DEX aumentan los niveles de mRNA de Cxs en oligodendrocitos de animales controles. A partir de cultivos de oligodendrocitos de ratones de crías de madres control o tratadas con DEX se extrajo el RNA total y se transcribió el cDNA. Los niveles de mRNA se determinaron mediante **qRT-PCR** utilizando una curva estándar. Cultivos de oligodendrocitos fueron estimulados con el medio condicionado de microglías (MCM), astrocitos (ACM) u oligodendrocitos (OLCM) de crías de madres controles o tratadas con DEX. Cuarenta y ocho horas más tarde se determinaron los niveles de mRNA de (A) Cx29, (B) Cx32 y (C) Cx47. El gen GAPDH se utilizó para normalizar los datos. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ con respecto a la condiciones controles. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

1.15 Los medios condicionados de microglías o de astrocitos de crías de madres tratadas con DEX inducen un incremento en los niveles de mRNA de IL-1 β , TNF- α e iNOS en oligodendrocitos controles.

Los resultados previamente mostrados indican que los oligodendrocitos de crías provenientes de madres tratadas con DEX no aumentan los niveles del mRNA de IL-1 β , lo que sugiere que en estas células sólo se expresan los componentes requeridos para la formación del inflamasoma pero sin activación de Casp-1. Con el propósito de evaluar si el MCM y ACM de crías de madres tratadas con DEX durante la gestación afecta los niveles de los mRNAs de IL-1 β , TNF- α e iNOS en oligodendrocitos controles, se midieron los niveles de estos transcritos por qRT-PCR. Los MCM y ACM de células de animales tratadas aumentaron, respectivamente, ~ 2 y ~ 7 veces en los niveles de mRNA de iNOS (**Figura 22A**); ~ 7 y ~ 9 veces en los niveles de mRNA de TNF- α (**Figura 22B**) y ~ 16 y ~ 26 veces en los niveles de mRNA de IL-1 β (**Figura 22C**) en oligodendrocitos de crías controles. Sin embargo, los MCM y ACM provenientes de crías de madres no tratadas (controles) no afectaron los niveles de mRNA de los mediadores inflamatorios en oligodendrocitos controles (**Figura 22A-C**). Estos resultados sugieren que los productos liberados por microglías y/o astrocitos de crías de madres tratadas con DEX inducen la activación del inflamasoma con el consecuente aumento en los niveles de mRNA de los productos del inflamasoma.

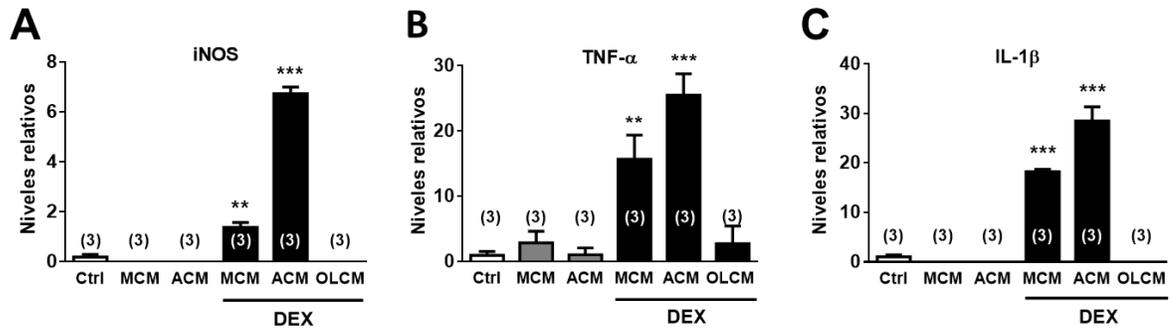


Figura 22. Medios condicionados de cultivo de microglías o astrocitos de crías de madres tratadas con DEX aumentan los niveles de mRNA de los productos del inflammasoma en oligodendrocitos controles. A partir de cultivos de oligodendrocitos de crías de madres controles o tratadas con DEX se extrajo el RNA total y se transcribió el cDNA. Los niveles de mRNA se determinaron mediante qRT-PCR utilizando una curva estándar. Cultivos de oligodendrocitos fueron estimulados con el medio condicionado de microglías (MCM), astrocitos (ACM) u oligodendrocitos (OLCM) de crías de madres controles o tratadas. Cuarenta y ocho horas más tarde se determinaron los niveles de mRNA de (A) iNOS, (B) TNF- α y (C) IL-1 β . El nivel de mensajero de GAPDH se utilizó para normalizar los datos. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ con respecto a la condición control. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

1.16 Cultivos de microglías y astrocitos de crías de madres tratadas con DEX liberan citocinas pro-inflamatorias y quimocinas.

De acuerdo a los resultados descritos en el punto anterior 1.15, los medios condicionados de microglías y astrocitos aumentaron los niveles de mRNA del principal producto del inflamasoma, IL-1 β , a diferencia de los medios condicionados de oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX. Probablemente tales medios condicionados puedan contener las citocinas TNF- α y IL-1 β y de esta forma inducir la activación del inflamasoma NLRP3. Por lo tanto se determinó la presencia de citocinas pro-inflamatorias y quimocinas en los medios de cultivo de microglías y astrocitos mediante un kit de quimioluminiscencia. Como se observa en la **Tabla 1** los niveles de IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4 en microglías, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70 en astrocitos, IL-17, proteína quimioatrayente de monocitos-1 ((MCP-1) en astrocitos, INF γ , TNF- α , proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP-1 α) en astrocitos), factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) aumentaron. Sin embargo, los niveles de IL-12p70 y MCP-1 en microglías y IL-4 en astrocitos disminuyeron y IL-2, RANTES y MCP-1 en astrocitos no se modificaron. Estos datos sugieren que TNF- α y IL-1 β liberados por microglías y astrocitos pueden activar el inflamasoma NLRP3 en oligodendrocitos.

Citocinas	Microglia CM (pg/ml)			Astrocito CM (pg/ml)		
	Control	Estrés	Valor P	Control	Estrés	Valor P
IL-1 α	123.7 \pm 4.6	454.6 \pm 102.8	<0.1	125.7 \pm 18.1	184.6 \pm 23.4	<0.01
IL-1 β	528.3 \pm 75.2	2063.1 \pm 107.9	<0.01	308.0 \pm 47.1	670.3 \pm 79.9	<0.0001
IL-2	48.3 \pm 7.1	44.9 \pm 8.7	ns	49.9 \pm 7.3	57.2 \pm 3.6	ns
IL-3	148.2 \pm 14.4	201.9 \pm 6.4	<0.0001	148.0 \pm 10.6	169.9 \pm 15.9	ns
IL-4	131.4 \pm 27.1	1436.8 \pm 166.2	<0.01	297.8 \pm 48.1	207.2 \pm 43.4	ns
IL-5	1797.3 \pm 0.4	7423.9 \pm 156.2	<0.02	1077.1 \pm 137.7	1255.7 \pm 166.4	ns
IL-6	2950.9 \pm 83.9	7806.9 \pm 103.9	<0.0001	1105.5 \pm 140.0	1982.2 \pm 131.0	<0.01
IL-10	70.9 \pm 8.3	120.3 \pm 39.7	ns	69.2 \pm 3.3	82.4 \pm 14.9	ns
IL-12p70	141.9 \pm 20.4	127.8 \pm 36.0	ns	182.8 \pm 30.7	200.6 \pm 48.9	ns
IL-17	478.8 \pm 147.9	829.9 \pm 128.1	<0.02	298.6 \pm 32.7	342.1 \pm 41.6	ns
MCP-1	3195.2 \pm 128.9	2694.1 \pm 115.7	ns	4941.4 \pm 15.2	4970.9 \pm 21.5	ns
IFN γ	172.2 \pm 25.7	287.1 \pm 91.1	ns	200.7 \pm 27.7	220.4 \pm 8.3	ns
TNF α	951.4 \pm 177.7	1894.6 \pm 151.4	<0.003	1052.7 \pm 79.9	1784.4 \pm 127.3	<0.0001
MIP-1 α	5848.0 \pm 151.9	6862.4 \pm 139.9	ns	2080.3 \pm 352.5	3321.7 \pm 12.5	<0.01
GMCSF	588.4 \pm 33.9	766.8 \pm 101.5	ns	1374.9 \pm 338.5	1886.2 \pm 141.4	ns
RANTES	117.0 \pm 18.9	100.0 \pm 18.5	ns	97.6 \pm 15.5	88.4 \pm 12.3	ns

Tabla 1. Altos niveles de citocinas pro-inflamatorias en medios condicionados de microglías y astrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX. Los niveles de citocinas y quimocinas se midieron en cultivos puros de microglías y astrocitos de crías de madres tratadas con DEX utilizando múltiplex QUANSYS Q-Plex y analizados con Imager con Q-View Software (Quansys Biosciences). CM: Medio condicionado. Los datos promediados se obtuvieron en 3 experimentos independientes.

1.17 IL-1 β y TNF- α aumentan la expresión del inflamasoma NLRP3 y mediadores pro-inflamatorios en cultivos de oligodendrocitos sanos.

Estudios en pacientes con enfermedades autoinflamatorias han demostrado que citocinas como IL-1 β y TNF- α pueden promover la activación del inflamasoma NLRP3 en ausencia de estimulación microbial, participando en un asa de retroalimentación positiva para aumentar la activación de Casp-1 constitutiva (**Franchi y cols., 2009**). Como se describió en el punto 1.14 y 1.15, cultivos de oligodendrocitos sanos aumentan los niveles de mRNA de las proteínas del inflamasoma, los mediadores y el producto del inflamasoma cuando son expuestos a medios celulares de microglías o astrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX, lo cual se co-relaciona con el aumento de los niveles de las principales citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α , determinadas en estos medios condicionados (descrito en el punto 1.16). Para determinar el efecto directo de las citocinas pro-inflamatorias en la expresión de las proteínas del inflamasoma en oligodendrocitos se utilizó como referencia el mismo tiempo de estimulación de los cultivos de oligodendrocitos para evaluar los niveles de mRNA y la concentración de IL-1 β y TNF- α que aumentan la actividad de HCs durante este mismo tiempo. Cabe destacar que la concentración utilizada de estas citocinas, es proporcional a los niveles determinados en los medios condicionados de microglías y astrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX. La exposición de cultivos de oligodendrocitos sanos durante 48 h con IL-1 β (1 ng/ml) o TNF- α (1 ng/ml) aumentó significativamente los niveles de las proteínas del inflamasoma con respecto a la condición control: NLRP3 (**Figura 23 A1-7**), ASC (**Figura 23 B1-7**) y Casp-1 (**Figura 23 C1-7**): (ctrl: 64907 \pm 1622 RFI vs. IL-1 β : 89401 \pm 1769 RFI, n=3, p<0,001 y vs. TNF- α : 93061 \pm 1172 RFI, n=3, p<0,0001) (**Figura 23 A1**), (ctrl: 139415 \pm 1453 RFI vs. IL-1 β : 246763 \pm 1088 RFI,

n=3, $p < 0,0001$ y vs. TNF- α : 220988 ± 1396 RFI, n=3, $p < 0,0001$) (**Figura 23 B1**) y (ctrl: 57942 ± 1110 RFI vs. IL-1 β : 253898 ± 1386 RFI, n=3, $p < 0,0001$ y vs. TNF- α : 292030 ± 1376 RFI, n=3, $p < 0,0001$) (**Figura 23 C1**), respectivamente.

Además, se determinó que la exposición de cultivos de oligodendrocitos durante 48 h con IL-1 β (1 ng/ml) o TNF- α (1 ng/ml) aumentó significativamente los niveles de expresión de P2X₇R (**Figura 24 A1-7**), Panx1 (**Figura 24 B1-7**) e iNOS (**Figura 24 C1-7**) con respecto a la condición control: (ctrl: 97756 ± 1663 RFI vs. IL-1 β : 142373 ± 1076 RFI, n=3, $p < 0,001$ y vs. TNF- α : 187801 ± 1191 RFI, n=3, $p < 0,0001$) (**Figura 24 A1**), (ctrl: 29607 ± 1269 RFI vs. IL-1 β : 102820 ± 1882 RFI, n=3, $p < 0,0001$ y vs. TNF- α : 83973 ± 1115 RFI, n=3, $p < 0,0001$) (**Figura 24 B1**) y (ctrl: 85228 ± 1051 RFI vs. IL-1 β : 171827 ± 1084 RFI, n=3, $p < 0,0001$ y vs. TNF- α : 177310 ± 1815 RFI, n=3, $p < 0,0001$) (**Figura 24 C1**), respectivamente.

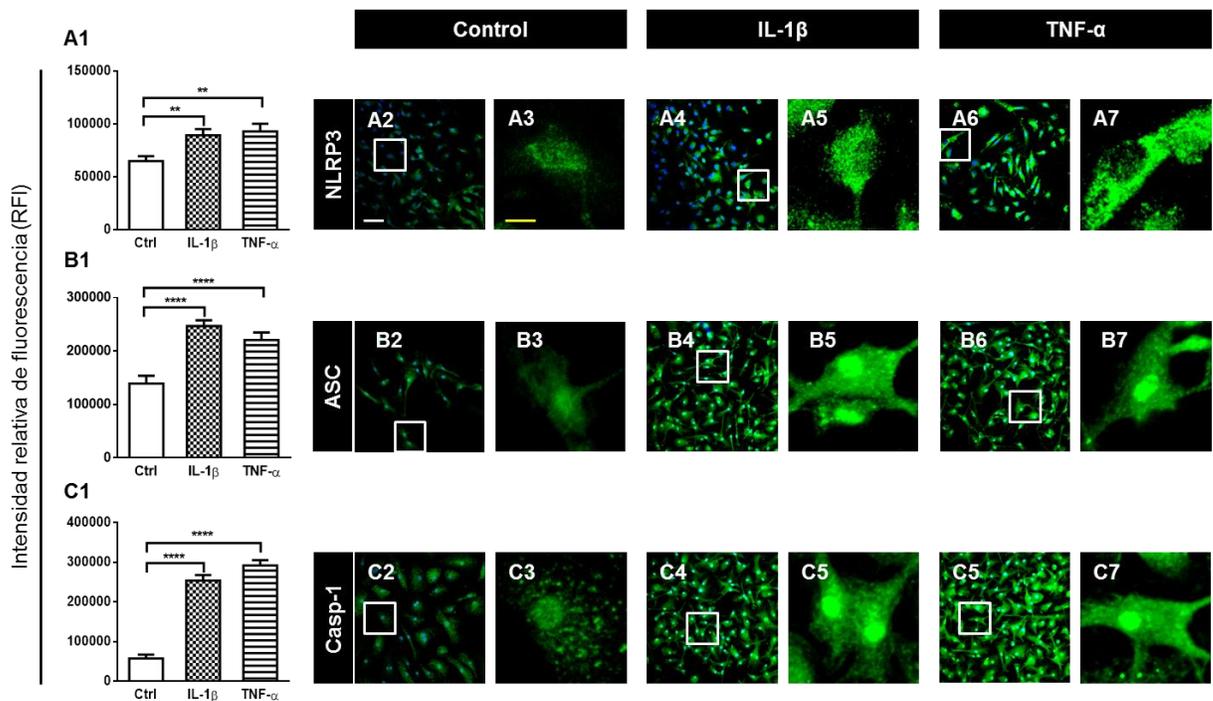


Figura 23. La exposición a IL-1β o TNF-α incrementa los niveles de NLRP3, ASC y la caspasa-1 en oligodendrocitos sanos. Intensidad de fluorescencia de (A1) NLRP3, (B1) ASC (C1) Casp-1 en oligodendrocitos positivos a PLP de cultivos controles y tratados con IL-1β (1 ng/ml) o TNF-α (1 ng/ml). *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, efecto de la exposición de IL-1β o TNF-α en comparación a la condición control. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de datos obtenidos en tres experimentos independientes. Estadística: test de *t* de Student. Imágenes representativas muestran cultivos de oligodendrocitos. La inmunodetección de NLRP3, ASC y la caspasa-1 (verde) y DAPI (azul) de oligodendrocitos de crías de ratones control (A2-A3, B2-B3, C2-C3), expuestos a IL-1β (A4-A5, B4-B5, C4-C5) y expuestos a TNF-α (A6-A7, B6-B7, C6-C7). A3, B3, C3, A5, B5, C5, A7, B7 y C7 muestran ampliaciones de las áreas demarcadas dentro del cuadro blanco de los paneles A2, B2, C2, A4, B4, C4, A6, B6 y C6, respectivamente. Barras de calibración: amarillo = 10 μ m y blanco = 30 μ m. Datos representativos obtenidos en tres experimentos independientes.

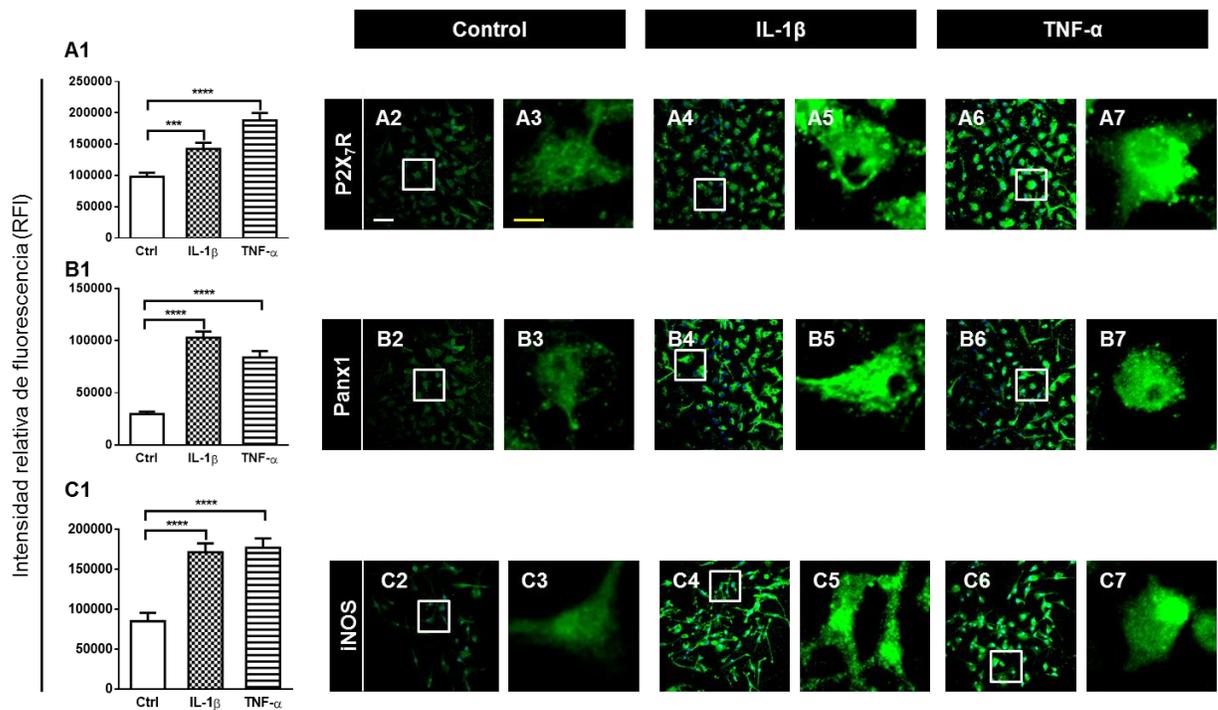


Figura 24. La exposición a IL-1 β o TNF- α incrementa los niveles de P2X₇R, Panx1 e iNOS en oligodendrocitos sanos. Intensidad de fluorescencia de (A1) P2X₇R, (B1) Panx1 (C1) iNOS en oligodendrocitos positivos a PLP de cultivos controles y tratados con IL-1 β (1 ng/ml) o TNF- α (1 ng/ml). *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, efecto de la exposición de IL-1 β o TNF- α en comparación a la condición control. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de datos obtenidos en tres experimentos independientes. Estadística: test de t de Student. Imágenes representativas muestran cultivos de oligodendrocitos. La inmunodetección de P2X₇R, Panx1 y la iNOS (verde) y DAPI (azul) de oligodendrocitos de crías de ratones control (A2-A3, B2-B3, C2-C3), expuestos a IL-1 β (A4-A5, B4-B5, C4-C5) y expuestos a TNF- α (A6-A7, B6-B7, C6-C7). A3, B3, C3, A5, B5, C5, A7, B7 y C7 muestran ampliaciones de las áreas demarcadas dentro del cuadro blanco de los paneles A2, B2, C2, A4, B4, C4, A6, B6 y C6, respectivamente. Barras de calibración: amarillo = 10 μ m y blanco = 30 μ m. Datos representativos obtenidos en tres experimentos independientes.

2 La inhibición de los HCs Cxs en células gliales previene la epilepsia inducida PTZ

2.1 PTZ incrementa la actividad de los HCs en microglías, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas de manera célula y tiempo dependiente.

Se ha descrito que el bloqueo de los GJs disminuye significativamente la actividad epiléptica tanto en modelos experimentales *in vivo* como *in vitro* (Nemani y Binder, 2005; Samoiloa y cols., 2008; Mylvaganam y cols., 2014). Por otro lado, un incremento en la expresión de mRNA y proteínas de Cxs y Panxs se ha correlacionado con la formación de GJs en proceso epileptogénicos. Recientemente, se demostró que el péptido mimético de la Cx43 inhibe la actividad epiléptica espontánea en cultivo de rebanadas hipocampales organotípicas (Samoiloa y cols., 2008). Estudios en ratas adultas tratadas con 4-aminopiridina (4-AP), un bloqueador de canales de K⁺, que gatilla convulsiones epilépticas, reduce la permeabilidad y estado de fosforilación de GJs en astrocitos, sugiriendo que la defosforilación de la Cx43 está asociada al proceso epileptogénico (Mylvaganam y cols., 2014). A pesar de los avances de los estudios en epilepsia y GJs, el rol de HCs Cxs o Panxs aún no ha sido dilucidado. Por tanto, evaluamos si durante la epilepsia se produce activación de los HCs en glías y neuronas. Además, se evaluó qué células responden bajo estas condiciones y si presentan un orden de respuesta celular. Se utilizó el agente epileptógeno PTZ, ampliamente utilizado en el estudio y desarrollo de fármacos anticonvulsivos como modelo agudo, debido a que induce actividad epiléptica dentro de 30 minutos post-inyección. Mediante inmunofluorescencia se evaluó la actividad de los HCs en los distintos tipos celulares utilizando anticuerpo específico para microglías (MΦ), astrocitos (A), oligodendrocitos (O) y neuronas (N). El promedio de datos de la captación de Etd⁺ fue normalizado a la condición control (línea punteada) de cada tipo

celular. Como se muestra en la **Figura 25**, los animales post administración de PTZ fueron evaluados conductualmente de acuerdo a las distintas fases de la convulsión. Las convulsiones fueron evidentes en ~7 min después de la administración de PTZ y pasado los ~30 min, los ratones presentaron actividad motora muy baja y contracciones esporádicas con ~70% de supervivencia. Para evaluar si los distintos tipos celulares tienen un patrón de orden de respuesta, los animales fueron eutanasiados pasado los 10, 20 y 30 min post inyección de PTZ para extraer el cerebro y realizar el posterior procesamiento. A los 10 min post administración de PTZ, los astrocitos fueron las primeras células en mostrar aumento significativo de la captación de Etd⁺ ($421 \pm 7\%$ comparado con el control, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 26A**). Mientras que a los 20 min post administración de PTZ, la captación de Etd⁺ de los astrocitos incremento aún más ($603 \pm 12\%$ comparado con el control, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 26B**) y la captación de Etd⁺ de tanto los oligodendrocitos como de las neuronas aumentó; oligodendrocitos ($425 \pm 22\%$ comparado con el control, $n=3$, $p<0,001$) (**Figura 26B**), y neuronas ($426 \pm 7\%$ comparado con el control, $n=3$, $p<0,001$) (**Figura 26B**). Después de 30 min post administración de PTZ las microglías mostraron captación de Etd⁺ ($406 \pm 7\%$ comparado con el control, $n=3$, $p<0,001$) (**Figura 26C**); en tanto que los astrocitos continuaron captando pero considerablemente menos con respecto a los 20 min ($391 \pm 9\%$ comparado con el control, $n=3$, $p<0,001$) (**Figura 26C**), al igual que los oligodendrocitos ($401 \pm 2\%$ comparado con el control, $n=3$, $p<0,001$) (**Figura 26C**). La captación de Etd⁺ de neuronas incrementó con respecto a los 20 min ($615 \pm 13\%$ comparado con el control, $n=3$, $p<0,0001$) (**Figura 26C**). Estos resultados en conjunto demuestran que durante convulsiones epilépticas hay apertura de HCs, la cual es célula y tiempo dependiente.

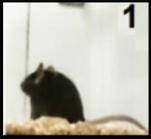
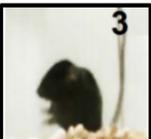
Fase de convulsión	Animales (n=20)	Animales (%)
	36/36	100
1 	36/36	100
2 	36/36	100
3 	36/36	80
4 	29/36	70
5 	25/36	70
6 Muerte	11/36	30

Figura 25. PTZ induce crisis epiléptica caracterizada por diferentes fases conductuales en ratones adultos. En la columna de la izquierda se muestra una imagen representativa, obtenidas de la publicación de (Tse y cols., 2014), de cada una de las fases que caracteriza la crisis epiléptica inducida por PTZ (70 mg/kg). 0= normal; 1= inmovilización; 2= contracción muscular extremidad anterior; 3= cola erecta; 4= postura de canguro; 5= convulsiones generalizadas continuas y caída; 6= muerte. En la columna central se muestra un resumen del total de animales tratados con PTZ en relación a la proporción de las distintas fases manifestadas en cada animal y en la columna a la derecha, se indica el porcentaje. El número entre paréntesis indica el valor de n.

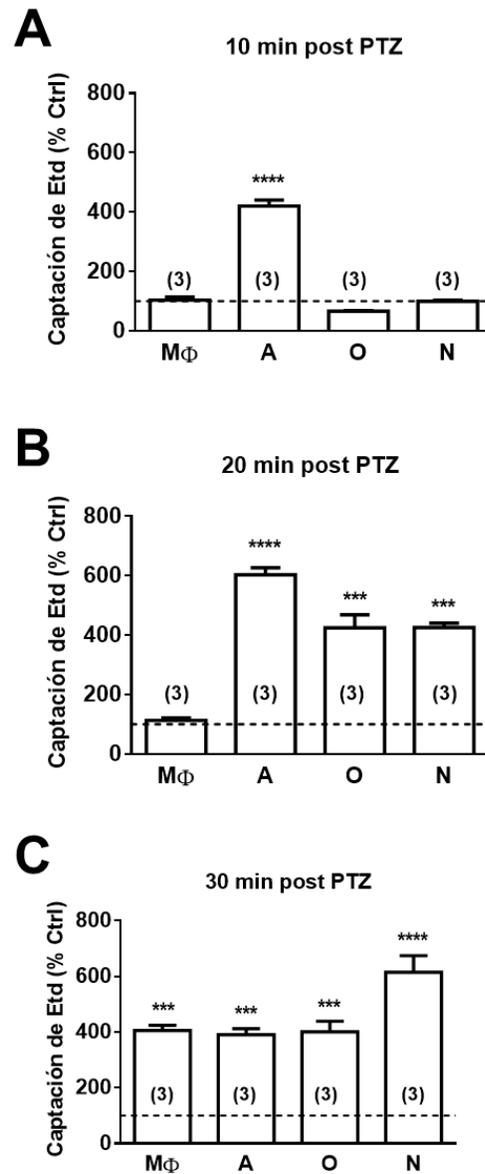


Figura 26. PTZ aumenta la actividad de los HCs en diferentes tipos de células del cerebro de una manera dependiente del tiempo. Datos promedios de la captación Etd⁺ normalizado a la condición control (línea discontinua) de cada tipo de células de ratones tratados con PTZ (70 mg/kg o vehículo (control)). Después de (A) 10 min, (B) 20 min y (C) 30 min. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ frente a la condición de control de cada tipo celular. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

2.2 Activación de los HCs en células cerebrales inducida por PTZ es bloqueada por carbenoxolona.

Actualmente hay un gran interés en investigar el posible rol de las GJs en la actividad neuronal, por lo cual existen numerosos estudios basados en el uso de carbenoxolona (Cbx) como droga anticonvulsante por ser un potente bloqueador de GJs (**Mylvaganam y cols., 2014**). Por otro lado, se ha descrito que bajas concentraciones (5-10 μM) bloquean HCs Panx1 y sólo tienen un efecto inhibitor menor sobre HCs Cx, pero a concentraciones mayores a 10 μM bloquean HCs Cxs (**Schalper y cols., 2008**). Cbx, un derivado de ácido 18-glicirretínico, también se ha descrito que podría complementar la acción anticonvulsante de algunos antiepilépticos, tales como diazepam, gabapentina, fenobarbital, felbamato y valproato (**Gareri y cols., 2004**). Sin embargo, el uso crónico produce infartos cardiacos, por lo cual ha sido retirado de las farmacias y por ende su utilidad como terapia para la epilepsia es muy limitada por tratarse de una enfermedad crónica. Para evaluar su acción como bloqueador de HCs, se evaluó la acción de Cbx a dos concentraciones, 10 μM para bloquear HCs Panx1 y 100 μM para bloquear tanto HCs Cx como HCx Panx. Ratones machos adultos fueron inyectados vía intraperitoneal con PTZ (70 mg/kg) o PBS como control y luego de 30 min, los animales fueron eutanasiados para extraer los cerebros y obtener rebanadas coronales. Las rebanadas, una vez estabilizadas, fueron tratadas con Cbx durante 20 min y a continuación se realizó el ensayo de captación de Etd^+ . Mediante inmunofluorescencia se identificó los tipos celulares (reconocidos con anticuerpo específico para microglia ($\text{M}\Phi$), astrocitos (A), oligodendrocitos (O) y neuronas (N)), que mostraron aumento de la actividad de los HCs (captación de Etd^+). El promedio de datos de la captación de Etd^+ fue normalizado a la

condición control (línea punteada) de cada tipo celular. Se observó que ambas concentraciones de Cbx (10 μ M y 100 μ M) bloquean la captación de Etd⁺ (actividad de HCs Cx y Panx, respectivamente) inducida por PTZ a niveles encontrados en condiciones basales; en M Φ (de $474 \pm 6\%$ a $149 \pm 22\%$, n=3, p<0,01) con Cbx 10 μ M y (de $474 \pm 6\%$ a $225 \pm 31\%$, n=3, p<0,05) con Cbx 100 μ M (**Figura 27A**); A (de $484 \pm 7\%$ a $324 \pm 5\%$, n=3, p<0,0001) con Cbx 10 μ M y (de $484 \pm 7\%$ a $37 \pm 3\%$, n=3, p<0,0001) con Cbx 100 μ M (**Figura 27B**); O (de $411 \pm 5\%$ a $108 \pm 5\%$, n=3, p<0,01) con Cbx 10 μ M y (de $411 \pm 5\%$ a $92 \pm 9\%$, n=3, p<0,01) con Cbx 100 μ M (**Figura 27C**) y N (de $410 \pm 28\%$ a $113 \pm 9\%$, n=3, p<0,001) con Cbx 10 μ M y (de $410 \pm 28\%$ a $93 \pm 19\%$, n=3, p<0,001) con Cbx 100 μ M (**Figura 27D**). Estos resultados sugieren la participación de actividad de HCs Cx y Panx1 en episodios epileptogénicos inducidos con PTZ.

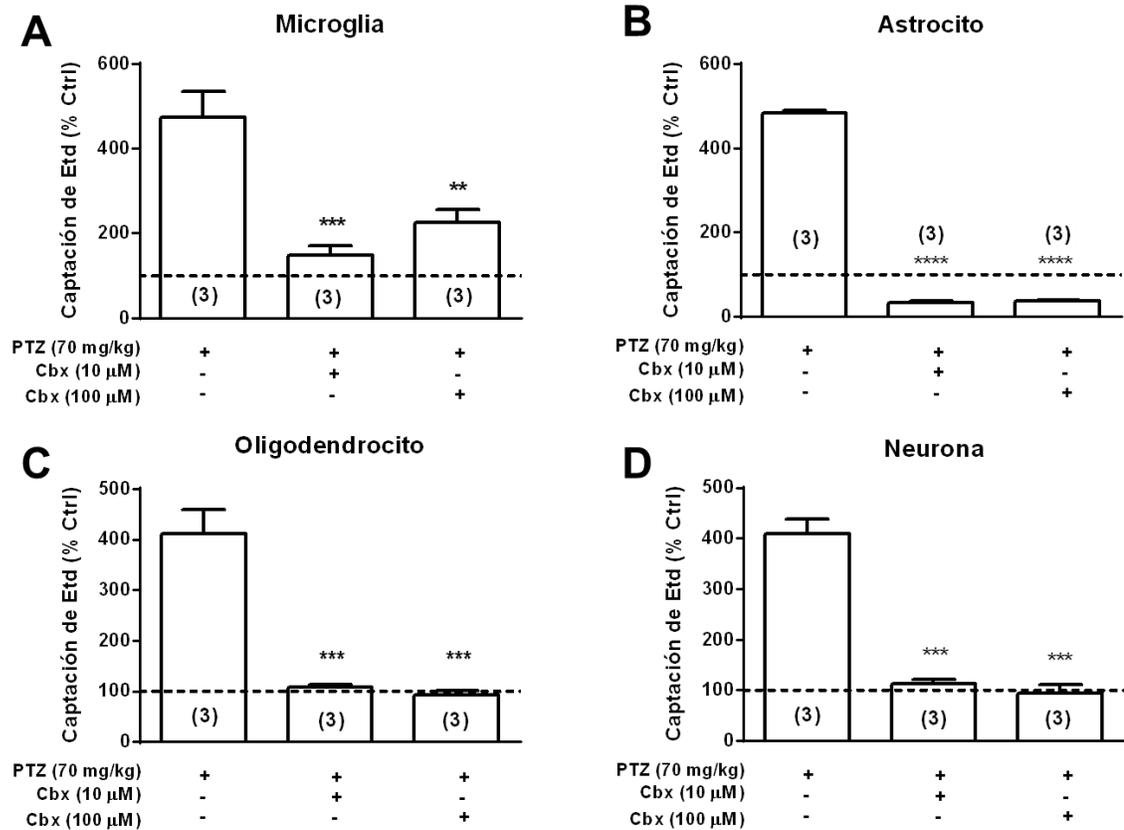


Figura 27. La carbenoxolona bloquea la activación de HCs inducida por PTZ en las células cerebrales. Los ratones fueron tratados con PTZ (70 mg/kg) o PBS (control) y después de 30 min se extrajeron los cerebros para realizar el ensayo de captación Etd⁺. Datos corresponden al promedio de la captación de Etd⁺ normalizado a la condición control de (A) microglías, (B) astrocitos, (C) oligodendrocitos y (D) neuronas en rebanadas de cerebro tratadas con PTZ. También se muestran el efecto de Cbx (10 μ M) y (100 μ M) aplicado previamente al ensayo de captación de Etd⁺. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ con respecto a la captación máxima de Etd⁺. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

2.3 Bloqueador de P2X₇R previene las crisis epilépticas y previene la activación de los HCs en células gliales y neuronas del hipocampo.

Cada vez hay más evidencia sobre la participación de ATP y los receptores P2X en estados convulsivos como en las crisis epilépticas (**Sperlagh y Illes, 2014**). Ciertos receptores P2X podrían representar dianas farmacológicas novedosas para el control de las convulsiones, pero no en todos los modelos de epilepsia (**Klaft y cols., 2012**). Estudios en ratones han demostrado que una inyección intracerebroventricular de un antagonista de P2X₇R, BBG o A-438079, reducen aproximadamente un 50% de las convulsiones electroencefalografías durante el estado epiléptico desencadenado por microinyección intra-amígdala de ácido kaínico (**Engel y cols., 2012; Jimenez-Pacheco y cols., 2013**). Aún más, análisis de hipocampo y corteza cerebral de ratones pre-tratados con antagonistas de P2X₇R mostraron una reducción en la muerte neuronal, microgliosis y niveles de IL-1 β (**Jimenez-Pacheco y cols., 2013**). Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición de los P2X₇R con A-43079 1 h administrado en pacientes bajo tratamiento con lorazepan reducen las convulsiones (**Engel y cols., 2012**). Estos hallazgos plantean la posibilidad de utilizar bloqueadores de P2X₇R como tratamiento complementario a las AEDs de uso actual (**Henshall y cols., 2013**). Sin embargo, en la actualidad existen muchos estudios contradictorios con respecto al rol de los P2X₇Rs en la epilepsia (**Le Feuvre y cols., 2003; Lopatar y cols., 2011**), ya que las crisis epilépticas inducidas por pilocarpina son exacerbadas en animales tratados con antagonistas de P2X₇R y ocurren en ratones carentes del P2X₇R (**Kim y Kang, 2011**). Para evaluar la acción anticonvulsionante y de bloqueadores de HCs, se evaluó el efecto de A740003, un bloqueador

específico de P2X₇R, utilizando las siguientes concentraciones: 2 mg/kg y 20 mg/kg A740003, en dos dosis: 6 y 1 h antes de la administración de PTZ (70 mg/kg). En el caso de los animales controles se usó tampón fosfato salino (PBS) como vehículo. Transcurrido 30 min post-administración de PTZ, los ratones fueron eutanasiados para extraer los cerebros y medir posteriormente la actividad de los HCs. Mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal se identificaron los tipos celulares: microglías (MΦ), astrocitos (A), oligodendrocitos (O) y neuronas (N). El promedio de datos de la captación de Etd⁺ fue normalizado en base a la condición control (línea punteada) de cada tipo celular. Los animales pre-tratados con ambas dosis de A740003 manifestaron una disminución en las convulsiones y/o contracturas corporales, sin muerte. Las convulsiones progresaron hasta la fase 4 y la recuperación de los animales fue más rápida con respecto a los controles. Ambas concentraciones de A740003 bloquearon la captación de Etd⁺ inducida por PTZ a la condición basal; en MΦ (de 639 ± 8% a 93 ± 15%, n=3, p<0,0001) con A740003 (2 mg/kg) y (de 639 ± 8% a 189 ± 8%, n=3, p<0,001) con A740003 (20 mg/kg) (**Figura 28A**); A (de 426 ± 16% a 270 ± 30, n=3, p<0,05) A740003 (2 mg/kg) y (de 426 ± 16% a 119 ± 34%, n=3, p<0,01) con A740003 (20 mg/kg) (**Figura 28B**); O (de 463 ± 22% a 97 ± 6%, n=3, p<0,01) con A740003 (2 mg/kg) y (de 463 ± 22% a 109 ± 10%, n=3, p<0,001) con A740003 (20 mg/kg) (**Figura 28C**) y N (de 621 ± 38% a 24 ± 3%, n=3, p<0,0001) con A740003 (2 mg/kg) y (de 621 ± 38% a 62 ± 9%, n=3, p<0,0001) con A740003 (20 mg/kg) (**Figura 28D**). Estos resultados sugieren la participación de P2X₇R en el episodio epileptogénico.

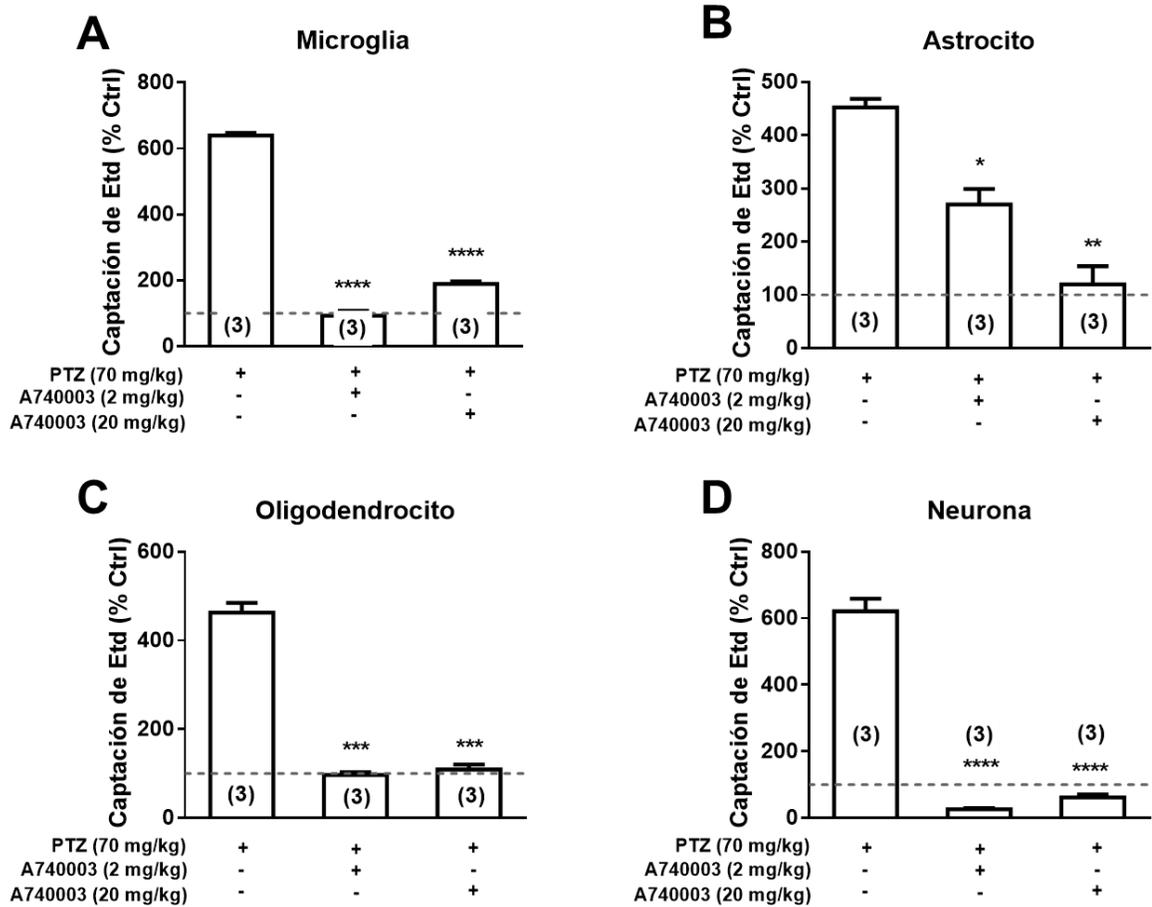


Figura 28. Pretratamiento con el bloqueador de los P2X₇R previene el aumento de la actividad de los HCs inducida por PTZ en las células cerebrales. Ratones fueron pretratados con 2 mg/kg A740003 o igual volumen de PBS (vehículo) 6 h y 1 h antes de la administración de PTZ (70 mg/kg) o PBS (vehículo). Después de 30 min post administración de PTZ se obtuvieron los cerebros para realizar el ensayo de captación Etd⁺ en rebanadas. Los datos corresponden al promedio de la captación de Etd⁺ normalizado a la condición control (línea continua) de (A) microglías, (B) astrocitos, (C) oligodendrocitos y (D) neuronas en rebanadas de cerebro de animales tratados con PTZ. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ con respecto a la captación máxima de Etd⁺. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

2.4 Molécula D4 no afecta viabilidad en ratones C57BL/6.

A diferencia de los actuales tratamientos para la epilepsia enfocados en blancos moleculares localizados en neuronas, se propone el uso de un bloqueador específico para HCs Cxs y en particular con un enfoque a nivel glial ya que las neuronas expresan muy baja actividad de HCs Cx36. Debido al aumento de la actividad neuronal se produce mayor liberación de neurotransmisores y de iones potasio que producen activación de las glías. Esto, inicia un estado inflamatorio que perpetúa un desbalance del microambiente neuronal favoreciendo la recurrencia del aumento de actividad neuronal. En primera instancia, se evaluó la toxicidad o la letalidad inducida por la molécula D4. Con dichos fines se inyectaron ratones adultos de 2 meses vía intraperitoneal en dosis crecientes (0,2; 2; 20; 200 y 2.000 mg/kg de peso del ratón) y se observaron durante 72 h. Luego se evaluaron los aspectos conductuales y fisiológicos de los animales en base al Protocolo de Supervisión de acuerdo a los criterios de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile que rigen en el laboratorio (**Apéndice A**). Las variables consideradas incluyeron datos fisiológicos (pérdida de peso), aspecto (postura) y comportamiento espontáneo (actitud frente a estímulo). De acuerdo a los criterios evaluados no hubo efectos colaterales observados en ninguno de las dosis evaluadas, la puntuación fue de cero para todas las variables en cada tratamiento estudiado, considerando que una puntuación de 0-3 es normal (**Apéndice A**). Además, la mortalidad fue de cero en todas las concentraciones evaluadas. La mortalidad en animales pretratados con la molécula D4 y luego tratados con 70 mg/kg PTZ también fue cero.

2.5 Molécula D4 bloquea la actividad de los HCs inducida por PTZ en células cerebrales.

Para determinar si la molécula D4 bloquea los HCs Cxs, se evaluó como el pretratamiento de la molécula D4 previene la actividad de los HCs inducida por PTZ en los diferentes tipos celulares del hipocampo. Ratones machos adultos de 2 meses fueron inyectados vía intraperitoneal con 2 mg/kg de molécula D4, en dos instancias: 6 y 1 h antes de la administración de PTZ (70 mg/kg). En el caso de los animales controles se administró el vehículo (PBS para PTZ y DMSO para D4). A los 30 min post-administración de PTZ los ratones fueron eutanaziados para extraer los cerebros y posteriormente medir la actividad de los HCs con la técnica de captación de Etd⁺. Los animales pre-tratados con ambas dosis de la molécula D4 no presentaron convulsiones y cuando no fue prevenido, manifestaron una disminución en las convulsiones y/o contracturas corporales, sin muerte. Las convulsiones progresaron hasta la fase 4 y la recuperación de los animales fue más rápida con respecto a los controles.

Mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal se identificaron los diferentes tipos celulares: microglías (MΦ), astrocitos (A) y neuronas (N). La captación de Etd⁺ normalizada a la condición control (línea punteada) de cada tipo celular fue drásticamente reducida por el pretratamiento con la molécula D4. El pretratamiento con D4 previno el aumento de captación de Etd⁺ inducida por PTZ; en MΦ (de 639 ± 8% a 81 ± 15%, n=3, p<0,0001) (**Figura 29A**); A (de 502 ± 16% a 54 ± 29%, n=3, p<0,0001) (**Figura 29B**) y N (de 621 ± 38% a 136 ± 31%, n=3, p<0,0001) (**Figura 29C**). Estos resultados sugieren que durante las crisis epilépticas se activan los HCs Cxs.

Se detectó una baja captación de Etd⁺ en células de cerebros controles (**Figura 30A, D, G**), mientras que en células de cerebro de ratones tratados con PTZ la captación de Etd⁺ fue evidente (**Figura 30B, E, H**). Por el contrario, en cerebros de ratones pre-tratados con molécula D4 y luego tratados con PTZ la captación de Etd⁺ fue comparable a la de cerebros de animales controles (**Figura 30C, F, I**). Las rebanadas de cerebro de animales tratados con DMSO la captación de Etd⁺ fue comparable a la de animales controles (**Datos no ilustrados**).

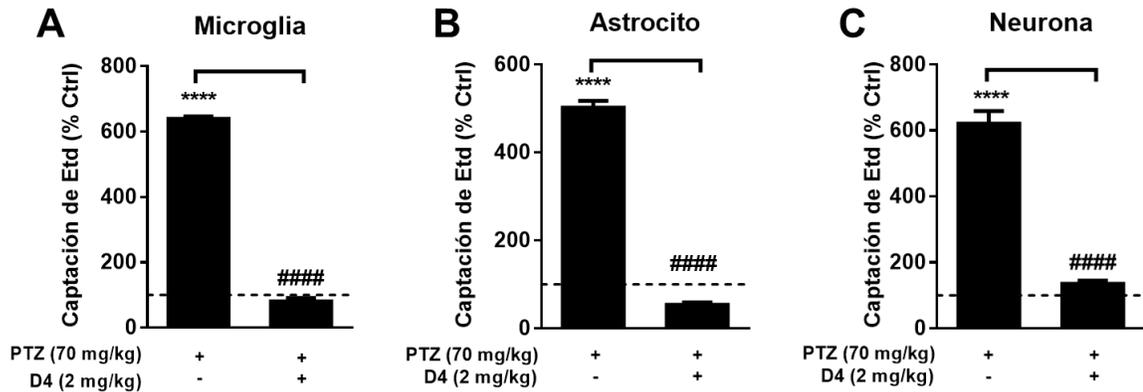


Figura 29. Pretratamiento con D4 previene el aumento de la actividad de los HCs inducido por PTZ en las células cerebrales. R ratones fueron pretratados con 2 mg/kg D4 o igual volumen de DMSO (vehículo) 6 h antes de la administración de PTZ (70 mg/kg) o igual volumen de PBS (vehículo). Después de 30 min post administración de PTZ se obtuvieron los cerebros para realizar el ensayo de captación Etd⁺. Los datos corresponden al promedio de la captación de Etd⁺ normalizado a la condición control de (A) microglías, (B) astrocitos y (C) neuronas en rebanadas de cerebro tratadas con PTZ. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. **** $p < 0,0001$ con respecto a la condición control; #### $p < 0,0001$ con respecto a la captación máxima de Etd⁺. Estadística: ANOVA de una vía y test *post hoc* de Dunnett's.

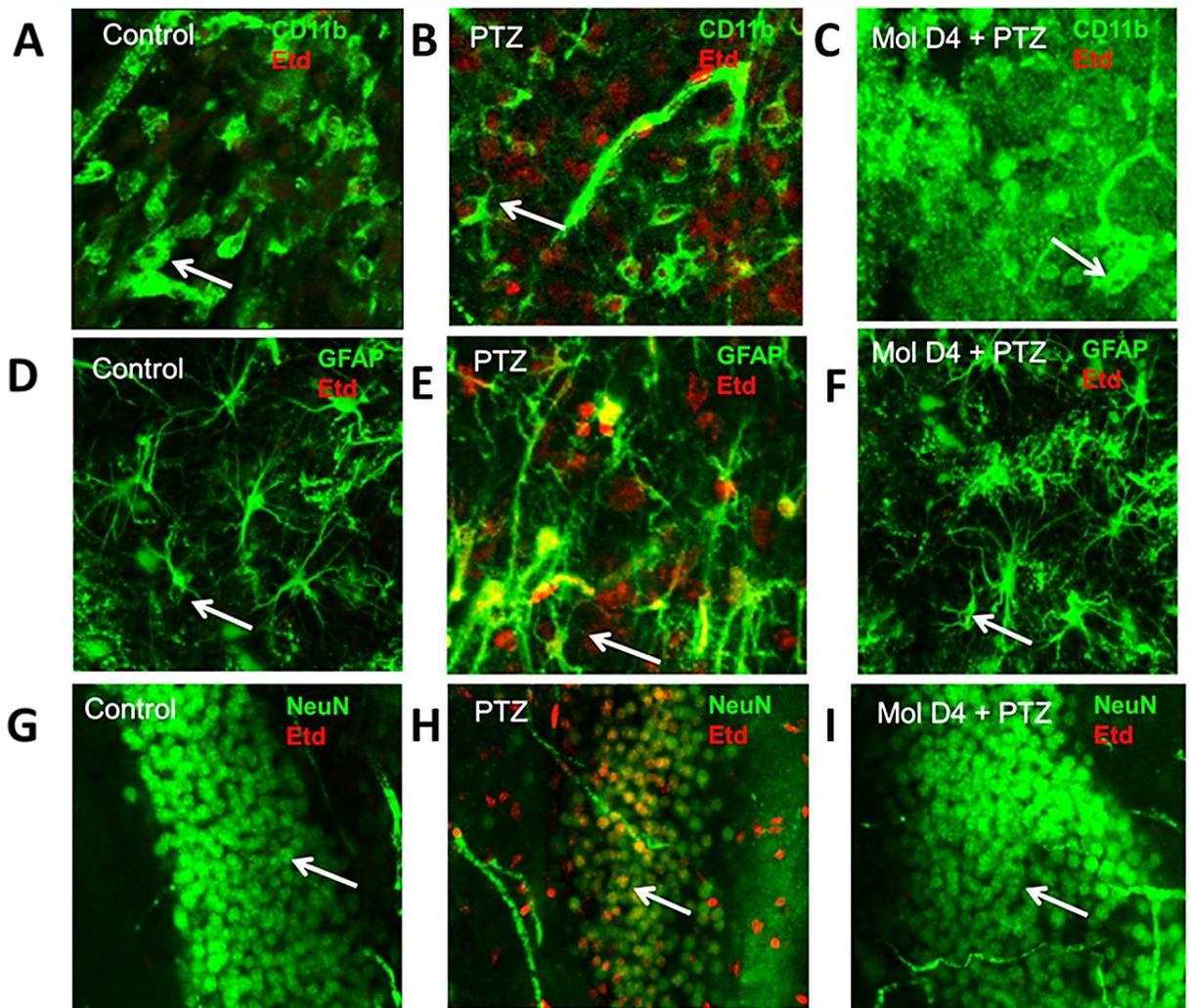


Figura 30. D4 bloquea el aumento de la actividad de los HCs inducido por PTZ en las células del cerebro. Imágenes representativas de rebanadas de hipocampo que muestran la reactividad de (A, B, C), CD11b en microglías, (D, E, F) GFAP en astrocitos y (G, H, I) NeuN en neuronas (verde, flecha). La captación de Etd⁺ en las células del mismo campo (rojo) del control (A, D, G), tratadas con PTZ (70 mg / kg) (B, E, H) y pre-tratada con la molécula de D4 (C, F, I). La barra de escala = 10 μ m.

DISCUSIÓN

En esta tesis se demostró por primera vez que los oligodendrocitos expresan el inflamasoma NLRP3 que es activado por la exposición prenatal a DEX. En condiciones *in vitro* los oligodendrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX no incrementan los niveles relativos de mRNA de IL-1 β , pero los factores solubles liberados por microglías o astrocitos, como IL-1 β o TNF- α inducen la activación del inflamasoma e incrementan la actividad de HCs que es bloqueada por La³⁺. Además, se demostró que la exposición prenatal a DEX promueve la actividad de los HCs Panx1 y Cxs junto con la activación de P2X₇R en oligodendrocitos que perdura en el tiempo. El bloqueo de los HCs CX43, Panx1 y P2X₇R de mastocitos, microglías y astrocitos previene la apertura de HCs en oligodendrocitos. En adición, la inhibición de CRHR y los mastocitos previene la activación de HCs en las células gliales y neuronales de hipocampo. Estos hallazgos sugieren que la exposición prenatal a DEX induce una respuesta neuroinflamatoria iniciada por la unión de CRH o Ucn II a su receptor CRHR en mastocitos, microglías y/o astrocitos, liberando citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α), que actúan como una señal autocrina/paracrina para la reactividad glial, producción de mediadores pro-inflamatorios y activación de HCs Cx43 y Panx1. Estos eventos conducirían a la activación del inflamasoma en oligodendrocitos, mediado por la unión de

citocinas a sus receptores, activación de P2X₇R y Panx1 por incremento de ATP extracelular. Aquí también demostramos que en la epilepsia inducida por PTZ aumenta la actividad de HCs en microglías, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. El bloqueo específico de HCs Cx43 y P2X₇R disminuyen las convulsiones epilépticas y el tiempo de recuperación, sin muerte. Además, se previene completamente la activación de HCs en las células gliales y neuronas. Estos resultados sugieren que la activación de HCs Cxs y P2X₇R en astrocitos y oligodendrocitos podrían desencadenar la hiperactividad neuronal durante el episodio epileptogénico. A consecuencia del desequilibrio electroquímico se liberarían neurotransmisores e iones potasio que activarían HCs Cxs gliales (micro- y macro-glias), las que inician un estado inflamatorio, que se perpetúa favoreciendo la recurrencia del aumento de actividad neuronal. Nuestros hallazgos aportan nuevos conocimientos sobre el papel de los oligodendrocitos en el estrés prenatal y sugieren cómo los HCs CX43 y P2X₇R podrían surgir como posibles dianas para el desarrollo de estrategias farmacológicas novedosas dirigidas a reducir la neuroinflamación y los trastornos neurodegenerativos relacionados al estrés y la epilepsia.

1 Participación del inflammasoma NLRP3 de oligodendrocitos en los mecanismos neuroinflamatorios inducidos por la exposición prenatal a DEX.

En el presente trabajo de tesis se demostró que los oligodendrocitos expresan el inflammasoma NLRP3. Mediante inmunofluorescencia nosotros determinamos en rebanadas de cerebro la expresión de las proteínas que componen el complejo multiproteico inflammasoma

NLRP3, la proteína NLRP3, la molécula adaptadora de apoptosis (ASC), y la proteína activadora Casp-1. La activación del inflamasoma tiene como resultado final la liberación de IL-1 β o IL-18 (**Sutterwala y cols., 2014**). Aquí, evidenciamos que DEX aumenta la expresión de proteínas inflamasoma NLRP3 y la citocina IL-1 β en el hipocampo de neonatos. La activación del inflamasoma estaría regulada en dos niveles de señalización (**Bauernfeind y cols., 2009**). Se ha descrito que la regulación de la activación del inflamasoma requiere una señal pre-estimuladora derivada del reconocimiento de patrones de daño propios o exógenos y de receptores de citocinas (**Hung y cols., 2013; Sutterwala y cols., 2014**), seguido a su vez de una segunda señal derivada a partir de ATP extracelular (**Gombault y cols., 2012; Murakami y cols., 2012; Riteau y cols., 2012**).

Actualmente, se ha identificado a Panx1 como un componente clave en la activación de Casp-1 mediada por P2X₇R y en la liberación de IL-1 β (**Baroja-Mazo y cols., 2013**). La unión de ATP extracelular a este receptor purinérgico permitiría la salida de K⁺ y la entrada de Ca²⁺, iones que han sido señalados como inductores de la activación de Casp-1 (**Murakami, 2012**). Sin embargo, aún no es claro si el movimiento de uno de estos dos cationes es requerido, mientras que el movimiento del otro representa solo un balance iónico. También se ha planteado que el P2X₇R interacciona con el HCs Panx1 formando un gran poro de alta permeabilidad en la membrana plasmática que permitiría el paso de PAMPs que se unirían directamente al dominio LRR presente en NLRP3 para Casp-1 (**Pelegriin y Surprenant, 2009**). Por otro lado, se ha descrito que el aumento de Ca²⁺ intracelular podría gatillar, por una parte, una disfunción mitocondrial y producción de ROS, por medio del cual se activaría el inflamasoma y, a su vez, este incremento de Ca²⁺ intracelular podría activar HCs Panx1 permitiendo la liberación de ATP al medio extracelular. De esta manera P2X₇R y HCs Panx1

formarían un circuito de señalización positiva (**Baroja-Mazo y cols., 2013**), que contribuiría a la activación del inflamasoma. De acuerdo a lo anterior, nosotros encontramos un aumento en la expresión de las proteínas Panx1 y P2X₇R en rebanadas de cerebro de crías de madres tratadas con DEX. Estos resultados están en línea con nuestros hallazgos de qPCR, donde mostramos un aumento de los niveles de mRNA de Panx1 y P2X₇R en cultivos de oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX.

En los últimos años se ha postulado que TNF- α mediante la unión a su receptor, TNFR1 y TNFR2, podría activar el inflamasoma bajo condiciones inflamatorias estériles, esto es, en ausencia de una primera señal o sensibilización microbial (**Franchi y cols., 2009**). Es importante destacar que los oligodendrocitos expresan ambos receptores (**Dopp y cols., 2002**) y nosotros determinamos un aumento en la expresión de la proteína TNF- α en rebanadas de cerebro de crías de madres tratadas con DEX. Por lo tanto, el aumento en la expresión de TNF- α , así como P2X₇R y Panx1 podrían evidenciar un mecanismo de activación del inflamasoma, el cual excluye la participación de TLR4 bajo condiciones de estrés prenatal.

Interesantemente, nosotros mostramos que cultivos de oligodendrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX no muestran un incremento en los niveles de mRNA de IL-1 β e iNOS, lo cual plantea al menos dos posibles explicaciones: 1) que los cultivos de oligodendrocitos pierden la memoria celular a diferencia de las microglías o astrocitos, y por tanto no se mantiene activo el inflamasoma o 2) requiere de una señalización de activación del inflamasoma mediada por microglías o astrocitos. Congruente con esta idea, los astrocitos tratados con LPS se transforman en neurotóxicos sólo en presencia de microglías (**Madrigal y cols., 2005**). Aún más, se ha demostrado en co-cultivos de astrocitos y microglías, que los

astrocitos suprimen la expresión de la IL-12 y también inhiben la expresión de iNOS (**Welser y Milner, 2012**). Por lo tanto es posible que los oligodendrocitos requieran de una comunicación directa con microglías o astrocitos que regulan la señal de oligomerización de inflammasoma y la subsecuente activación de la Casp-1.

Con el fin de determinar el efecto de microglías o astrocitos sobre la activación del inflammasoma en oligodendrocitos mediante la liberación de factores solubles, evaluamos el efecto de los medios de celulares de cultivos microglías o astrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX en cultivos de oligodendrocitos sanos y determinamos los niveles de expresión de mRNA de las proteínas activadoras de inflammasoma. En apoyo a los estudios de expresión de proteínas en rebanadas de cerebro y qPCR de oligodendrocitos en cultivo provenientes de crías de madres tratadas con DEX, los niveles de expresión de mRNA de P2X₇R y Panx1 aumentaron significativamente. No obstante, los niveles de expresión de mRNA de TLR4 y CD14 aumentaron significativamente, tanto en oligodendrocitos de cultivo provenientes de crías de madres tratadas con DEX como en oligodendrocitos sanos expuestos a medios condicionados de microglías o astrocitos de provenientes de crías de madres tratadas con DEX.

TLR4 responde predominantemente a LPS bacteriano (**Krishnan, 2015**). En, base al aumento en los niveles de mRNA de TLR4 y CD14 se sugiere que la activación del inflammasoma podría estar asociado con TLR4 y con la interacción LPS/CD14 en oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX. Se ha sugerido que CD14 inicia la vía de señalización pro-inflamatoria a través del transporte de LPS hacia TLR4 y su endocitosis (**Plociennikowska, 2015**). TLR4 activa el factor de transcripción NF-κB, el cual regula la

expresión de genes pro-inflamatorios incluyendo a P2X₇R, Panx1 y IL-1 β (**Pelegriin y Surprenant 2009**). La activación de la cascada de señalización de TLR4 requerida como requisito para la formación del inflamasoma puede desencadenar la inducción transcripcional de genes que codifican citocinas como TNF- α , IL-6 y mediadores inflamatorios tales como iNOS y COX-2 (**Perkins 2000**).

Un aspecto interesante en estos hallazgos es entender como se explica la presencia de LPS en crías de madres tratadas con DEX. Existe evidencia que sugiere que el estrés induce un aumento en la permeabilidad intestinal que permitiría que LPS de enterobacterias Gram-negativas transloquen a través de la barrera epitelial y promuevan la activación de una respuesta inmune a nivel de la mucosa (**Krishnan, 2015**). La disfunción de la barrera intestinal podría estar relacionada con la hipersensibilidad visceral que se observa en diversos modelos experimentales de estrés y en el síndrome de intestino irritable postinfeccioso en humanos (**de Punder y Pruimboom, 2015**). Bailey y colaboradores (2004) demostraron que el estrés prenatal en monos Rhesus induce perturbación en la microflora intestinal en las crías. Se ha propuesto que TNF- α (**Turner, 2006**) o IL-1 β (**Al-Sadi y cols., 2008**) incrementan la permeabilidad de las uniones estrechas (TJ, "Tight junction") en el epitelio intestinal por inducción de la transcripción y activación de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) bajo una condición de estrés. MLCK regula la permeabilidad intestinal mediante la fosforilación de la cadena ligera de miosina y la consecuente apertura de las uniones estrechas (**Mazzon y Cuzzocrea, 2008**). No obstante, otros investigadores, plantean que dichos cambios inducidos bajo estrés pueden ser inhibidos por antagonistas de GR (**Matsuo y cols., 2009**).

Otro hecho importante descubierto de la exposición de oligodendrocitos sanos expuestos a medios condicionados de microglías o astrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX fue que los niveles de mRNA de IL-1 β e iNOS incrementaron drásticamente con respecto a cultivos de oligodendrocitos sanos tratados con medios celulares de cultivos de microglías o astrocitos de crías sanas. Estos resultados son apoyados por una reciente publicación (**Slusarczyk y cols., 2015**) que demuestran que cultivo de microglías de ratas estresadas incrementan la producción de NO, mediada por la enzima iNOS, y la liberación de citocinas pro-inflamatoria (IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6), quimocinas y sus receptores. Además, determinaron que la expresión del mRNA y la proteína de estas citocinas incrementan significativamente en comparación con células de animales de control. (**Slusarczyk y cols., 2015**). Sin embargo y reafirmando los resultados de qPCR obtenidos de oligodendrocitos en cultivo provenientes de crías de madres tratadas con DEX, la exposición de oligodendrocitos sanos a medios celulares de oligodendrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX, no mostraron un incremento de los niveles de mRNA de IL-1 β , TNF- α o iNOS, incluso después de 48 h de estimulación con medios condicionados. Estos hallazgos sugieren que la activación de inflamasoma en oligodendrocitos requiere de factores solubles liberados al medio extracelular por microglías o astrocitos. Para determinar si estos factores solubles corresponden a citocinas pro-inflamatorias evaluamos el nivel de citocinas y quimocinas presentes en los medios celulares de microglías y astrocitos. Nosotros encontramos altos niveles de diversas citocinas pro-inflamatorias en los medios celulares de microglías y astrocitos provenientes de crías de madres tratadas con DEX. Interesantemente, los niveles de IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p70 IL-17 y TNF- α , aumentaron significativamente. Mientras que los medios condicionados de astrocitos solo IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α

incrementaron con respecto al control. Sin embargo, citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10, y las quimocinas MCP-1, MIP-1 α , GM-CSF y RANTES no presentaron cambios significativos. Estos resultados sugieren que los factores solubles liberados de cultivos de microglías o astrocitos provenientes de crías de madres expuestas a DEX corresponden a citocinas pro-inflamatorias que inducen la oligomerización y activación del inflamasoma en oligodendrocitos mediante los receptores específicos para las distintas citocinas, como IL-1 β o TNF- α .

2 Los HCs Cx43, HCs Panx1 y el P2X₇R de microglías y astrocitos modulan la actividad de los HCs en oligodendrocitos.

Se ha demostrado que las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β promueven la apertura de HCs Cx43 (Retamal y cols., 2007; Froger y cols., 2009; Orellana y cols., 2011a). Por otro lado, se ha planteado que HCs Cxs participan en la activación de inflamasoma inducida por P2X₇R y HCs Panx1 en células musculares denervadas (Cea y cols., 2013). Dado estos antecedentes, determinamos el efecto de TNF- α e IL-1 β en la actividad de HCs de oligodendrocitos en cultivo sanos y descubrimos que tanto TNF- α como IL-1 β incrementan la actividad de HCs luego de 48 h de estimulación con cada citocina, el cual fue bloqueado por La³⁺. Por tanto, era relevante determinar si la exposición prenatal a DEX aumenta la actividad de HCs en oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX. Nosotros demostramos que rebanadas de cerebro de crías de madres sometidas a DEX aumentan la actividad de HCs en oligodendrocitos, la cual es bloqueada con La³⁺, el péptido

inhibitorio de Panx1, ¹⁰panx1 y el péptido inhibitorio de Cx43, Gap26. Estos resultados sugieren que en los oligodendrocitos, la Panx1 y Cx43 median la apertura de HCs inducida por la exposición prenatal a DEX. Interesantemente, los oligodendrocitos expresan Panx1 (**Domercq y cols., 2010**), Cx29, Cx32 y Cx47 funcionales, pero no la Cx43 (**Nuluart-marti y cols., 2013**, **Li y cols., 2014**). Mientras que solo microglías y astrocitos expresan HCs Cx43 funcionales (**Orellana y cols., 2011b**, **Sáez y cols., 2013**, **Contreras y cols., 2002**; **iglesias y cols., 2009**). Esta evidencia sugiere que la activación de HCs inducida por la exposición prenatal a DEX depende además de la actividad de HCs Panx1 presente en oligodendrocitos, de la activación de los HCs Panx1 y/o HCs Cx43 de mastocitos, microglías y astrocitos.

Recientemente, mostramos que el estrés por restricción de movimiento aumenta la actividad de los HCs Cx43 y HCs Panx1 en microglías, astrocitos y neuronas hipocampales (**Orellana y cols., 2015**). El incremento en la actividad de los HCs ha sido involucrado en la excitotoxicidad mediada por el receptor de ATP/glutamato durante las respuestas inflamatorias. (**Thompson y cols., 2008**, **Orellana y cols., 2011a** **Orellana y cols., 2011b**). Durante la isquemia, una condición en la cual se induce una marcada respuesta neuroinflamatoria, se ha mostrado que los cultivos de oligodendrocitos liberan ATP a través de HCs Panx1 e inducen muerte celular por isquemia que es parcialmente prevenido por antagonistas de P2X₇R y bloqueadores de HCs Panx1 (**Domercq y cols., 2010**). El aumento de la actividad de los HCs Panx1 ha sido asociado a la reactividad de microglías y astrocitos que aumentan la liberación de ATP y/o las señales de Ca²⁺ y como se describió anteriormente, también participa en la activación de P2X₇R generando una retroalimentación positiva, donde ATP causa liberación de ATP vía HCs Panx1 o HCs Cxs (**Baroja-Mazo y cols., 2013**). Recientemente, se ha descrito que la exposición maternal de LPS induce en las crías un

incremento en la liberación de ATP a través de HCs Cx43 y HCs Panx1 de astrocitos, además de un aumento en los niveles de Ca^{2+} , iNOS y las citocinas IL-1 β y TNF- α ; resultando en un incremento de la muerte neuronal mediada por mecanismos que involucran al P2X₇R (**Avendano y cols., 2015**). Es así que, el aumento de actividad de HCs en oligodendrocitos fue inhibida por un bloqueador específico para P2X₇R. De esta forma se sugiere que la exposición prenatal a DEX podría inducir la actividad de microglías y astrocitos e incremento en la actividad de los HCs Cx43 y/o HCs Panx1, contribuyendo probablemente en inducir la apertura de HCs en oligodendrocitos por la exposición prenatal a DEX.

3 La respuesta a la exposición prenatal a DEX aguda es mediada por la actividad de los HCs Cx43 de microglías y astrocitos.

El estrés por restricción de movimiento y los GCs pueden inducir al menos dos tipos muy diferentes de respuestas neuroinflamatorias. Una es el estrés agudo que induce una rápida respuesta, de corta duración (horas) de aumento de mediadores pro-inflamatorios (**O'Connor y cols., 2003**). Mientras que el estrés crónico induce una respuesta lenta y persistente (días) en la sensibilización de los mediadores pro-inflamatorios (**Aguirre y cols., 2013; Frank y cols., 2014**). Orellana y cols., 2015 demostró que el estrés agudo y crónico por restricción de movimiento aumenta la actividad de los HCs Cx43 en mastocitos, microglías y astrocitos. Sin embargo, en astrocitos, tanto los HCs Panx1 como los HCs Cx43 son activados por estrés crónico de restricción de movimiento (**Orellana y cols., 2015**). Congruente con esta idea, la exposición prenatal a DEX agudo incrementó parcialmente la actividad de los HCs Cx43 y no

cambió la sensibilidad a los HCs Panx1 o al bloqueo de P2X₇R en oligodendrocitos, lo que es contrario al resultado observado en oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX crónico. Probablemente, los HCs Cx43 presentes en microglías y astrocitos responden primero a los cambios en el microambiente celular inducidos por la exposición prenatal a DEX mediante la liberación de citocinas pro-inflamatorias, mientras que los HCs Panx1 y P2X₇R en oligodendrocitos podrían ser críticos en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria inducida por la exposición prenatal a DEX.

4 La actividad de los HCs en oligodendrocitos en respuesta a la exposición prenatal a DEX es dependientes de la señalización de CRHR1 de mastocitos y microglías.

Las microglías y mastocitos son células residentes del SNC y juegan un rol principal en la respuesta inflamatoria y en la inmunidad innata del cerebro. Se ha demostrado que el estrés por restricción causa el 70% de la degranulación de los mastocitos en tan solo 30 min, secretando citocinas pro-inflamatorias y GCs (**Theoharides y cols., 1995**). Los mastocitos tales como las microglías también expresan receptores CRH, y su activación lleva a la liberación selectiva de citocinas y otros mediadores inflamatorios, las cuales son muy importantes para la comunicación entre estas células (**Theoharides y cols., 2004; Skaper y cols., 2012**). Muchas drogas se han propuesto para atenuar la neuroinflamación mediante la inhibición de los mastocitos y microglías. El antibiótico de amplio espectro minociclina, derivado de la tetraciclina, tiene un fuerte efecto anti-inflamatorio en roedores adultos (**Arvin y cols., 2002**). Estudios en modelo de daño cerebral inducido por endotoxina, la

administración repetida de minociclina, tanto antes como después de la inyección de LPS, se asoció con una disminución del número de células microgliales activadas, disminución del aumento de IL-1 β y TNF- α , así como una reducción del número de células que expresan óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (**Fan y cols., 2005**). Sin embargo, a pesar de que minociclina disminuye la lesión cerebral hipóxico-isquémica en crías de rata neonatal, el tratamiento aumentó la lesión en crías de ratón (**Tsuji y cols., 2004**). De igual forma, se ha utilizado masitinib, un inhibidor de la migración y degranulación de mastocitos, que actualmente se encuentra en fase experimental II y III para su uso en humanos, como posible tratamiento para pacientes con la enfermedad de alzheimer, esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica (**Shirani y cols., 2016**). De acuerdo a estos antecedentes, nosotros demostramos que el aumento en la actividad de HCs inducida por la exposición prenatal a DEX en oligodendrocitos es bloqueado por inhibidores de la actividad celular de mastocitos y microglías, masitinib y minociclina, respectivamente. Estos datos sugieren la idea de que la actividad de HCs en oligodendrocitos en respuesta a la exposición prenatal a DEX es mediada por activación celular de mastocitos y microglías.

Los mastocitos hipotalámicos parecen tener importantes funciones fisiológicas como sensores rápidos de eventos de estrés y regulación bidireccional del eje HPA. Un incremento local de los niveles de CRH o Ucn II bajo estrés podría afectar negativamente diferentes enfermedades asociadas al estrés (**Theoharides 1995; Alysandratos 2012**). Consistente con esta información, se demostró que el aumento de actividad de HCs en oligodendrocitos de rebanadas de hipocampo inducida por DEX o Ucn II es bloqueada por el antagonista de CRHR, antalarmin y los inhibidores de actividad celular, masitinib y minociclina. Por su parte, los péptidos inhibidores de HCs Panx1 y HCs Cxs también bloquean la apertura de HCs en

oligodendrocitos. Estos hallazgos sugieren que la actividad de los HCs en oligodendrocitos en respuesta al estrés prenatal son dependientes de la señalización de CRHR1 y los HCs Cx43 y HCs Panx1 de mastocitos y microglías

Considerando los antecedentes anteriormente descritos, del tiempo de respuesta de los mastocitos, nosotros evaluamos si los diferentes tipos celulares cerebrales tienen un patrón temporal de respuesta a la exposición de GC. La inducción de rebanadas de cerebro de neonatos con DEX demostró que los mastocitos son los primeros en responder aumentando la actividad de HCs a los 20 min post estimulación, mientras que 10 min después las microglías, astrocitos y oligodendrocitos, pero no las neuronas, aumentan la actividad de HCs. Estos resultados refuerzan la idea de que el aumento en la actividad de HCs en oligodendrocitos en respuesta a la exposición de DEX es iniciado por la activación de CRHR, HCs Cx43 y HCs Panx1 presente en mastocitos, microglías y astrocitos (**Figura 31**).

5 Microglías y astrocitos median la apertura de HCs inducida por la exposición prenatal a DEX que se mantiene en el tiempo.

El estrés prenatal induce cambios a largo plazo en el cerebro de las crías y persiste hasta la edad adulta (**Xu y cols., 2013**). Durante el embarazo, entre los días 14 a 21 representan un período crucial en el desarrollo cerebral al tiempo en el que la neurogénesis disminuye y la astrocitogénesis aumenta (**Barros, 2006; Diz-chavez y cols., 2012**). Las perturbaciones en la relación neuro-glial presente en el cerebro prenatal temprano,

particularmente la activación de las microglías persiste en la adultez de estas crías (**Slusarczyk, 2015**). Las células microgliales representan los primeros blancos de los GCs en el SNC debido a una predominante expresión de GR y por lo cual se consideran claves en la alteración de mecanismos de retroalimentación en el eje HPA a largo plazo. Sin embargo, se ha mostrado que la manipulación postnatal que afecta directamente la interacción entre madres y crías, tales como la crianza temprana (**Maccari 1995**) o la manipulación durante las dos primeras semanas de vida en roedores (**Smythe 1996**) pueden revertir los efectos del estrés prenatal sobre la reactividad emocional, la función del eje HPA y disminuir los niveles plasmáticos de los GCs a lo largo de la vida (**Maccari y morley-fletcher. 2007**). Además, diversos estudios han mostrado la importancia de la lactancia para la transferencia de proteínas inmunológicas y para regular la actividad del eje HPA (**Moles y cols., 2008; Gutiérrez y Rojas 2013**). Los resultados presentados aquí añaden importante información que sugiere que durante la lactancia y/o la crianza de una madre tratada con DEX, los corticoides maternos podrían afectar permanentemente el funcionamiento del eje HPA en las crías. Es de importancia notar que esto no se revierte en crías mantenidas por una madre no tratada con DEX y estas respuestas se mantienen a largo plazo. Las microglía son un buen candidato para inducir cambios a largo plazo dentro del cerebro debido a que estas células se activan y permanecen sensibilizadas por mucho tiempo (**Slusarczyk 2015**) y es sabido que el estrés prenatal induce una reacción astrogliar a largo plazo (**Barros y cols., 2006**). De acuerdo con los resultados presentados en el presente trabajo, se sugiere que la apertura de los HCs inducidos por la exposición prenatal a DEX en oligodendrocitos está mediada por microglías y astrocitos por mucho tiempo.

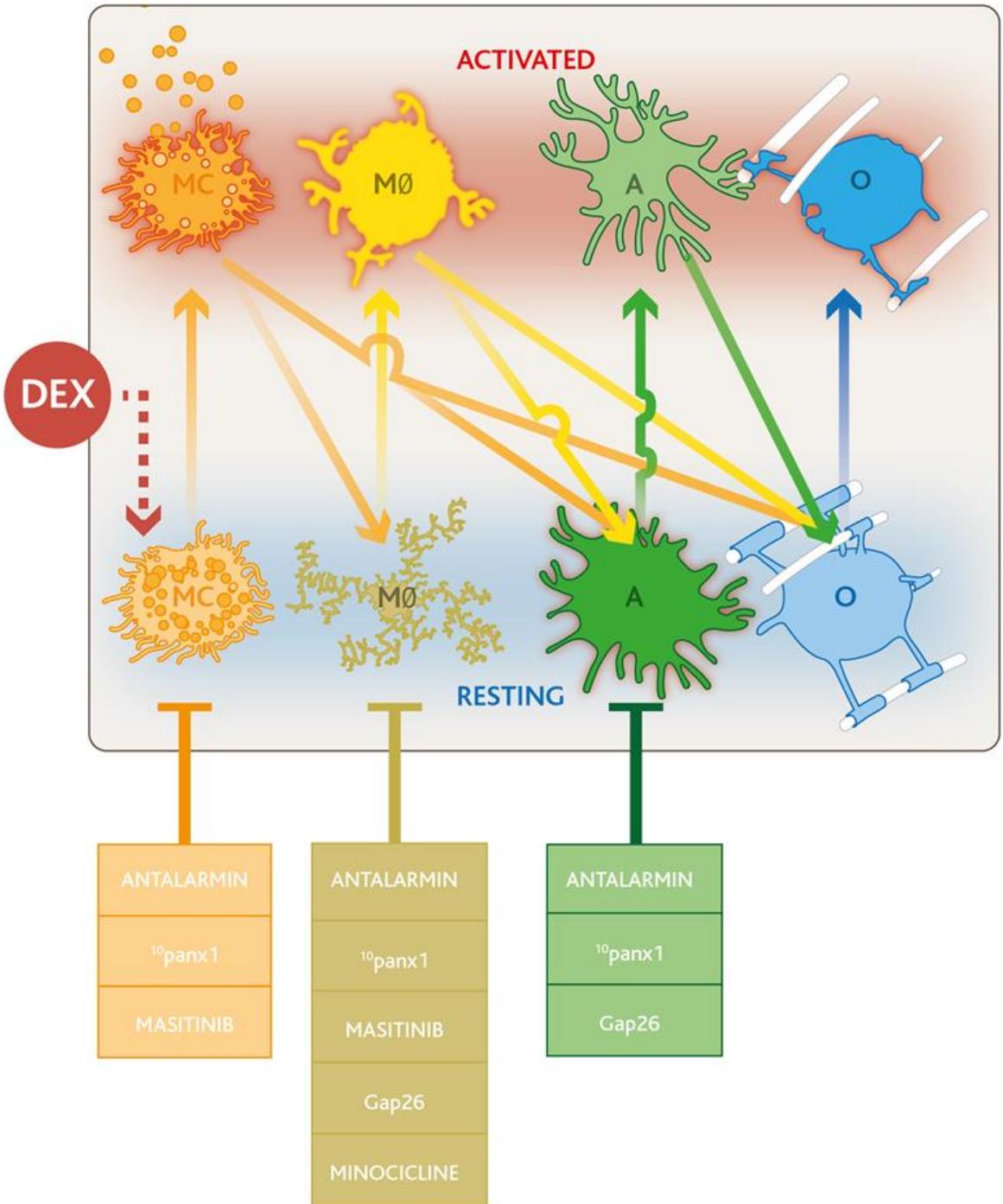


Figura 31. Esquema de los principales resultados que muestran la participación del receptor de CRH y los diferentes inhibidores de activación celular y actividad de HCs durante la activación del inflamasoma en oligodendrocitos inducida por DEX. La exposición prenatal a dexametasona induce la liberación de CRH presumiblemente de interneuronas CRH (flecha discontinua indica que se necesitan más estudios para demostrar este evento). CRH se une y activa los receptores de CRH en los mastocitos (MC), microglías (MΦ) y los astrocitos (A), induce la reactividad glial, liberación de agentes pro-inflamatorios, incluyendo citocinas pro-inflamatorias. Este último puede activar MΦ y A. Del mismo modo, se activan MΦ para liberar agentes pro-inflamatorios que contribuyen en la activación celular. Todos los agentes liberados por MCs, MΦ y A contribuyen en activar los oligodendrocitos (O) que se convierten en reactivos y se asocia a la desmielinización de las neuronas. Por lo tanto, DEX induce una señalización celular autocrino/paracrino en el que MCs responden en primer lugar seguido por la activación de MΦ, A y O. DEX: dexametasona, CRH: hormona liberadora de corticotropina, antalarmin: bloqueador del receptor de CRH, péptido mimético de ¹⁰panx1: bloqueador selectivo Panx1 hemicanal; masitinib: c-kit/PDGF inhibidor de la tirosina quinasa del receptor que impide que los mastocitos y la activación de las células de la microglías, péptido mimético Gap26: selectiva Cx43 hemicanal bloqueador; minociclina: inhibidor de la activación de astrocitos. El efecto de cada inhibidor se basa en la distribución de células conocida de su diana molecular.

6 Los HCs Cxs de los oligodendrocitos no participarían de la respuesta inflamatoria inducida por la exposición prenatal a DEX crónico.

Si bien no hay evidencias de la participación de HCs Cxs en la formación de inflammasoma en oligodendrocitos, en este trabajo se mostró que sólo en rebanadas de crías de madres tratadas con DEX agudo aumentan la expresión de las tres Cxs presentes en oligodendrocitos, no así en condiciones de tratamiento prenatal crónico con DEX. Por otro lado, cultivos de oligodendrocitos de crías de madres tratadas con DEX crónico aumentan los niveles de mRNA de Cx29 Cx32, pero no la Cx47. Por otro lado, se demostró que la exposición de cultivos de oligodendrocitos no tratados a medios condicionados de microglías y astrocitos provenientes de madres tratadas con DEX crónico aumentan los niveles de mRNA de Cx47, además de la Cx29 y Cx32. Una explicación a estos resultados podría estar dada por los estudios realizados en cultivos de microglías. Las células microgliales activadas liberan altos niveles de citocinas pro-inflamatorias, provocando una disfunción en la comunicación astrogliar (**Hinkerohe y cols., 2005; Retamal y cols., 2007**), lo cual aumentaría la actividad de HCs y reduciría la comunicación a través de los GJs en la red astrogliar, deprivando a las neuronas de las funciones astrogliales protectoras y aumentando la susceptibilidad neuronal a agentes neurotóxicos (**Ozog y cols., 2002**). Se ha descrito que Cx29 no forma GJs funcionales, mientras que la Cx47 presente en oligodendrocitos y la Cx43 presente en astrocitos forman GJs funcionales, principalmente en la sustancia gris. Análisis ultraestructural y de inmunohistoquímica, han demostrado que la Cx32 colocaliza con la Cx26 y Cx30 de astrocitos (**Nagy y cols., 2003; Altevogt y Paul, 2004; Tress y cols., 2012**). Por tanto, la exposición de

oligodendrocitos a altos niveles de mediadores pro-inflamatorios podría inducir la disminución de la Cx47, en favor de un aumento en la expresión de HCs Cx43 presente en astrocitos.

En resumen podemos concluir que los oligodendrocitos son vulnerables a los mediadores pro-inflamatorios, con lo cual contribuyen con el origen y/o progresión de enfermedades físicas, psíquicas y sociales. CRHR1, Cx43, Panx1, P2X₇R y el inflamasoma NLRP3 contribuyen a un importante ciclo de retroalimentación positiva durante la respuesta inflamatoria inducida por la exposición prenatal a DEX en oligodendrocitos (**Figura 32**). Mastocitos y células gliales (microglías y astrocitos) funcionan como sensores a un aumento en los niveles de GCs (**Orellana y cols., 2011a; Orellana y cols., 2011b; Harcha y cols., 2015**). Así, es posible que la activación de los HCs inducida por la exposición prenatal a DEX también pueda contribuir en la patogénesis de enfermedades inducidas por estrés prenatal. Por lo cual, podría ser un factor relevante en alterar la neurogénesis y conectómica perinatal. Preliminarmente demostramos que la exposición prenatal a DEX induce una reducción importante de oligodendrocitos maduros y un aumento significativo en el número de células OPC en el cuerpo caloso de los neonatos (**Apéndice B**). Así mismo, demostramos mediante colocalización con caspasa-3, que la exposición prenatal a DEX causa la muerte de oligodendrocitos en las crías (**Apéndice C**). También, determinamos que la exposición prenatal a DEX induce una disminución en el número y puntos de ramificación dendrítica en neuronas piramidales hipocampales (**Apéndice D**). Por tanto, se plantea la necesidad de evaluar próximamente, si el uso de bloqueadores de HCs o P2X₇R puede evitar el daño en la mielina, la muerte de oligodendrocitos y la atrofia neuronal. Evaluando mediante estudios conductuales el impacto de los bloqueadores específicos sobre la cognición y el aprendizaje de crías de madres estresadas.

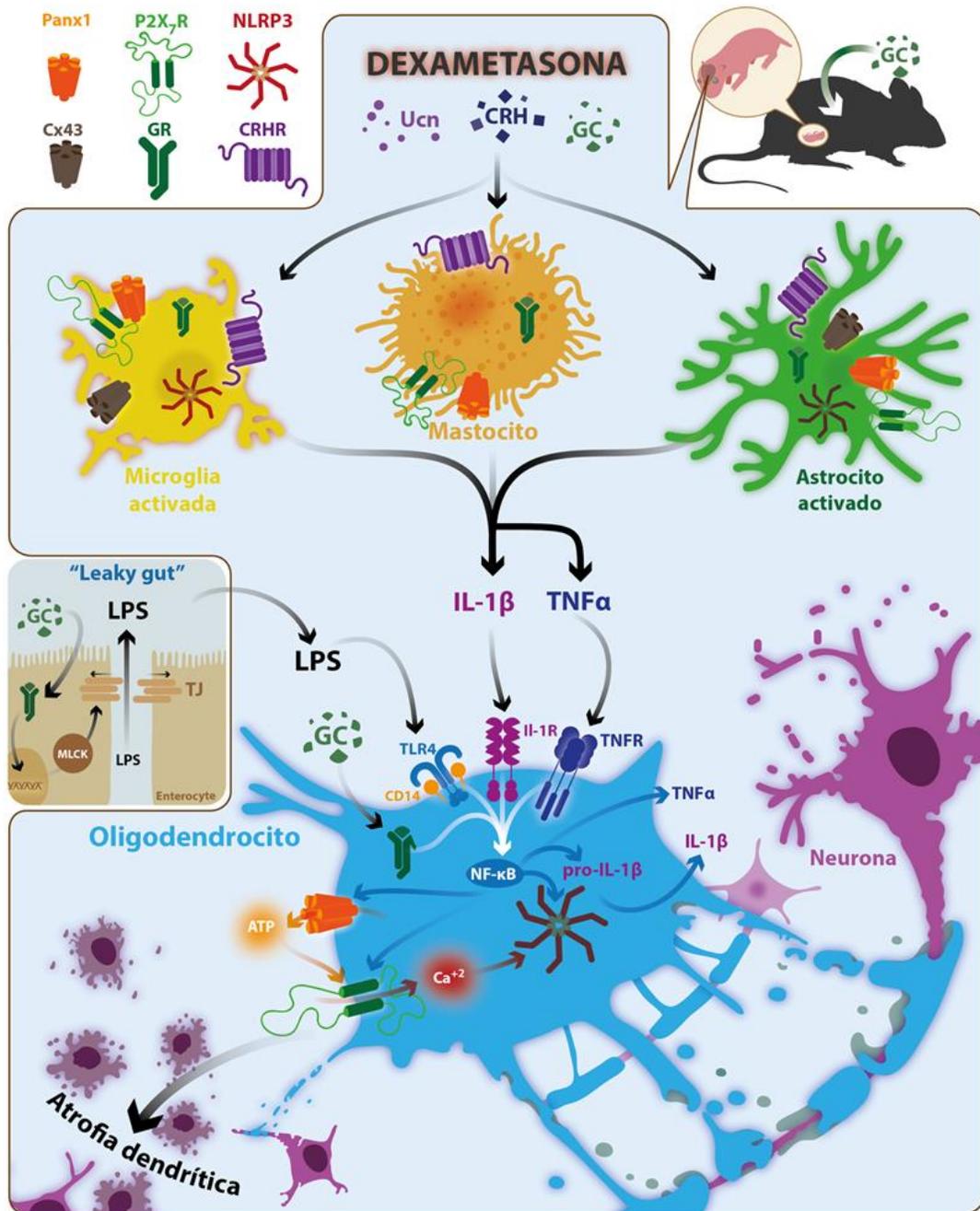


Figura 32. Mecanismos moleculares y celulares implicados en la activación de los HCs e inflammasoma NLRP3 en oligodendrocitos en respuesta a la exposición prenatal a DEX.

La exposición a un exceso de GCs (DEX) incrementan de liberación de CRH/Ucn II que se unen a sus receptores específicos CRHR en mastocitos, microglías y astrocitos, induciendo reactividad glial, liberación de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β) y GCs, que actúan como señal autocrina/paracrina en la producción de más mediadores pro-inflamatorios y activación de HCs Cx43. Estos eventos conducen a la activación del inflammasoma en oligodendrocitos, mediado por la unión de citocinas a sus receptores, activación de P2X₇R y Panx1 por incremento de ATP extracelular o activación de TLR4/CD14 por liberación de LPS intestinal. En el recuadro se grafica la unión de GCs al GR en células del epitelio intestinal, induciendo la síntesis de MLCK que promueve la apertura de las uniones estrechas (TJ) y consecuente liberación de enterobacterias (ej. LPS). El aumento de la actividad de HCs e inflammasoma en las células gliales induce a la muerte de oligodendrocitos, destrucción de la mielina, atrofia dendrítica y muerte neuronal. GC: glucocorticoides, DEX: dexametasona, Ucn: urocortina, CRH: hormona liberadora de corticotropina, GR: receptor de glucocorticoides, MLCK: cinasa de la cadena ligera de miosina.

7 Activación de los HCs en células cerebrales inducida por PTZ es tiempo dependiente.

Recientemente un número creciente de estudios han propuesto que las células gliales tienen un papel crucial en la patogénesis de la epilepsia (**Foresti y cols., 2011**). Las células gliales pueden promover epileptogénesis mediante un incremento de la excitabilidad neuronal y procesos inflamatorios (**Dambach y cols., 2014**). La inflamación cerebral crónica comprende la activación de microglías, astrocitos, células endoteliales de la BBB y las células inmunitarias periféricas, las cuales contribuyen a la producción de mediadores pro-inflamatorios (**Vezzani y cols., 2011a**). Se ha descrito que las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α y IL-6) se expresan primero en microglías y astrocitos activados, y la expresión del receptor de las citocinas sería regulado río arriba en microglías, astrocitos y neuronas (**Vezzani y cols., 2011a**).

La activación de astrocitos y microglías se asocia con la inducción de las principales vías pro-inflamatorias en TLE (**Vezzani y cols., 2011a; Vezzani y cols., 2011b**). Estudios recientes sugieren la participación de TLR en la vías de señalización en la epilepsia (**Maroso y cols., 2010; Riazi y cols., 2010**). Esta vía inflamatoria prototípica se activa en respuesta a patógenos o ligandos endógenos liberados por las células dañadas o células activadas por estrés. Curiosamente, la sobreexpresión de TLR4 en las neuronas y astrocitos, y el ligando endógeno HMGB1 se han encontrado en microglías y astrocitos de TLE, lo que confirma los hallazgos reportados en ratones con epilepsia crónica (**Maroso y cols., 2010; Zurolo y cols., 2011**). IL-1 β y HMGB1 convergen en activar el inflamasoma NLRP3 a través de la unión a sus receptores IL-1R1 y TLR4, respectivamente (**Edye, 2014**). La activación río debajo de esta

vía por sus ligandos converge con la vía de activación de TNF α , los cuales regulan la transcripción de NF-kB, que regula síntesis de citocinas, quimocinas enzimas (ej. COX-2) y receptores (ej. TLRs, IL-1R1, y los receptores de TNF α p55 y p75) (**Vezzani y cols., 2011a**). Se ha planteado que microglías y astrocitos responden a la estimulación con HMGB1 con la consecuente producción de varios mediadores pro-inflamatorios (**Pedrazzi y cols., 2007**), e IL-1 β que a su vez puede inducir la liberación de HMGB1 en cultivos de astrocitos de humanos (**Zurolo y cols., 2011**) y de rata (**Hayakawa y cols., 2010**), por lo cual estas células pueden desempeñar un papel crucial en la permanencia de la respuesta inflamatoria en la epilepsia (**Vezzani y cols., 2013**). De este modo, las crisis epilépticas y los mediadores inflamatorios pueden formar un asa de retroalimentación positiva, reforzándose mutuamente (**Shimada y cols., 2014**).

La epilepsia induce alteraciones gliales que contribuyen a incrementar la excitabilidad neuronal, incluyendo astrocitos y microglías activados crónicamente, cicatrices gliales, y varios gliomas (**Hubbard y cols., 2013**), además de un incremento de densidad celular de oligodendrocitos en la sustancia blanca del hipocampo y el lóbulo temporal neocortical en pacientes con TLE (**Stefanits y cols., 2012**). Sin embargo, recientemente se determinó que la inducción de epilepsia por el agente epileptógeno pilocarpina induce pérdida de mielina y oligodendrocitos con activación transitoria de OPC (**Luo y cols., 2015**).

Los astrocitos interactúan directamente con las sinapsis neuronales mediante la captación de neurotransmisores, Ca²⁺ mediada por receptores de señalización, y la subsecuente liberación gliotransmisores (**Dambach y cols., 2014**). Los astrocitos establecen comunicación funcional mediante GJs, requerida para el tamponamiento de potasio y la preservación de la

homeostasis cerebral (**Retamal y cols., 2007**). Por otro lado, las células microgliales también son capaces de influir en la comunicación GJs astroglial mediante la producción de un amplio espectro de citocinas pro-inflamatorias (**Hinkerohe y cols., 2005**). La principal proteína GJ en astrocitos es la Cx43. La depleción específica de la Cx43 y la Cx30 en ratones dio lugar a la generación de actividad epileptiforme espontánea (**Wallraff y cols., 2006**). Cortes organotípicos de hipocampo bloqueados con un péptido mimético específico para Cx43 inhibe la actividad epileptiforme espontánea (**Samoilova y cols., 2008**). Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han relacionado la actividad epileptogénica con las GJs (**Laura y cols., 2015**). Algunas líneas knockout de Cxs exhiben actividad epileptiforme y cambios en la transmisión glutamatérgica en el hipocampo (**Wallraff y cols., 2006; Rouach y cols., 2008**).

En los últimos años se ha descrito a través de diferentes modelos de epilepsia en roedores cambios en los niveles de mRNA y expresión de Cxs y Panx1 asociadas a procesos epileptogénicos (**Mylvaganam y cols., 2014; Franco-Perez y cols., 2015**). Mediante el uso de ratones knockout para Panx1 se ha demostrado que la activación de canales formados por Panx1 contribuye en la hiperactividad neuronal durante el episodio epileptogénico (**Santiago y cols., 2011**). Sin embargo, no se ha estudiado la contribución de HCs de las células gliales durante una convulsión epiléptica. Para determinar la participación de HCs en los distintos tipos celulares cerebrales en el tiempo, se realizó un curso temporal para medir actividad de HCs inducidos por PTZ. Los resultados mostraron que la activación de HCs en las macroglías (astrocitos y oligodendrocitos) podría desencadenar la hiperactividad neuronal durante el episodio epileptogénico y probablemente serían los responsables de mantener la condición de hiperactividad neuronal en forma crónica.

8 Efectos de los bloqueadores de GJs y P2X₇R sobre la actividad epiléptica.

Es ampliamente conocido que la activación P2X₇R por ATP induce la activación del inflammasoma NLRP3, por lo cual se ha implicado su participación en las crisis epilépticas (**Henshall y Engel, 2015**). Se ha demostrado que antagonistas de P2X₇R reducen las convulsiones inducidas por el agente epileptógeno ácido kaínico (**Jimenez-Mateos y cols., 2012**) y la actividad epiléptica, efecto que se mantiene incluso cuando se administra 15 minutos después de la inducción epiléptica (**Engel y cols., 2012**). La activación de P2X₇R induce apertura de HCs Panx1, el cual también ha sido sometido a estudio, ya que bloqueadores Panx1 han demostrado tener efectos anticonvulsionantes (**Santiago y cols., 2011**). Se ha propuesto a los antagonistas del P2X₇R y de HCs, azul brillante G (BBG) y probenecid, respectivamente, como potenciales blancos terapéuticos de la epileptogénesis, ya que reducen las crisis convulsivas inducidas por ácido kaínico (**Silverman y cols., 2009; Edye, 2014; Feng y cols., 2015**). No obstante, en la actualidad existen resultados contradictorios con respecto a su efectividad como tratamiento para la epilepsia que limitan su potencial uso como drogas anticonvulsionantes (**Henshall y cols., 2013**).

Cbx es uno de los bloqueador de GJs más ampliamente utilizados como AEDs, sin embargo, un informe mostró un efecto proconvulsionante (**Voss y cols., 2009**). La alcalinización intracelular, causada por trimetilamina y cloruro de amonio, aumenta GJs, y también aumenta la actividad epileptiforme (**Perez-Velazquez y cols., 1994; Kohling y cols., 2001**). Del mismo modo, una droga utilizada contra la malaria, la quinina, bloquea fuertemente las GJs neuronales formadas por CX36 y en menor grado Cx45 (**Srinivas y**

Spray, 2003), paradójicamente aumenta la actividad convulsiva neocortical causada por la baja perfusión de magnesio, mediante el bloqueo de la sincronización de interneuronas inhibitorias (**Voss y cols., 2009**).

Se ha demostrado que agentes bloqueadores de GJs también tienen efectos sobre HCs Cxs y Panxs (**Giaume y Theis, 2010**). Varios de los compuestos de la familia de bloqueadores fenamate bloquean HCs Panx1 en el siguiente orden: mefloquina, carbenoxolona y ácido flufenámico (**Iglesias y cols., 2009**). Los estudios también han demostrado que HCs Panx1 son 1.000 a 10.000 veces más sensible a la mefloquina que GJs Cx43 (**Cruikshank y cols., 2004; Iglesias y cols., 2008**). Aunque las sustancias tales como gadolinio (Gd^{3+}) y lantano (La^{3+}) bloquean HCs Cxs y Panx1, estos bloqueadores no son ion específicos ya que también bloquean otros canales como canales de Ca^{2+} (**Liu y cols., 2008**). Alcoholes de cadena larga son conocidos por bloquear HCs Cxs, pero tiene muy poco efecto sobre HCs Panxs. Por el contrario, concentraciones bajas (5-10 μ M) de Cbx solo bloquea HCs Panx1 y sólo tienen un efecto inhibitor menor sobre HCs Cx (**Schalper y cols., 2008**). Los resultados obtenidos son concordantes con los anteriormente expuestos y demostraron que Cbx tanto a bajas y altas concentraciones bloquea la captación de Etd^+ (actividad de HCs Panxs y Cxs, respectivamente) inducida por PTZ a la condición basal en microglías, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. Sugiriendo la participación de actividad HCs Cxs y Panxs en el episodio epileptogénico. Mientras que el bloqueador específico de P2X₇R administrado como pretratamiento a la inducción de epilepsia, logró disminuir las convulsiones epilépticas y previno la apertura de HCs en microglías, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. Sin embargo, es necesario buscar nuevas drogas que sean específicas de HCs o P2X₇R para evitar los efectos colaterales que actualmente presentan los bloqueadores de GJs.

9 Molécula D4 bloqueador específico de HCs Cxs como potencial AED.

En el presente trabajo de tesis se demostró que la molécula D4 es efectiva en la prevención y reducción de las convulsiones epilépticas y el tiempo de recuperación, sin muerte. Estos hallazgos se comprobaron por registros encefalográficos realizados por el Dr Luis Barro del Instituto Ramón y Cajal (Madrid, España), en colaboración con el Dr. Juan Carlos Sáez. Utilizando un modelo agudo de epilepsia por inyección intracraneal de ácido kaínico (20 mg/kg), se evidenció que el pre-tratamiento con una dosis única de la molécula D4 (40 mg/kg) previene completamente la crisis epiléptica (**Apéndice E**). Además, nosotros demostramos que bloquea completamente la actividad de HCs en las distintas células gliales y neuronas.

Los tratamientos actuales contra la epilepsia se enfocan en blancos moleculares localizados en neuronas y no en células gliales. El aumento de la actividad neuronal produce mayor liberación de neurotransmisores y de iones sodio que producen la activación de las glías, iniciando un estado inflamatorio que conduce a un desbalance del microambiente neuronal favoreciendo la recurrencia del aumento de actividad neuronal. Se busca reducir o evitar la neuroinflamación para prevenir las recurrencias de alta actividad neuronal.

A diferencia de los medicamentos utilizados actualmente para el tratamiento de la epilepsia, el presente proyecto provee un tratamiento enfocado en las células gliales, que son las responsables del estado inflamatorio que se desencadena cuando se exagera la actividad neuronal, y que en condiciones normales nutren a las neuronas y mantienen el medio ambiente para que las neuronas funcionen normalmente. Mientras que en condiciones patológicas, las

glías expresan un aumento de la actividad de HCs, por lo cual no pueden cumplir dichas funciones normales dejando a las neuronas en un estado de excitación desregulado, que podría conducir a excitotoxicidad o muerte neuronal. Por esto, la hipótesis inicial para desarrollar en este proyecto fue que el aumento de la actividad neuronal produce una alta liberación de neurotransmisores y de iones potasio que activan las glías (micro- y macro-glias), las que inician un estado inflamatorio, que se perpetúa favoreciendo la recurrencia del aumento de actividad neuronal. Consistente con este mecanismo, se ha demostrado que en otras condiciones que desencadenan la respuesta de neuroinflamación, como son el infarto cerebral y la enfermedad de Alzheimer, la actividad de los HCs gliales aumenta significativamente y participa en la degeneración celular. En el infarto cerebral en presencia de alta glicemia no solo induce muerte neuronal sino que además mueren células gliales, y estudios *in vitro* han demostrado que la inhibición de los HCs reduce drásticamente la muerte astrogliar en cultivos celulares expuestos a alta glucosa y falta de oxígeno, condición que imita el infarto cerebral (**Orellana y cols., 2009b**). Además, hemos demostrado que el péptido β amiloideo, responsable de la neuroinflamación presente en la enfermedad de Alzheimer, aumenta la actividad de los HCs gliales y por ende las células liberan más glutamato y ATP induciendo muerte neuronal (**Orellana y cols., 2011a; Orellana y cols., 2011b**). En consecuencia, el uso de inhibidores de HCs Cxs permite reducir o evitar la neuroinflamación, reducir drásticamente el deterioro cerebral y por ende, podría prevenir las recurrencias de las crisis epilépticas y así evitar el aumento progresivo del daño cerebral y podría mejorar sustancialmente la calidad de vida del paciente, contribuyendo con la inclusión social, laboral, educacional y familiar.

Reciente evidencia muestra que la participación de los HCs (presentes en mastocitos, microglías, astrocitos y neuronas) es crucial en los procesos inflamatorios que afectan al SNC,

ya que los mastocitos liberan varias moléculas pro-inflamatorias como la histamina y citocinas (TNF- α e IL-1 β), mientras que las glías liberan gliotransmisores excitotóxicos como glutamato y ATP (Orellana et al. 2012; Sáez and Leybaert, 2014; Harcha et al., 2015). Si bien se conocen numerosos moduladores de Cxs y varias líneas de investigación sugieren que su uso puede tener utilidad terapéutica en el tratamiento de epilepsia, arritmias cardíacas, cáncer, accidente cerebrovascular u otras condiciones (Spray et al. 2002), todos de ellos son inespecíficos, afectando la actividad no solo de los HCs, sino también de canales intercelulares formados por Cxs (Chen y cols., 2013), por lo que los compuestos conocidos actualmente en la técnica presentan baja eficacia y mecanismos de acción inespecíficos o secundarios a la acción farmacológica en otros blancos terapéuticos que modifican la actividad de los HCs Cxs y son por lo tanto, responsables de efectos secundarios que no permiten usarlos en forma crónica ni en dosis superiores para controlar efectivamente las patologías de interés.

A partir de lo anterior, se desprende que en la actualidad, los bloqueadores de HCs Cxs disponibles también inhiben las Gjs, que desempeñan un papel relevante en la coordinación de numerosas respuestas eléctricas y metabólicas en diversos tejidos (Chen y cols., 2013). Por lo tanto, es deseable la obtención de compuestos bloqueadores selectivos de HCs, que no presenten efecto sobre las Gjs, que podrían ser útiles para diseñar racionalmente tratamientos terapéuticos para diversas enfermedades, minimizando los efectos secundarios no deseados.

Proponemos a la molécula D4 como tratamiento para la epilepsia refractaria ya que inhibe selectivamente los HCs Cxs. El Estudio de Patentabilidad OS020612 para el uso de la molécula D4 realizado por la Pontificia Universidad Católica de Chile, concluye que: sería factible de patentar si cuenta con nivel inventivo”.

CONCLUSIÓN

Los oligodendrocitos expresan el inflammasoma NLRP3.

El inflammasoma NLRP3 es activado en oligodendrocitos por la exposición prenatal a DEX.

Factores solubles liberados por microglías y astrocitos como IL-1 β y TNF- α aumentan los niveles de mRNA y la expresión de las proteínas del inflammasoma y sus mediadores en oligodendrocitos.

La inhibición de los mastocitos evita la activación de HCs en las células gliales y neuronales del hipocampo.

La inhibición de CRHR evita la activación de HCs en mastocitos, células gliales y neuronas.

La activación de HCs en oligodendrocitos inducida por la exposición prenatal a DEX persiste hasta la edad adulta y no es revertida por una nodriza no tratada con DEX.

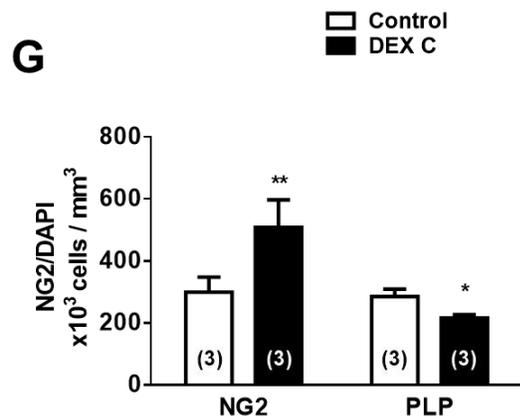
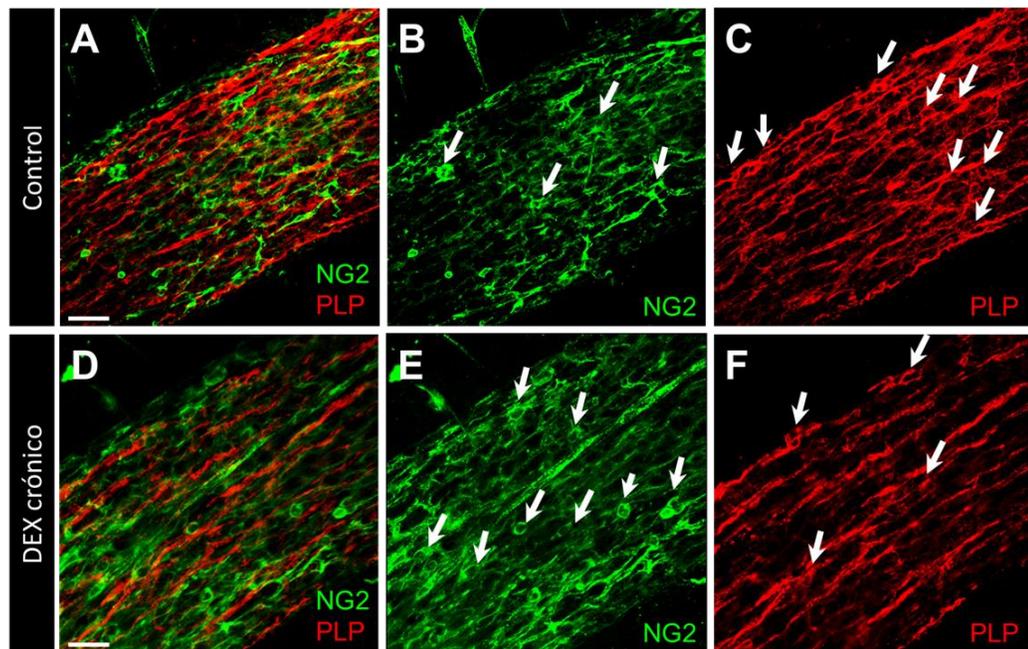
Los mastocitos, células gliales y neuronales responden en orden temporal en respuesta a la exposición prenatal a DEX.

Las células gliales y neuronales responden en orden temporal en respuesta a una crisis epiléptica inducida por PTZ.

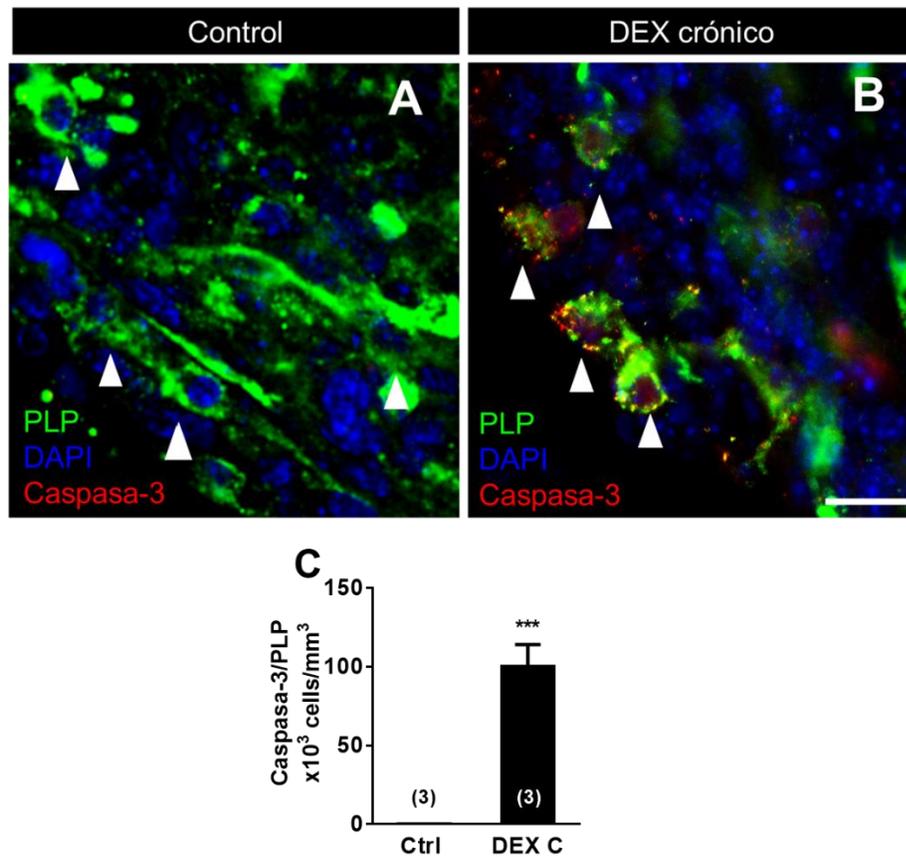
Crisis epiléptica inducida por PTZ induce aumento de actividad de los HCs Cxs y HCs Panx1

El bloqueo de HCs Cx y P2X₇R disminuyen las convulsiones epilépticas y el tiempo de recuperación, sin muerte.

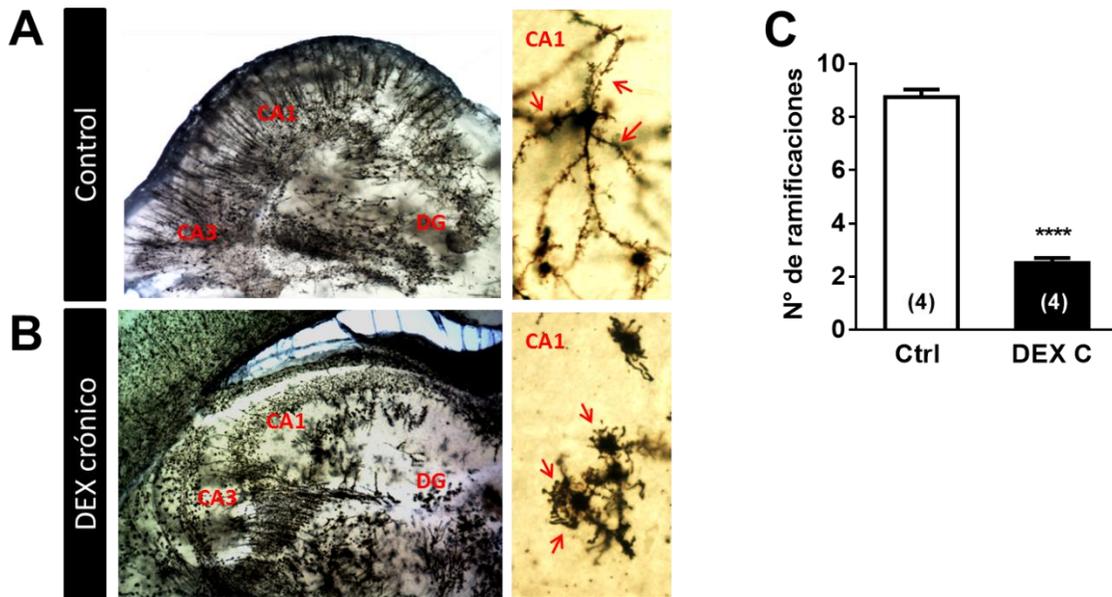
APÉNDICE



Apéndice A. DEX prenatal crónico induce en cerebro de neonatos un aumento de reactividad de NG2 en el cuerpo calloso. Imágenes representativas que muestran la detección de (A-B, D-E) NG2 (verde, fecha) y (A, C-D, F) PLP positivos (rojo, flecha) en rebanadas de cerebro de crías (A-C) control y (D-F) estresados. (G) Intensidad de fluorescencia relativa de NG2 y PLP. Los datos corresponden al promedio de reactividad por núcleo \pm SEM obtenidos de tres experimentos independientes. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ frente a la condición control. Barras de calibración: 20 μ m. Estadística: test de t de Student.



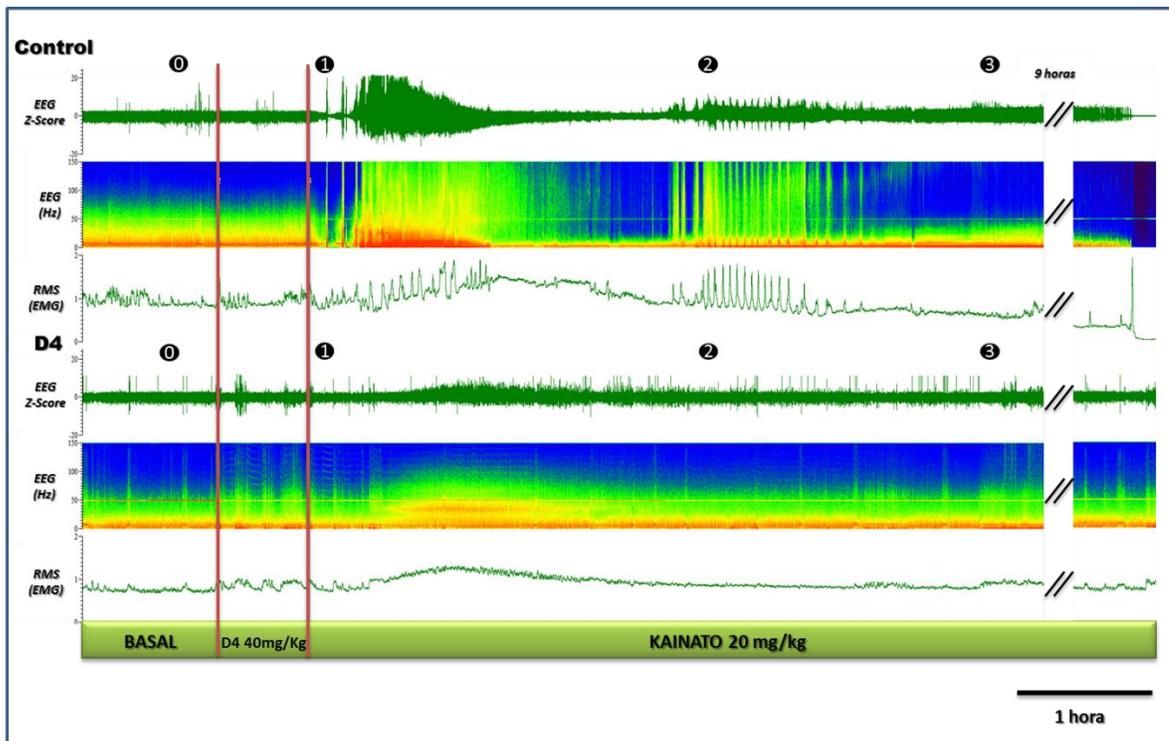
Apéndice B. DEX prenatal crónico induce apoptosis de oligodendrocitos en el hipocampo de las crías. Imágenes de cortes coronales del hipocampo triple marcaje con PLP (verde, punta de flecha), caspasa-3 activa (rojo) y DAPI (azul) de crías (A) control y (B) estresados. (C) Cuantificación de caspasa-3 en células PLP-positivo (células / mm³). Los datos corresponden al promedio de reactividad por núcleo \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. *** $p < 0,001$ frente a la condición control. Barras de calibración: 40 μ m. Estadística: test de *t* de Student.



Apéndice C. El largo dendrítico y ramificaciones de las neuronas de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo se reduce en las crías de madres tratadas con DEX. Cortes de hipocampo de ratones fueron procesados con la tinción de Golgi y el número de ramificaciones dendríticas fue evaluado por el método de Sholl. Imagen representativa de hipocampo de una cría (A) control y (B) tratada con DEX. Adjunta a cada imagen se muestra una magnificación de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Las flechas indican ramificaciones dendríticas. (C) Cuantificación del número de ramificaciones dendríticas de neuronas piramidales de crías control y tratadas con DEX. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Los números entre paréntesis o en las barras indican el valor de n. **** $p < 0,0001$ con respecto a la condición control. Estadística: test de *t* de Student.

VARIABLES A CONSIDERAR		PERIODICIDAD	PUNTUACIÓN
DATOS FISIOLÓGICOS Perdida de Peso	Normal (no hay pérdida de peso) Pérdida de peso inferior al 10% Pérdida de peso entre el 10-20%. Posible disminución en la ingesta de alimento Pérdida de peso superior al 20%. El animal no consume agua ni alimento	Diario	0 1 2 3
ASPECTO Postura	Normal (erguido, se cuelga en su jaula, pelaje lustroso) Evita moverse, pelaje hirsuto, puede que haya secreción porfírica en nariz y ojos (roja) Encorvado, inmóvil al fondo de la jaula, abúlico, pelaje hirsuto, secreción porfírica en nariz y ojos (roja) Postrado, de cubito lateral, deshidratación evidente, ojos hundidos.	Diario	0 1 2 3
COMPORTAMIENTO ESPONTÁNEO (Actitud frente a estímulo)	Normal (atento al medio, interactúa con sus pares, acicalamiento) Pequeños cambios (reduce el acicalamiento y el desplazamiento, movimiento respiratorios rápidos, tiende a quedarse al fondo de la jaula) Desplazamiento tambaleante, inactivo o retraído al fondo de la jaula, respiración abdominal. Animal inmóvil, postrado de cubito lateral, abre la boca al respirar.	Diario	0 1 2 3

Apéndice D. Protocolo de supervisión para ratones tratados con molécula D4. La exposición de los ratones a las diferentes dosis de la molécula D4 se evaluó mediante un protocolo de supervisión de puntuación total de 0 a 12. Cuando un animal obtuvo una puntuación de 3 en más de un parámetro, todos los “3” pasaron a “4”. Medidas correctoras sugeridas de acuerdo a la puntuación obtenida para cada animal fueron: 0-3 Normal, 4-6 supervisar cuidadosamente, 7-12 sufrimiento intenso. Criterios de punto final: puntuaciones entre 7-12 fueron indicadores de que el animal presentaba un deterioro significativo o sufrimiento intenso.



Apéndice E. Pretratamiento con la molécula D4 inhibe las crisis convulsivas inducidas por kainato. Registro encefalográfico (EEG) muestra las diferentes etapas de un episodio convulsivo, inducido por kainato (20 mg/kg) en ratones C57BL/6J. El trazo correspondiente al control muestra entre los estadios 1 y 2 los cambios en la actividad eléctrica como la severidad de las crisis, mientras que el pretratamiento con la molécula D4 (40 mg/kg) en dosis única inhibe casi completamente la crisis inducida por kainato. En el control, inyectado con el vehículo, aparecen crisis generalizadas tónico-clónicas, después de unos minutos esta crisis se repiten 9-10 veces durante las siguientes 3-4 horas; en una segunda fase hay puntas y puntas-onda de forma continua que duran muchas horas (estadios 2 y 3) y al final el ratón muere. Por el contrario, no hay crisis generalizadas, ni puntas-ondas y solo una actividad de puntas mantenidas durante unas pocas horas y el EEG del ratón se normaliza completamente con D4. Además, no se hay porcentaje de muerte.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, A., Maturana, C.J., Harcha, P.A. y Saez, J.C. (2013). Possible involvement of TLRs and hemichannels in stress-induced CNS dysfunction via mastocytes, and glia activation. *Mediators Inflamm* **2013**, 893521.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K. y Ma, T.Y. (2008). Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* **180**, 5653-61.
- Alcocer-Gomez, E., Ulecia-Moron, C., Marin-Aguilar, F., Rybkina, T., Casas-Barquero, N., Ruiz-Cabello, J., Ryffel, B., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Bullon, P., Sanchez-Alcazar, J.A., Carrion, A.M. y Cordero, M.D. (2015). Stress-Induced Depressive Behaviors Require a Functional NLRP3 Inflammasome. *Mol Neurobiol*.
- Alkadhi, K. (2013). Brain Physiology and Pathophysiology in Mental Stress. *ISRN Physiology* **2013**, 1-23.
- Alysandratos, K.D., Asadi, S., Angelidou, A., Zhang, B., Sismanopoulos, N., Yang, H., Critchfield, A. y Theoharides, T.C. (2012). Neurotensin and CRH interactions augment human mast cell activation. *PLoS One* **7**, e48934.
- Antonow-Schlorke, I., Helgert, A., Gey, C., Coksaygan, T., Schubert, H., Nathanielsz, P.W., Witte, O.W. y Schwab, M. (2009). Adverse effects of antenatal glucocorticoids on cerebral myelination in sheep. *Obstet Gynecol* **113**, 142-51.
- Aronica, E. y Crino, P.B. (2011). Inflammation in epilepsy: clinical observations. *Epilepsia* **52 Suppl 3**, 26-32.
- Arsenault-Lapierre, G., Kim, C. y Turecki, G. (2004). Psychiatric diagnoses in 3275 suicides: a meta-analysis. *BMC Psychiatry* **4**, 37.
- Arvin, K.L., Han, B.H., Du, Y., Lin, S.Z., Paul, S.M. y Holtzman, D.M. (2002). Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* **52**, 54-61.
- Asztalos, E. (2012). Antenatal corticosteroids: a risk factor for the development of chronic disease. *J Nutr Metab* **2012**, 930591.

Avendano, B.C., Montero, T.D., Chavez, C.E., von Bernhardt, R. y Orellana, J.A. (2015). Prenatal exposure to inflammatory conditions increases Cx43 and Panx1 unopposed channel opening and activation of astrocytes in the offspring effect on neuronal survival. *Glia*.

Baier, C.J., Katunar, M.R., Adrover, E., Pallares, M.E. y Antonelli, M.C. (2012). Gestational restraint stress and the developing dopaminergic system: an overview. *Neurotox Res* **22**, 16-32.

Baldauf, C.M., Cukiert, A., Argentoni, M., Baise-Zung, C., Forster, C.R., Mello, V.A., Burattini, J.A., Mariani, P.P., Camara, R.B. y Seda, L. (2006). Surgical outcome in patients with refractory epilepsy associated to MRI-defined unilateral mesial temporal sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* **64**, 363-8.

Baquedano, E., Garcia-Caceres, C., Diz-Chaves, Y., Lagunas, N., Calmarza-Font, I., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., Argente, J., Chowen, J.A. y Frago, L.M. (2011). Prenatal stress induces long-term effects in cell turnover in the hippocampus-hypothalamus-pituitary axis in adult male rats. *PLoS One* **6**, e27549.

Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., Shagin, D., Nazarenko, S., Geraymovych, E., Litvin, O., Tiunova, A., Born, T.L., Usman, N., Staroverov, D., Lukyanov, S. y Panchin, Y. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* **83**, 706-16.

Barker, D.J. (2004). The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* **93**, 26-33.

Baroja-Mazo, A., Barbera-Cremades, M. y Pelegrin, P. (2013). The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 79-93.

Barros, V.G., Duhalde-Vega, M., Caltana, L., Brusco, A. y Antonelli, M.C. (2006). Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain. *J Neurosci Res* **83**, 787-800.

Belda, X., Fuentes, S., Daviu, N., Nadal, R. y Armario, A. (2015). Stress-induced sensitization: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond. *Stress* **18**, 269-79.

Beletsky, V. y Mirsattari, S.M. (2012). Epilepsy, mental health disorder, or both? *Epilepsy Res Treat* **2012**, 163731.

Bennett, G.A., Palliser, H.K., Shaw, J.C., Walker, D. y Hirst, J.J. (2015). Prenatal Stress Alters Hippocampal Neuroglia and Increases Anxiety in Childhood. *Dev Neurosci* **37**, 533-45.

Block, M.L. y Hong, J.S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* **76**, 77-98.

Bock, J., Murmu, M.S., Biala, Y., Weinstock, M. y Braun, K. (2011). Prenatal stress and neonatal handling induce sex-specific changes in dendritic complexity and dendritic spine density in hippocampal subregions of prepubertal rats. *Neuroscience* **193**, 34-43.

Boison, D. (2007). Cell and gene therapies for refractory epilepsy. *Curr Neuropharmacol* **5**, 115-25.

Bosnjak, J., Vukovic-Bobic, M. y Mejaski-Bosnjak, V. (2002). Effect of war on the occurrence of epileptic seizures in children. *Epilepsy Behav* **3**, 502-509.

Branchi, I., Alboni, S. y Maggi, L. (2014). The role of microglia in mediating the effect of the environment in brain plasticity and behavior. *Front Cell Neurosci* **8**, 390.

Brand-Schieber, E., Werner, P., Iacobas, D.A., Iacobas, S., Beelitz, M., Lowery, S.L., Spray, D.C. y Scemes, E. (2005). Connexin43, the major gap junction protein of astrocytes, is down-regulated in inflamed white matter in an animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* **80**, 798-808.

Bruzzone, R., Hormuzdi, S.G., Barbe, M.T., Herb, A. y 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**, 13644-9.

Busillo, J.M., Azzam, K.M. y Cidlowski, J.A. (2011). Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem* **286**, 38703-13.

Cappellano, G., Carecchio, M., Fleetwood, T., Magistrelli, L., Cantello, R., Dianzani, U. y Comi, C. (2013). Immunity and inflammation in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis* **2**, 89-107.

Caso, J.R., Pradillo, J.M., Hurtado, O., Leza, J.C., Moro, M.A. y Lizasoain, I. (2008). Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke. *Stroke* **39**, 1314-20.

Catterall, W.A. (2014). Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **54**, 317-38.

Cea, L.A., Cisterna, B.A., Puebla, C., Frank, M., Figueroa, X.F., Cardozo, C., Willecke, K., Latorre, R. y Saez, J.C. (2013). De novo expression of connexin hemichannels in denervated fast skeletal muscles leads to atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 16229-34.

Coll, R.C., Robertson, A.A., Chae, J.J., Higgins, S.C., Munoz-Planillo, R., Inserra, M.C., Vetter, I., Dungan, L.S., Monks, B.G., Stutz, A., Croker, D.E., Butler, M.S., Haneklaus, M., Sutton, C.E., Nunez, G., Latz, E., Kastner, D.L., Mills, K.H., Masters, S.L., Schroder, K., Cooper, M.A. y O'Neill, L.A. (2015). A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* **21**, 248-55.

Cottrell, E.C., Holmes, M.C., Livingstone, D.E., Kenyon, C.J. y Seckl, J.R. (2012). Reconciling the nutritional and glucocorticoid hypotheses of fetal programming. *FASEB J* **26**, 1866-74.

Cruikshank, S.J., Hopperstad, M., Younger, M., Connors, B.W., Spray, D.C. y Srinivas, M. (2004). Potent block of Cx36 and Cx50 gap junction channels by mefloquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12364-9.

Charil, A., Laplante, D.P., Vaillancourt, C. y King, S. (2010). Prenatal stress and brain development. *Brain Res Rev* **65**, 56-79.

Chen, A., Vaughan, J. y Vale, W.W. (2003). Glucocorticoids regulate the expression of the mouse urocortin II gene: a putative connection between the corticotropin-releasing factor receptor pathways. *Mol Endocrinol* **17**, 1622-39.

Chen, W., Gao, Z., Ni, Y. y Dai, Z. (2013). Carbenoxolone pretreatment and treatment of posttraumatic epilepsy. *Neural Regen Res* **8**, 169-76.

Cheung, G., Chever, O. y Rouach, N. (2014). Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. *Front Cell Neurosci* **8**, 348.

Dahl, G. y Keane, R.W. (2012). Pannexin: from discovery to bedside in 11+/-4 years? *Brain Res* **1487**, 150-9.

Dambach, H., Hinkerohe, D., Prochnow, N., Stienen, M.N., Moinfar, Z., Haase, C.G., Hufnagel, A. y Faustmann, P.M. (2014). Glia and epilepsy: experimental investigation of antiepileptic drugs in an astroglia/microglia co-culture model of inflammation. *Epilepsia* **55**, 184-92.

Davis, E.P., Sandman, C.A., Buss, C., Wing, D.A. y Head, K. (2013). Fetal glucocorticoid exposure is associated with preadolescent brain development. *Biol Psychiatry* **74**, 647-55.

de Kloet, E.R., Joels, M. y Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* **6**, 463-75.

de Pablos, R.M., Villaran, R.F., Arguelles, S., Herrera, A.J., Venero, J.L., Ayala, A., Cano, J. y Machado, A. (2006). Stress increases vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci* **26**, 5709-19.

de Punder, K. y Pruijboom, L. (2015). Stress induces endotoxemia and low-grade inflammation by increasing barrier permeability. *Front Immunol* **6**, 223.

Dermitzaki, E., Liapakis, G., Androulidaki, A., Venihaki, M., Melissas, J., Tsatsanis, C. y Margioris, A.N. (2014). Corticotrophin-Releasing Factor (CRF) and the urocortins are potent regulators of the inflammatory phenotype of human and mouse white adipocytes and the differentiation of mouse 3T3L1 pre-adipocytes. *PLoS One* **9**, e97060.

Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., De Lanerolle, N.C. y Rogawski, M.A. (2013). Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci* **36**, 174-84.

Diz-Chaves, Y., Astiz, M., Bellini, M.J. y Garcia-Segura, L.M. (2013). Prenatal stress increases the expression of proinflammatory cytokines and exacerbates the inflammatory response to LPS in the hippocampal formation of adult male mice. *Brain Behav Immun* **28**, 196-206.

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

Dong, Y. y Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* **36**, 180-90.

Drake, A.J., Tang, J.I. y Nyirenda, M.J. (2007). Mechanisms underlying the role of glucocorticoids in the early life programming of adult disease. *Clin Sci (Lond)* **113**, 219-32.

Dubreuil, P., Letard, S., Ciufolini, M., Gros, L., Humbert, M., Casteran, N., Borge, L., Hajem, B., Lermet, A., Sippl, W., Voisset, E., Arock, M., Auclair, C., Leventhal, P.S., Mansfield, C.D., Moussy, A. y Hermine, O. (2009). Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS One* **4**, e7258.

Dupuis, N. y Auvin, S. (2015). Inflammation and epilepsy in the developing brain: clinical and experimental evidence. *CNS Neurosci Ther* **21**, 141-51.

Dutta, G., Zhang, P. y Liu, B. (2008). The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol* **22**, 453-64.

Edye, M.E., Walker, L. E., Sills, G. J., Allan S. M. and Brough, D. (2014). Epilepsy and the inflammasome: Targeting inflammation as a novel therapeutic strategy for seizure disorders. *Inflammasome* **1**, 36-43.

Ehrlich, D.E. y Rainnie, D.G. (2015). Prenatal Stress Alters the Development of Socioemotional Behavior and Amygdala Neuron Excitability in Rats. *Neuropsychopharmacology* **40**, 2135-45.

Engel, T., Gomez-Villafuertes, R., Tanaka, K., Mesuret, G., Sanz-Rodriguez, A., Garcia-Huerta, P., Miras-Portugal, M.T., Henshall, D.C. y Diaz-Hernandez, M. (2012). Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB J* **26**, 1616-28.

Espinosa-Oliva, A.M., de Pablos, R.M., Villaran, R.F., Arguelles, S., Venero, J.L., Machado, A. y Cano, J. (2011). Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging* **32**, 85-102.

Facci, L., Barbierato, M., Marinelli, C., Argentini, C., Skaper, S.D. y Giusti, P. (2014). Toll-like receptors 2, -3 and -4 prime microglia but not astrocytes across central nervous system regions for ATP-dependent interleukin-1beta release. *Sci Rep* **4**, 6824.

Fan, L.W., Pang, Y., Lin, S., Rhodes, P.G. y Cai, Z. (2005). Minocycline attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neuroscience* **133**, 159-68.

Feng, L., Chen, Y., Ding, R., Fu, Z., Yang, S., Deng, X. y Zeng, J. (2015). P2X7R blockade prevents NLRP3 inflammasome activation and brain injury in a rat model of intracerebral hemorrhage: involvement of peroxynitrite. *J Neuroinflammation* **12**, 190.

Foresti, M.L., Arisi, G.M. y Shapiro, L.A. (2011). Role of glia in epilepsy-associated neuropathology, neuroinflammation and neurogenesis. *Brain Res Rev* **66**, 115-22.

Franco-Perez, J., Ballesteros-Zebadua, P. y Manjarrez-Marmolejo, J. (2015). Anticonvulsant effects of mefloquine on generalized tonic-clonic seizures induced by two acute models in rats. *BMC Neurosci* **16**, 7.

Franchi, L., Eigenbrod, T. y Nunez, G. (2009). Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol* **183**, 792-6.

Frank, M.G., Hershman, S.A., Weber, M.D., Watkins, L.R. y Maier, S.F. (2014). Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* **40**, 191-200.

Frank, M.G., Thompson, B.M., Watkins, L.R. y Maier, S.F. (2012). Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses. *Brain Behav Immun* **26**, 337-45.

Frank, M.G., Watkins, L.R. y Maier, S.F. (2011). Stress- and glucocorticoid-induced priming of neuroinflammatory responses: potential mechanisms of stress-induced vulnerability to drugs of abuse. *Brain Behav Immun* **25 Suppl 1**, S21-8.

Frank, M.G., Weber, M.D., Watkins, L.R. y Maier, S.F. (2015). Stress sounds the alarmin: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain Behav Immun*.

Freitas-Andrade, M. y Naus, C.C. (2015). Astrocytes in neuroprotection and neurodegeneration: The role of connexin43 and pannexin1. *Neuroscience*.

Froger, N., Orellana, J.A., Calvo, C.F., Amigou, E., Kozoriz, M.G., Naus, C.C., Saez, J.C. y Giaume, C. (2010). Inhibition of cytokine-induced connexin43 hemichannel activity in astrocytes is neuroprotective. *Mol Cell Neurosci* **45**, 37-46.

Froger, N., Orellana, J.A., Cohen-Salmon, M., Ezan, P., Amigou, E., Saez, J.C. y Giaume, C. (2009). Cannabinoids prevent the opposite regulation of astroglial connexin43 hemichannels and gap junction channels induced by pro-inflammatory treatments. *J Neurochem* **111**, 1383-97.

Fung, A., Vizcaychipi, M., Lloyd, D., Wan, Y. y Ma, D. (2012). Central nervous system inflammation in disease related conditions: mechanistic prospects. *Brain Res* **1446**, 144-55.

Garate, I., Garcia-Bueno, B., Madrigal, J.L., Caso, J.R., Alou, L., Gomez-Lus, M.L., Mico, J.A. y Leza, J.C. (2013). Stress-induced neuroinflammation: role of the Toll-like receptor-4 pathway. *Biol Psychiatry* **73**, 32-43.

Garbrecht, M.R., Klein, J.M., Schmidt, T.J. y Snyder, J.M. (2006). Glucocorticoid metabolism in the human fetal lung: implications for lung development and the pulmonary surfactant system. *Biol Neonate* **89**, 109-19.

Garcia-Bueno, B., Caso, J.R. y Leza, J.C. (2008). Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* **32**, 1136-51.

Garcia-Bueno, B. y Leza, J.C. (2008). [Inflammatory/anti-inflammatory mechanisms in the brain following exposure to stress]. *Rev Neurol* **46**, 675-83.

Gardener, H., Munger, K.L., Chitnis, T., Michels, K.B., Spiegelman, D. y Ascherio, A. (2009). Prenatal and perinatal factors and risk of multiple sclerosis. *Epidemiology* **20**, 611-8.

Gareri, P., Condorelli, D., Belluardo, N., Gratteri, S., Ferreri, G., Donato Di Paola, E., De Sarro, A. y De Sarro, G. (2004). Influence of carbenoxolone on the anticonvulsant efficacy of conventional antiepileptic drugs against audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Eur J Pharmacol* **484**, 49-56.

Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C.C. y Saez, J.C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol* **4**, 88.

Giaume, C. y Theis, M. (2010). Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Res Rev* **63**, 160-76.

Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C. y Gage, F.H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* **140**, 918-34.

Gombault, A., Baron, L. y Couillin, I. (2012). ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front Immunol* **3**, 414.

Grammatopoulos, D.K. (2012). Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction. *Br J Pharmacol* **166**, 85-97.

Grossmann, C., Wuttke, M., Ruhs, S., Seiferth, A., Mildenerger, S., Rabe, S., Schwerdt, G. y Gekle, M. (2010). Mineralocorticoid receptor inhibits CREB signaling by calcineurin activation. *FASEB J* **24**, 2010-9.

Gustin, A., Kirchmeyer, M., Koncina, E., Felten, P., Losciuto, S., Heurtaux, T., Tardivel, A., Heuschling, P. y Dostert, C. (2015). NLRP3 Inflammasome Is Expressed and Functional in Mouse Brain Microglia but Not in Astrocytes. *PLoS One* **10**, e0130624.

Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D.M., Vannucci, S.J., Levison, S.W., Vexler, Z.S. y Gressens, P. (2015). The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol* **11**, 192-208.

Hammen, C., Kim, E.Y., Eberhart, N.K. y Brennan, P.A. (2009). Chronic and acute stress and the prediction of major depression in women. *Depress Anxiety* **26**, 718-23.

Harcha, P.A., Vargas, A., Yi, C., Koulakoff, A.A., Giaume, C. y Saez, J.C. (2015). Hemichannels Are Required for Amyloid beta-Peptide-Induced Degranulation and Are Activated in Brain Mast Cells of APPswe/PS1dE9 Mice. *J Neurosci* **35**, 9526-38.

Hashemi, P., Ebrahimi, L., Saboory, E. y Roshan-Milani, S. (2013). Effect of Restraint Stress during Gestation on Pentylentetrazol-Induced Epileptic Behaviors in Rat Offspring. *Iran J Basic Med Sci* **16**, 979-84.

Hayakawa, K., Arai, K. y Lo, E.H. (2010). Role of ERK map kinase and CRM1 in IL-1beta-stimulated release of HMGB1 from cortical astrocytes. *Glia* **58**, 1007-15.

Henshall, D.C., Diaz-Hernandez, M., Miras-Portugal, M.T. y Engel, T. (2013). P2X receptors as targets for the treatment of status epilepticus. *Front Cell Neurosci* **7**, 237.

Henshall, D.C. y Engel, T. (2015). P2X purinoceptors as a link between hyperexcitability and neuroinflammation in status epilepticus. *Epilepsy Behav* **49**, 8-12.

Hernandez, J.C., Latz, E. y Urcuqui-Inchima, S. (2014). HIV-1 induces the first signal to activate the NLRP3 inflammasome in monocyte-derived macrophages. *Intervirology* **57**, 36-42.

Herve, J.C., Derangeon, M., Sarrouilhe, D., Giepmans, B.N. y Bourmeyster, N. (2012). Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes. *Biochimica et biophysica acta* **1818**, 1844-65.

Himmerich, H., Berthold-Losleben, M. y Pollmacher, T. (2009). [The relevance of the TNF-alpha system in psychiatric disorders]. *Fortschr Neurol Psychiatr* **77**, 334-45.

Hinkerohe, D., Smikalla, D., Haghikia, A., Heupel, K., Haase, C.G., Dermietzel, R. y Faustmann, P.M. (2005). Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model. *Glia* **52**, 85-97.

Honore, P., Donnelly-Roberts, D., Namovic, M.T., Hsieh, G., Zhu, C.Z., Mikusa, J.P., Hernandez, G., Zhong, C., Gauvin, D.M., Chandran, P., Harris, R., Medrano, A.P., Carroll, W., Marsh, K., Sullivan, J.P., Faltynek, C.R. y Jarvis, M.F. (2006). A-740003 [N-(1-[[[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino]-2,2-dimethylpropyl]-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 1376-85.

Huang, L.T. (2014). Early-life stress impacts the developing hippocampus and primes seizure occurrence: cellular, molecular, and epigenetic mechanisms. *Front Mol Neurosci* **7**, 8.

Huang, W.L., Harper, C.G., Evans, S.F., Newnham, J.P. y Dunlop, S.A. (2001). Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci* **19**, 415-25.

Hubbard, J.A., Hsu, M.S., Fiacco, T.A. y Binder, D.K. (2013). Glial cell changes in epilepsy: overview of the clinical problem and therapeutic opportunities. *Neurochem Int* **63**, 638-51.

Hubner, S., Dejager, L., Libert, C. y Tuckermann, J.P. (2015). The glucocorticoid receptor in inflammatory processes: transrepression is not enough. *Biol Chem* **396**, 1223-31.

Hung, S.C., Choi, C.H., Said-Sadier, N., Johnson, L., Atanasova, K.R., Sellami, H., Yilmaz, O. y Ojcius, D.M. (2013). P2X4 assembles with P2X7 and pannexin-1 in gingival epithelial cells and modulates ATP-induced reactive oxygen species production and inflammasome activation. *PLoS One* **8**, e70210.

Iglesias, R., Locovei, S., Roque, A., Alberto, A.P., Dahl, G., Spray, D.C. y Scemes, E. (2008). P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C752-60.

Iglesias, R., Spray, D.C. y Scemes, E. (2009). Mefloquine blockade of Pannexin1 currents: resolution of a conflict. *Cell Commun Adhes* **16**, 131-7.

Ildefonso, C.J., Jaime, H., Brown, E.E., Iwata, R.L., Ahmed, C.M., Massengill, M.T., Biswal, M.R., Boye, S.E., Hauswirth, W.W., Ash, J.D., Li, Q. y Lewin, A.S. (2016). Targeting the Nrf2 Signaling Pathway in the Retina With a Gene-Delivered Secretable and Cell-Penetrating Peptide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **57**, 372-86.

Itoh, K. y Watanabe, M. (2009). Paradoxical facilitation of pentylentetrazole-induced convulsion susceptibility in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience* **159**, 735-43.

Jabs, R., Seifert, G. y Steinhauser, C. (2008). Astrocytic function and its alteration in the epileptic brain. *Epilepsia* **49 Suppl 2**, 3-12.

Jakovcevski, I., Filipovic, R., Mo, Z., Rakic, S. y Zecevic, N. (2009). Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat* **3**, 5.

Jensen Pena, C., Monk, C. y Champagne, F.A. (2012). Epigenetic effects of prenatal stress on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain. *PLoS One* **7**, e39791.

Jha, S., Srivastava, S.Y., Brickey, W.J., Iocca, H., Toews, A., Morrison, J.P., Chen, V.S., Gris, D., Matsushima, G.K. y Ting, J.P. (2010). The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *J Neurosci* **30**, 15811-20.

Jia, N., Yang, K., Sun, Q., Cai, Q., Li, H., Cheng, D., Fan, X. y Zhu, Z. (2010). Prenatal stress causes dendritic atrophy of pyramidal neurons in hippocampal CA3 region by glutamate in offspring rats. *Dev Neurobiol* **70**, 114-25.

Jimenez-Mateos, E.M., Engel, T., Merino-Serrais, P., McKiernan, R.C., Tanaka, K., Mouri, G., Sano, T., O'Tuathaigh, C., Waddington, J.L., Prenter, S., Delanty, N., Farrell, M.A., O'Brien, D.F., Conroy, R.M., Stallings, R.L., DeFelipe, J. y Henshall, D.C. (2012). Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. *Nat Med* **18**, 1087-94.

Jimenez-Pacheco, A., Mesuret, G., Sanz-Rodriguez, A., Tanaka, K., Mooney, C., Conroy, R., Miras-Portugal, M.T., Diaz-Hernandez, M., Henshall, D.C. y Engel, T. (2013). Increased neocortical expression of the P2X7 receptor after status epilepticus and anticonvulsant effect of P2X7 receptor antagonist A-438079. *Epilepsia* **54**, 1551-61.

- Jin, C. y Flavell, R.A. (2010). Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol* **30**, 628-31.
- Joels, M. (2009). Stress, the hippocampus, and epilepsy. *Epilepsia* **50**, 586-97.
- Kajantie, E., Raivio, T., Janne, O.A., Hovi, P., Dunkel, L. y Andersson, S. (2004). Circulating glucocorticoid bioactivity in the preterm newborn after antenatal betamethasone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3999-4003.
- Kamasawa, N., Sik, A., Morita, M., Yasumura, T., Davidson, K.G., Nagy, J.I. y Rash, J.E. (2005). Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience* **136**, 65-86.
- Kassel, O. y Herrlich, P. (2007). Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects. *Mol Cell Endocrinol* **275**, 13-29.
- Kato, T.A. y Kanba, S. (2013). Are microglia minding us? Digging up the unconscious mind-brain relationship from a neuropsychanalytic approach. *Front Hum Neurosci* **7**, 13.
- Kawai, T. y Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* **21**, 317-37.
- Kellinghaus, C., Skidmore, C. y Loddenkemper, T. (2008). Lateralizing value of epileptic nystagmus. *Epilepsy Behav* **13**, 700-2.
- Kierdorf, K. y Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci* **7**, 44.
- Kim, D.R., Bale, T.L. y Epperson, C.N. (2015). Prenatal programming of mental illness: current understanding of relationship and mechanisms. *Curr Psychiatry Rep* **17**, 5.
- Kim, J.E. y Kang, T.C. (2011). The P2X7 receptor-pannexin-1 complex decreases muscarinic acetylcholine receptor-mediated seizure susceptibility in mice. *J Clin Invest* **121**, 2037-47.

Klaft, Z.J., Schulz, S.B., Maslarova, A., Gabriel, S., Heinemann, U. y Gerevich, Z. (2012). Extracellular ATP differentially affects epileptiform activity via purinergic P2X7 and adenosine A1 receptors in naive and chronic epileptic rats. *Epilepsia* **53**, 1978-86.

Kohling, R., Gladwell, S.J., Bracci, E., Vreugdenhil, M. y Jefferys, J.G. (2001). Prolonged epileptiform bursting induced by 0-Mg(2+) in rat hippocampal slices depends on gap junctional coupling. *Neuroscience* **105**, 579-87.

Koo, J.W. y Duman, R.S. (2008). IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 751-6.

Kovacs, K.J. (2013). CRH: the link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *J Chem Neuroanat* **54**, 25-33.

Krishnan, J. (2015). Taking a Toll in Brain Role of TLR4. *Int J Curr Microbiol App Sci* **4**, 283-296.

Kumar, G., Couper, A., O'Brien, T.J., Salzberg, M.R., Jones, N.C., Rees, S.M. y Morris, M.J. (2007). The acceleration of amygdala kindling epileptogenesis by chronic low-dose corticosterone involves both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Psychoneuroendocrinology* **32**, 834-42.

Kuzniecky, R. y Devinsky, O. (2007). Surgery Insight: surgical management of epilepsy. *Nat Clin Pract Neurol* **3**, 673-81.

Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A.T., Brodie, M.J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshe, S.L., Perucca, E., Wiebe, S. y French, J. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* **51**, 1069-77.

Lamkanfi, M. (2011). Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat Rev Immunol* **11**, 213-20.

Latz, E., Xiao, T.S. y Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* **13**, 397-411.

Laura, M.C., Xochitl, F.P., Anne, S. y Alberto, M.V. (2015). Analysis of connexin expression during seizures induced by 4-aminopyridine in the rat hippocampus. *J Biomed Sci* **22**, 69.

- Laxer, K.D., Trinka, E., Hirsch, L.J., Cendes, F., Langfitt, J., Delanty, N., Resnick, T. y Benbadis, S.R. (2014). The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy Behav* **37**, 59-70.
- Le Feuvre, R.A., Brough, D., Touzani, O. y Rothwell, N.J. (2003). Role of P2X7 receptors in ischemic and excitotoxic brain injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 381-4.
- Lee, G.S., Subramanian, N., Kim, A.I., Aksenitjevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D.B., Germain, R.N., Kastner, D.L. y Chae, J.J. (2012). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature* **492**, 123-7.
- Li, T., Giaume, C. y Xiao, L. (2014). Connexins-mediated glia networking impacts myelination and remyelination in the central nervous system. *Mol Neurobiol* **49**, 1460-71.
- Liu, H.T., Toychiev, A.H., Takahashi, N., Sabirov, R.Z. y Okada, Y. (2008). Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *Cell Res* **18**, 558-65.
- Liu, J., Buisman-Pijlman, F. y Hutchinson, M.R. (2014). Toll-like receptor 4: innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. *Front Neurosci* **8**, 309.
- Loane, D.J. y Byrnes, K.R. (2010). Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* **7**, 366-77.
- Lopatar, J., Dale, N. y Frenguelli, B.G. (2011). Minor contribution of ATP P2 receptors to electrically-evoked electrographic seizure activity in hippocampal slices: Evidence from purine biosensors and P2 receptor agonists and antagonists. *Neuropharmacology* **61**, 25-34.
- Lucassen, P.J., Naninck, E.F., van Goudoever, J.B., Fitzsimons, C., Joels, M. y Korosi, A. (2013). Perinatal programming of adult hippocampal structure and function; emerging roles of stress, nutrition and epigenetics. *Trends Neurosci* **36**, 621-31.
- Luo, Y., Hu, Q., Zhang, Q., Hong, S., Tang, X., Cheng, L. y Jiang, L. (2015). Alterations in hippocampal myelin and oligodendrocyte precursor cells during epileptogenesis. *Brain Res* **1627**, 154-64.

Lyman, M., Lloyd, D.G., Ji, X., Vizcaychipi, M.P. y Ma, D. (2014). Neuroinflammation: the role and consequences. *Neurosci Res* **79**, 1-12.

Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y. y Tsukihara, T. (2009). Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* **458**, 597-602.

Maglione, M., Tress, O., Haas, B., Karram, K., Trotter, J., Willecke, K. y Kettenmann, H. (2010). Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by connexin47 and connexin32. *Glia* **58**, 1104-17.

Magnotti, L.M., Goodenough, D.A. y Paul, D.L. (2011). Functional heterotypic interactions between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *Glia* **59**, 26-34.

Mahi, N., Kumar, A., Jaggi, A.S., Singh, N. y Dhawan, R. (2015). Possible role of pannexin 1/P2x7 purinoceptor in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice. *J Surg Res* **196**, 190-9.

Mairesse, J., Lesage, J., Breton, C., Breant, B., Hahn, T., Darnaudery, M., Dickson, S.L., Seckl, J., Blondeau, B., Vieau, D., Maccari, S. y Viltart, O. (2007). Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E1526-33.

Makarenkova, H.P. y Shestopalov, V.I. (2014). The role of pannexin hemichannels in inflammation and regeneration. *Front Physiol* **5**, 63.

Mallard, C., Davidson, J.O., Tan, S., Green, C.R., Bennet, L., Robertson, N.J. y Gunn, A.J. (2014). Astrocytes and microglia in acute cerebral injury underlying cerebral palsy associated with preterm birth. *Pediatr Res* **75**, 234-40.

Markham, J.A. y Koenig, J.I. (2011). Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. *Psychopharmacology (Berl)* **214**, 89-106.

Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Liu, J., Aronica, E., Iyer, A.M., Rossetti, C., Molteni, M., Casalgrandi, M., Manfredi, A.A., Bianchi, M.E. y Vezzani, A. (2010). Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med* **16**, 413-9.

Matsuo, K., Zhang, X., Ono, Y. y Nagatomi, R. (2009). Acute stress-induced colonic tissue HSP70 expression requires commensal bacterial components and intrinsic glucocorticoid. *Brain Behav Immun* **23**, 108-15.

Matute, C. (2008). P2X7 receptors in oligodendrocytes: a novel target for neuroprotection. *Mol Neurobiol* **38**, 123-8.

Mazzon, E. y Cuzzocrea, S. (2008). Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G1268-80.

Medic, N., Vita, F., Abbate, R., Soranzo, M.R., Pacor, S., Fabbretti, E., Borelli, V. y Zabucchi, G. (2008). Mast cell activation by myelin through scavenger receptor. *J Neuroimmunol* **200**, 27-40.

Meier, C., Dermietzel, R., Davidson, K.G., Yasumura, T. y Rash, J.E. (2004). Connexin32-containing gap junctions in Schwann cells at the internodal zone of partial myelin compaction and in Schmidt-Lanterman incisures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 3186-98.

Meng, X.F., Tan, L., Tan, M.S., Jiang, T., Tan, C.C., Li, M.M., Wang, H.F. y Yu, J.T. (2014). Inhibition of the NLRP3 inflammasome provides neuroprotection in rats following amygdala kindling-induced status epilepticus. *J Neuroinflammation* **11**, 212.

Miao, E.A., Rajan, J.V. y Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev* **243**, 206-14.

Minkiewicz, J., de Rivero Vaccari, J.P. y Keane, R.W. (2013). Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia* **61**, 1113-21.

Montero, T.D. y Orellana, J.A. (2015). Hemichannels: new pathways for gliotransmitter release. *Neuroscience* **286**, 45-59.

Moreno, M., Guo, F., Mills Ko, E., Bannerman, P., Soulika, A. y Pleasure, D. (2013). Origins and significance of astrogliosis in the multiple sclerosis model, MOG peptide EAE. *J Neurol Sci* **333**, 55-9.

Mouihate, A. y Mehdawi, H. (2015). Toll-like receptor 4-mediated immune stress in pregnant rats activates STAT3 in the fetal brain: role of interleukin-6. *Pediatr Res*.

Munhoz, C.D., Garcia-Bueno, B., Madrigal, J.L., Lepsch, L.B., Scavone, C. y Leza, J.C. (2008). Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. *Braz J Med Biol Res* **41**, 1037-46.

Munhoz, C.D., Lepsch, L.B., Kawamoto, E.M., Malta, M.B., Lima Lde, S., Avellar, M.C., Sapolsky, R.M. y Scavone, C. (2006). Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci* **26**, 3813-20.

Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A.M. y Horng, T. (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 11282-7.

Mylvaganam, S., Ramani, M., Krawczyk, M. y Carlen, P.L. (2014). Roles of gap junctions, connexins, and pannexins in epilepsy. *Front Physiol* **5**, 172.

Nair, A. y Bonneau, R.H. (2006). Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *J Neuroimmunol* **171**, 72-85.

Najjar, S., Pearlman, D., Miller, D.C. y Devinsky, O. (2011). Refractory epilepsy associated with microglial activation. *Neurologist* **17**, 249-54.

Negoro, H., Lutz, S.E., Liou, L.S., Kanematsu, A., Ogawa, O., Scemes, E. y Suadicani, S.O. (2013). Pannexin 1 involvement in bladder dysfunction in a multiple sclerosis model. *Sci Rep* **3**, 2152-2163.

Nemani, V.M. y Binder, D.K. (2005). Emerging role of gap junctions in epilepsy. *Histol Histopathol* **20**, 253-9.

Noorlander, C.W., Tijsseling, D., Hessel, E.V., de Vries, W.B., Derks, J.B., Visser, G.H. y de Graan, P.N. (2014). Antenatal glucocorticoid treatment affects hippocampal development in mice. *PLoS One* **9**, e85671.

Nualart-Marti, A., Solsona, C. y Fields, R.D. (2013). Gap junction communication in myelinating glia. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 69-78.

O'Meara, R.W., Ryan, S.D., Colognato, H. y Kothary, R. (2011). Derivation of enriched oligodendrocyte cultures and oligodendrocyte/neuron myelinating co-cultures from post-natal murine tissues. *J Vis Exp*.

Ong, S.X., Chng, K., Meaney, M.J. y Buschdorf, J.P. (2013). Decreased hippocampal mineralocorticoid:glucocorticoid receptor ratio is associated with low birth weight in female cynomolgus macaque neonates. *J Mol Endocrinol* **51**, 59-67.

Orellana, J.A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J.X., Bennett, M.V., Naus, C.C., Giaume, C. y Saez, J.C. (2011a). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem* **118**, 826-40.

Orellana, J.A., Martinez, A.D. y Retamal, M.A. (2013). Gap junction channels and hemichannels in the CNS: regulation by signaling molecules. *Neuropharmacology* **75**, 567-82.

Orellana, J.A., Moraga-Amaro, R., Diaz-Galarce, R., Rojas, S., Maturana, C.J., Stehberg, J. y Saez, J.C. (2015). Restraint stress increases hemichannel activity in hippocampal glial cells and neurons. *Front Cell Neurosci* **9**, 102.

Orellana, J.A., Saez, P.J., Shoji, K.F., Schalper, K.A., Palacios-Prado, N., Velarde, V., Giaume, C., Bennett, M.V. y Saez, J.C. (2009a). Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling* **11**, 369-99.

Orellana, J.A., Saez, P.J., Shoji, K.F., Schalper, K.A., Palacios-Prado, N., Velarde, V., Giaume, C., Bennett, M.V. y Saez, J.C. (2009b). Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* **11**, 369-99.

Orellana, J.A., Shoji, K.F., Abudara, V., Ezan, P., Amigou, E., Saez, P.J., Jiang, J.X., Naus, C.C., Saez, J.C. y Giaume, C. (2011b). Amyloid beta-induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels. *J Neurosci* **31**, 4962-77.

Orellana, J.A. y Stehberg, J. (2014). Hemichannels: new roles in astroglial function. *Front Physiol* **5**, 193.

Pan, Y., Chen, X.Y., Zhang, Q.Y. y Kong, L.D. (2014). Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1beta-related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. *Brain Behav Immun* **41**, 90-100.

Parenti, R., Cicirata, F., Zappala, A., Catania, A., La Delia, F., Cicirata, V., Tress, O. y Willecke, K. (2010). Dynamic expression of Cx47 in mouse brain development and in the cuprizone model of myelin plasticity. *Glia* **58**, 1594-609.

Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.S., Lee, H. y Lee, J.O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191-5.

Park, J.H., Jeong, S.Y., Choi, A.J. y Kim, S.J. (2015). Lipopolysaccharide directly stimulates Th17 differentiation in vitro modulating phosphorylation of RelB and NF-kappaB1. *Immunol Lett* **165**, 10-9.

Patel, J. y Balabanov, R. (2012). Molecular mechanisms of oligodendrocyte injury in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int J Mol Sci* **13**, 10647-59.

Pedrazzi, M., Patrone, M., Passalacqua, M., Ranzato, E., Colamassaro, D., Sparatore, B., Pontremoli, S. y Melloni, E. (2007). Selective Proinflammatory Activation of Astrocytes by High-Mobility Group Box 1 Protein Signaling. *The Journal of Immunology* **179**, 8525-8532.

Pelegrin, P. y Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* **25**, 5071-82.

Pelegrin, P. y Surprenant, A. (2009). The P2X(7) receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1beta release. *Purinergic Signal* **5**, 129-37.

Perez-Velazquez, J.L., Valiante, T.A. y Carlen, P.L. (1994). Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling in epileptogenesis. *J Neurosci* **14**, 4308-17.

Perry, V.H., Cunningham, C. y Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* **7**, 161-7.

Phillips, D.I., Barker, D.J., Fall, C.H., Seckl, J.R., Whorwood, C.B., Wood, P.J. y Walker, B.R. (1998). Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 757-60.

- Pincus-Knackstedt, M.K., Joachim, R.A., Blois, S.M., Douglas, A.J., Orsal, A.S., Klapp, B.F., Wahn, U., Hamelmann, E. y Arck, P.C. (2006). Prenatal stress enhances susceptibility of murine adult offspring toward airway inflammation. *J Immunol* **177**, 8484-92.
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S. y Sanacora, G. (2012). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* **13**, 22-37.
- Reddy, D.S. (2013). Role of hormones and neurosteroids in epileptogenesis. *Front Cell Neurosci* **7**, 115.
- Retamal, M.A., Froger, N., Palacios-Prado, N., Ezan, P., Saez, P.J., Saez, J.C. y Giaume, C. (2007). Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J Neurosci* **27**, 13781-92.
- Rhen, T. y Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* **353**, 1711-23.
- Riazi, K., Galic, M.A. y Pittman, Q.J. (2010). Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. *Epilepsy Res* **89**, 34-42.
- Riteau, N., Baron, L., Villeret, B., Guillou, N., Savigny, F., Ryffel, B., Rassendren, F., Le Bert, M., Gombault, A. y Couillin, I. (2012). ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis* **3**, e403.
- Rock, K.L., Latz, E., Ontiveros, F. y Kono, H. (2010). The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol* **28**, 321-42.
- Rogawski, M.A. (2013). AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy. *Acta Neurol Scand Suppl* **9**, 1-18.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K. y Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* **322**, 1551-5.
- Saez, P.J., Shoji, K.F., Retamal, M.A., Harcha, P.A., Ramirez, G., Jiang, J.X., von Bernhardi, R. y Saez, J.C. (2013). ATP is required and advances cytokine-induced gap junction formation in microglia in vitro. *Mediators Inflamm* **2013**, 216402.

Sakhon, O.S., Victor, K.A., Choy, A., Tsuchiya, T., Eulgem, T. y Pedra, J.H. (2013). NSD1 mitigates caspase-1 activation by listeriolysin O in macrophages. *PLoS One* **8**, e75911.

Samoilova, M., Wentlandt, K., Adamchik, Y., Velumian, A.A. y Carlen, P.L. (2008). Connexin 43 mimetic peptides inhibit spontaneous epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol* **210**, 762-75.

Santiago, M.F., Veliskova, J., Patel, N.K., Lutz, S.E., Caille, D., Charollais, A., Meda, P. y Scemes, E. (2011). Targeting pannexin1 improves seizure outcome. *PLoS One* **6**, e25178.

Savage, C.D., Lopez-Castejon, G., Denes, A. y Brough, D. (2012). NLRP3-Inflammasome Activating DAMPs Stimulate an Inflammatory Response in Glia in the Absence of Priming Which Contributes to Brain Inflammation after Injury. *Front Immunol* **3**, 288.

Schalper, K.A., Palacios-Prado, N., Retamal, M.A., Shoji, K.F., Martinez, A.D. y Saez, J.C. (2008). Connexin hemichannel composition determines the FGF-1-induced membrane permeability and free $[Ca^{2+}]_i$ responses. *Mol Biol Cell* **19**, 3501-13.

Scharfman, H.E. (2007). The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* **7**, 348-54.

Schroder, K. y Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* **140**, 821-32.

Seckl, J.R. (2004). Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* **151 Suppl 3**, U49-62.

Seckl, J.R. y Holmes, M.C. (2007). Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**, 479-88.

Segovia, J., Sabbah, A., Mgbemena, V., Tsai, S.Y., Chang, T.H., Berton, M.T., Morris, I.R., Allen, I.C., Ting, J.P. y Bose, S. (2012). TLR2/MyD88/NF-kappaB pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection. *PLoS One* **7**, e29695.

Shao, B.Z., Xu, Z.Q., Han, B.Z., Su, D.F. y Liu, C. (2015). NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol* **6**, 262.

Shastri, A., Bonifati, D.M. y Kishore, U. (2013). Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators Inflamm* **2013**, 342931.

Shijie, J., Takeuchi, H., Yawata, I., Harada, Y., Sonobe, Y., Doi, Y., Liang, J., Hua, L., Yasuoka, S., Zhou, Y., Noda, M., Kawanokuchi, J., Mizuno, T. y Suzumura, A. (2009). Blockade of glutamate release from microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Tohoku J Exp Med* **217**, 87-92.

Shimada, T., Takemiya, T., Sugiura, H. y Yamagata, K. (2014). Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. *Mediators Inflamm* **2014**, 901902.

Shirani, A., Okuda, D.T. y Stuve, O. (2016). Therapeutic Advances and Future Prospects in Progressive Forms of Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*.

Sierksma, A.S., Prickaerts, J., Chouliaras, L., Rostamian, S., Delbroek, L., Rutten, B.P., Steinbusch, H.W. y van den Hove, D.L. (2013). Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Neurobiol Aging* **34**, 319-37.

Silberstein, S., Vogl, A.M., Bonfiglio, J.J., Wurst, W., Holsboer, F., Arzt, E., Deussing, J.M. y Refojo, D. (2009). Immunology, signal transduction, and behavior in hypothalamic-pituitary-adrenal axis-related genetic mouse models. *Ann N Y Acad Sci* **1153**, 120-30.

Silverman, M.N. y Sternberg, E.M. (2012). Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* **1261**, 55-63.

Silverman, W.R., de Rivero Vaccari, J.P., Locovei, S., Qiu, F., Carlsson, S.K., Scemes, E., Keane, R.W. y Dahl, G. (2009). The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem* **284**, 18143-51.

Singhal, G., Jaehne, E.J., Corrigan, F., Toben, C. y Baune, B.T. (2014). Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Front Neurosci* **8**, 315.

Skaper, S.D., Giusti, P. y Facci, L. (2012). Microglia and mast cells: two tracks on the road to neuroinflammation. *FASEB J* **26**, 3103-17.

Slusarczyk, J., Trojan, E., Glombik, K., Budziszewska, B., Kubera, M., Lason, W., Popiolek-Barczyk, K., Mika, J., Wedzony, K. y Basta-Kaim, A. (2015). Prenatal stress is a vulnerability factor for altered morphology and biological activity of microglia cells. *Front Cell Neurosci* **9**, 82.

Smith, L.K., Jadavji, N.M., Colwell, K.L., Katrina Pehudoff, S. y Metz, G.A. (2008). Stress accelerates neural degeneration and exaggerates motor symptoms in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* **27**, 2133-46.

Sorrells, S.F., Caso, J.R., Munhoz, C.D. y Sapolsky, R.M. (2009). The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron* **64**, 33-9.

Sperlagh, B. y Illes, P. (2014). P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol Sci* **35**, 537-47.

Spray, D.C., Rozental, R. y Srinivas, M. (2002). Prospects for rational development of pharmacological gap junction channel blockers. *Curr Drug Targets* **3**, 455-64.

Srinivas, M. y Spray, D.C. (2003). Closure of gap junction channels by arylaminobenzoates. *Mol Pharmacol* **63**, 1389-97.

Staley, K. (2015). Molecular mechanisms of epilepsy. *Nat Neurosci* **18**, 367-72.

Stefanits, H., Czech, T., Patariaia, E., Baumgartner, C., Derhaschnig, N., Slana, A. y Kovacs, G.G. (2012). Prominent oligodendroglial response in surgical specimens of patients with temporal lobe epilepsy. *Clin Neuropathol* **31**, 409-17.

Stevens, S.L., Shaw, T.E., Dykhuizen, E., Lessov, N.S., Hill, J.K., Wurst, W. y Stenzel-Poore, M.P. (2003). Reduced cerebral injury in CRH-R1 deficient mice after focal ischemia: a potential link to microglia and astrocytes that express CRH-R1. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 1151-9.

Sutor, B., Schmolke, C., Teubner, B., Schirmer, C. y Willecke, K. (2000). Myelination defects and neuronal hyperexcitability in the neocortex of connexin 32-deficient mice. *Cereb Cortex* **10**, 684-97.

Sutterwala, F.S., Haasken, S. y Cassel, S.L. (2014). Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci* **1319**, 82-95.

Swinkels, W.A., Engelsman, M., Kasteleijn-Nolst Trenite, D.G., Baal, M.G., de Haan, G.J. y Oosting, J. (1998). Influence of an evacuation in February 1995 in The Netherlands on the seizure frequency in patients with epilepsy: a controlled study. *Epilepsia* **39**, 1203-7.

Sze, C.I., Lin, Y.C., Lin, Y.J., Hsieh, T.H., Kuo, Y.M. y Lin, C.H. (2013). The role of glucocorticoid receptors in dexamethasone-induced apoptosis of neuroprogenitor cells in the hippocampus of rat pups. *Mediators Inflamm* **2013**, 628094.

Takeuchi, H. y Suzumura, A. (2014). Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* **8**, 189.

Takeuchi, O. y Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-20.

Tan, C.C., Zhang, J.G., Tan, M.S., Chen, H., Meng, D.W., Jiang, T., Meng, X.F., Li, Y., Sun, Z., Li, M.M., Yu, J.T. y Tan, L. (2015). NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model. *J Neuroinflammation* **12**, 18.

Tauber, S.C., Schlumbohm, C., Schilg, L., Fuchs, E., Nau, R. y Gerber, J. (2006). Intrauterine exposure to dexamethasone impairs proliferation but not neuronal differentiation in the dentate gyrus of newborn common marmoset monkeys. *Brain Pathol* **16**, 209-17.

Theoharides, T.C., Donelan, J.M., Papadopoulou, N., Cao, J., Kempuraj, D. y Conti, P. (2004). Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 563-8.

Theoharides, T.C., Spanos, C., Pang, X., Alferes, L., Ligris, K., Letourneau, R., Rozniecki, J.J., Webster, E. y Chrousos, G.P. (1995). Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect. *Endocrinology* **136**, 5745-50.

Tillinger, A., Nostramo, R., Kvetnansky, R., Serova, L. y Sabban, E.L. (2013). Stress-induced changes in gene expression of urocortin 2 and other CRH peptides in rat adrenal medulla: involvement of glucocorticoids. *J Neurochem* **125**, 185-92.

Town, T., Nikolic, V. y Tan, J. (2005). The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation* **2**, 24.

- Traka, M., Podojil, J.R., McCarthy, D.P., Miller, S.D. y Popko, B. (2016). Oligodendrocyte death results in immune-mediated CNS demyelination. *Nat Neurosci* **19**, 65-74.
- Tse, K., Puttachary, S., Beamer, E., Sills, G.J. y Thippeswamy, T. (2014). Advantages of repeated low dose against single high dose of kainate in C57BL/6J mouse model of status epilepticus: behavioral and electroencephalographic studies. *PLoS One* **9**, e96622.
- Tsuji, M., Wilson, M.A., Lange, M.S. y Johnston, M.V. (2004). Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model. *Exp Neurol* **189**, 58-65.
- Turner, J.R. (2006). Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* **169**, 1901-9.
- Tynan, R.J., Naicker, S., Hinwood, M., Nalivaiko, E., Buller, K.M., Pow, D.V., Day, T.A. y Walker, F.R. (2010). Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun* **24**, 1058-68.
- van Campen, J.S., Jansen, F.E., de Graan, P.N., Braun, K.P. y Joels, M. (2014). Early life stress in epilepsy: a seizure precipitant and risk factor for epileptogenesis. *Epilepsy Behav* **38**, 160-71.
- van Campen, J.S., Jansen, F.E., Steinbusch, L.C., Joels, M. y Braun, K.P. (2012). Stress sensitivity of childhood epilepsy is related to experienced negative life events. *Epilepsia* **53**, 1554-62.
- Velisek, L. (2011). Prenatal corticosteroid exposure alters early developmental seizures and behavior. *Epilepsy Res* **95**, 9-19.
- Velisek, L., Jehle, K., Asche, S. y Veliskova, J. (2007). Model of infantile spasms induced by N-methyl-D-aspartic acid in prenatally impaired brain. *Ann Neurol* **61**, 109-19.
- Vezzani, A., French, J., Bartfai, T. y Baram, T.Z. (2011a). The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* **7**, 31-40.
- Vezzani, A., Friedman, A. y Dingledine, R.J. (2013). The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology* **69**, 16-24.

Vezzani, A., Fujinami, R.S., White, H.S., Preux, P.M., Blumcke, I., Sander, J.W. y Loscher, W. (2015). Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathol*.

Vezzani, A., Maroso, M., Balosso, S., Sanchez, M.A. y Bartfai, T. (2011b). IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. *Brain Behav Immun* **25**, 1281-9.

Voss, L.J., Jacobson, G., Sleight, J.W., Steyn-Ross, A. y Steyn-Ross, M. (2009). Excitatory effects of gap junction blockers on cerebral cortex seizure-like activity in rats and mice. *Epilepsia* **50**, 1971-8.

Walker, A.K., Kavelaars, A., Heijnen, C.J. y Dantzer, R. (2014). Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. *Pharmacol Rev* **66**, 80-101.

Wallraff, A., Kohling, R., Heinemann, U., Theis, M., Willecke, K. y Steinhauser, C. (2006). The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* **26**, 5438-47.

Wang, M.J., Lin, S.Z., Kuo, J.S., Huang, H.Y., Tzeng, S.F., Liao, C.H., Chen, D.C. y Chen, W.F. (2007). Urocortin modulates inflammatory response and neurotoxicity induced by microglial activation. *J Immunol* **179**, 6204-14.

Wang, X.D., Chen, Y., Wolf, M., Wagner, K.V., Liebl, C., Scharf, S.H., Harbich, D., Mayer, B., Wurst, W., Holsboer, F., Deussing, J.M., Baram, T.Z., Muller, M.B. y Schmidt, M.V. (2011). Forebrain CRHR1 deficiency attenuates chronic stress-induced cognitive deficits and dendritic remodeling. *Neurobiol Dis* **42**, 300-10.

Wang, X.D., Labermaier, C., Holsboer, F., Wurst, W., Deussing, J.M., Muller, M.B. y Schmidt, M.V. (2012). Early-life stress-induced anxiety-related behavior in adult mice partially requires forebrain corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Eur J Neurosci* **36**, 2360-7.

Wang, Y., Ge, P. y Zhu, Y. (2013). TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion. *Mediators Inflamm* **2013**, 124614.

Wasseff, S.K. y Scherer, S.S. (2011). Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiol Dis* **42**, 506-13.

Wasseff, S.K. y Scherer, S.S. (2014). Activated microglia do not form functional gap junctions in vivo. *J Neuroimmunol* **269**, 90-3.

Weber, M.D., Frank, M.G., Tracey, K.J., Watkins, L.R. y Maier, S.F. (2015). Stress induces the danger-associated molecular pattern HMGB-1 in the hippocampus of male Sprague Dawley rats: a priming stimulus of microglia and the NLRP3 inflammasome. *J Neurosci* **35**, 316-24.

Welser, J.V. y Milner, R. (2012). Use of astrocyte-microglial cocultures to examine the regulatory influence of astrocytes on microglial activation. *Methods Mol Biol* **814**, 367-80.

Wetherington, J., Serrano, G. y Dingledine, R. (2008). Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* **58**, 168-78.

Xu, J., Yang, B., Yan, C., Hu, H., Cai, S., Liu, J., Wu, M., Ouyang, F. y Shen, X. (2013). Effects of duration and timing of prenatal stress on hippocampal myelination and synaptophysin expression. *Brain Res* **1527**, 57-66.

Youm, Y.H., Nguyen, K.Y., Grant, R.W., Goldberg, E.L., Bodogai, M., Kim, D., D'Agostino, D., Planavsky, N., Lupfer, C., Kanneganti, T.D., Kang, S., Horvath, T.L., Fahmy, T.M., Crawford, P.A., Biragyn, A., Alnemri, E. y Dixit, V.D. (2015). The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med* **21**, 263-9.

Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L.R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G.M., Granucci, F. y Kagan, J.C. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* **147**, 868-80.

Zhang, Y., Liu, L., Liu, Y.Z., Shen, X.L., Wu, T.Y., Zhang, T., Wang, W., Wang, Y.X. y Jiang, C.L. (2015). NLRP3 Inflammasome Mediates Chronic Mild Stress-Induced Depression in Mice via Neuroinflammation. *Int J Neuropsychopharmacol* **18**.

Zhu, L.J., Liu, M.Y., Li, H., Liu, X., Chen, C., Han, Z., Wu, H.Y., Jing, X., Zhou, H.H., Suh, H., Zhu, D.Y. y Zhou, Q.G. (2014). The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity. *PLoS One* **9**, e97689.

Zoidl, G., Kremer, M., Zoidl, C., Bunse, S. y Dermietzel, R. (2008). Molecular diversity of connexin and pannexin genes in the retina of the zebrafish *Danio rerio*. *Cell communication & adhesion* **15**, 169-83.

Zou, J. y T. Crews, F. (2015). Glutamate/NMDA excitotoxicity and HMGB1/TLR4 neuroimmune toxicity converge as components of neurodegeneration. *AIMS Public Health* **2**, 77-100.

Zurolo, E., Iyer, A., Maroso, M., Carbonell, C., Anink, J.J., Ravizza, T., Fluiters, K., Spliet, W.G., van Rijen, P.C., Vezzani, A. y Aronica, E. (2011). Activation of Toll-like receptor, RAGE and HMGB1 signalling in malformations of cortical development. *Brain* **134**, 1015-32.