



**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MENCION NEUROCIENCIA**

**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A ALCOHOL PRENATAL EN LA ACTIVACIÓN  
GLIAL DEL HIPOCAMPO DE RATAS ADOLESCENTES.**

**JOSE IGNACIO CUITIÑO RIQUELME**

**Tesis para optar al grado de  
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Directores de Tesis:**

**Prof. Dr. Ramón Sotomayor Zárate**

**Prof. Dr. Paola Haeger Soto**

**2020**

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....                               | 3  |
| <b>RESUMEN</b> .....                                       | 4  |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                      | 5  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....                                  | 6  |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....                                     | 11 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....                                     | 11 |
| <b>Objetivo General:</b> .....                             | 11 |
| <b>Objetivos Específicos:</b> .....                        | 11 |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                          | 12 |
| <b>Animales y tratamiento</b> .....                        | 12 |
| <b>Inmunohistoquímica</b> .....                            | 12 |
| <b>Toma de imágenes con el microscopio confocal.</b> ..... | 13 |
| <b>Conteo de astrocitos</b> .....                          | 13 |
| <b>Análisis morfométricos</b> .....                        | 14 |
| <b>RESULTADOS</b> .....                                    | 15 |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....                                     | 21 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....                                  | 28 |

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer mi familia, por haberme dado siempre todo el apoyo desde el inicio de esta empresa.

También dedicar mi profundo agradecimiento al equipo humano del laboratorio de neurociencias del departamento de Ciencias Biomédicas Universidad Católica del Norte, quienes con su conocimiento y colaboración me ayudaron a realizar de mejor forma el proceso investigativo.

De igual manera mis agradecimientos al Dr. Erwin de la fuente por siempre brindarme el apoyo y los conocimientos técnicos necesarios, y al Dr. Ramon Sotomayor por su continua asistencia y recomendaciones para el apropiado desarrollo de este trabajo.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a la Dra. Paola Haeger, principal guía durante todo este proceso, quien con su dirección y enseñanza me ha permitido llevar a buen término esta oportunidad de desarrollo profesional y personal.

## **RESUMEN**

La exposición prenatal al alcohol afecta en diferentes grados el desarrollo fetal, especialmente la función cerebral, que puede llevar al desarrollo de trastornos cognitivos, que se enmarcan en el desorden de espectro alcohólico fetal (FASD). Como modelo animal de FASD se utiliza la exposición prenatal a alcohol (PAE). PAE produce efectos permanentes a nivel cortical en animales adultos (postnatal 3 meses) como disminuir el número de astrocitos y aumentar los niveles totales de GFAP. Sin embargo, se desconoce si los hallazgos antes mencionados se pueden repetir en otras áreas del cerebro como el hipocampo, donde hemos demostrado que PAE genera una alteración en la función glutamatérgica en animales adolescentes, que además está asociada a defectos en la adquisición de memoria espacial. Para abordar este problema experimental, cuantificamos el número de astrocitos y analizamos su morfología en el hipocampo de ratas PAE adolescentes. Utilizando inmunofluorescencia y microscopia confocal hemos podido observar que PAE no afecta el número de células astrocíticas en el hipocampo, en el giro dentado (GD) y en el cuerno de Amón 1 (CA 1), respecto ratas control. Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas en la longitud máxima de las ramificaciones en GD y CA1 de ratas PAE respecto a las ratas control. El número de ramificaciones de los astrocitos no cambió significativamente en GD de ratas PAE, pero si aumentaron en CA1 de los mismos animales respecto a las ratas control. Los resultados de esta tesis nos permiten sugerir que la exposición a alcohol durante el periodo prenatal gatilla un aumento de la arborización de los astrocitos en CA1 de ratas adolescentes. Futuros estudios se enfocarán en entender la causa y consecuencia de este cambio morfológico, además de evaluar si existe una correlación entre la morfología glial y la deficiencia cognitiva encontrada en animales PAE.

## **ABSTRACT**

Prenatal alcohol exposure affects fetal development to varying degrees, especially brain function, which can lead to the development of cognitive disorders, which are framed by fetal alcohol spectrum disorder (FASD). Prenatal alcohol exposure (PAE) is used as the animal model for FASD. PAE produces permanent effects at the cortical level in adult animals (postnatal 3 months) such as decreasing the number of astrocytes and increasing total levels of GFAP. However, it is not known if the finds earlier mentioned may be repeated in other areas of the brain such as the hippocampus, where we have demonstrated that PAE generates an alteration in the glutamatergic system in adolescent animals, which is also associated to defects in the acquisition of spatial memory. To address this experimental problem, we quantify the number of astrocytes and analyze their morphology in the hippocampus of adolescent rats. Using immunofluorescence and confocal microscopy we have been able to observe that PAE does not affect the number of astrocyte cells in the hippocampus, in the dentate gyrus (DG) and in the cornu ammonis 1 (CA 1), relative to control rats. Furthermore, there were also no significant differences in the maximum length of ramifications in GD y CA1 of PAE rats compared to control rats. The number of ramifications of astrocytes did not change significantly in GD of PAE rats, but they increase in CA1 compared to control rats. The results of this thesis allow us to suggest that exposure to alcohol during the prenatal period triggers an increase in arborization of astrocytes in CA1 of adolescent rats. Future studies will focus on understanding the cause and consequence of this morphologic change, in addition to evaluating whether there is a correlation between glial morphology and the cognitive deficiency found in PAE animals.

## INTRODUCCIÓN

La evidencia actual sugiere que la exposición a alcohol en períodos prenatales puede llevar a cambios en la estructura y función cerebral, que traen como consecuencia disfunciones físicas, conductuales, cognitivas y sociales que se denominan en su conjunto trastornos del espectro alcohólico fetal (FASD) (Caldwell et al, 2014). Algunos de los efectos reportados en cerebros humanos asociados a la exposición prenatal al alcohol incluyen cambios anatómicos a nivel cerebral, trastornos del aprendizaje y deterioro de la memoria (Claire et al, 2011). Los niños que han sido expuestos a alcohol durante el embarazo han presentado déficits en el aprendizaje, en la memoria a corto plazo y en la memoria a largo plazo, (Berman y Hannigan, 2000), así como una disminución del volumen del cerebro en el área hipocampal (Claire et al, 2011). Del mismo modo, los modelos preclínicos han establecido claramente las consecuencias perjudiciales de la exposición al alcohol prenatal (PAE) en la memoria espacial, estos estudios han demostrado que la descendencia expuesta al alcohol prenatal exhibe déficits en tareas espaciales, similares a los observados en animales con lesiones del hipocampo (Berman y Hannigan, 2000). Además los animales expuestos a alcohol prenatal generan alteraciones en la neuroquímica y de la plasticidad sináptica, por ejemplo animales PAE han mostrado signos de un LTP deteriorado dependiente de R-NMDA a nivel hipocampal (Caldwell et al, 2015; Plaza et al 2020).

En el hipocampo, el 64% de las sinapsis son contactadas por astrocitos que con su intrincada arborización y ramificaciones pueden envolver firmemente los terminales sinápticos para modular los procesos generando sinapsis tripartitas. Dada la importancia de la modulación de los astrocitos sobre la comunicación neuronal, estos hallazgos han servido

para prestarle una mayor atención al papel potencial de los astrocitos en la formación de la memoria (Ota et al, 2013).

En el cerebro, los astrocitos participan en la modulación y la respuesta a la actividad sináptica mediante la regulación de la concentración extracelular de neurotransmisores, y tienen un papel clave en la plasticidad neuronal (Guizzetti et al, 2008). Además, influyen positivamente en las funciones neuronales involucradas en la formación de la memoria (Bazargani y Attwell, 2016). Los astrocitos son excitables a través de las fluctuaciones de calcio y responden a los neurotransmisores liberados en las sinapsis, liberando sus propios neurotransmisores, que reciben el nombre de gliotransmisores como glutamato, ATP, D-serina, adenosina y lactato. En este contexto, los astrocitos son esenciales para la plasticidad sináptica (Ota et al, 2013; Hussaini y Jang ,2018) y se acoplan a la circulación sanguínea por comunicación estrecha con vasos sanguíneos, regulando la actividad cerebral local. Finalmente, los astrocitos regulan el metabolismo energético en apoyo a las funciones neuronales que son requeridas para la formación de la memoria (Bazargani y Attwell, 2016). Actualmente hay evidencia de que los astrocitos participan de los procesos de memoria ,según el estudio de Kol et al (2019 ), los astrocitos en CA1 estarían modulando la memoria espacial remota a través de las neuronas que se proyectan en la corteza cingulada , en estos experimentos los ratones que vieron estimulados sus astrocitos en CA1 por medio de los receptores hM4Di (DREADDs derivados del receptor muscarínico M4 ) asociados a proteína Gi mostraron un deterioro en la recuperación de la memoria en la prueba de acondicionamiento al miedo y en la prueba de reconocimiento de lugar (Kol et al, 2019). De la misma manera un experimento con ratones con ausencia de IP3R2 (receptor de inositol 1,4,5-trifosfato) en astrocitos, mostró que estos exhibieron déficits de memoria remota (2-4 semanas), mostrando un rendimiento más bajo que el control y

cometiendo más del doble de errores en las pruebas de laberinto (Pinto-Duarte et al, 2019). Los mecanismos por los cuales los astrocitos podrían estar alterando los procesos de memoria aún no están del todo descritos, sin embargo la liberación e interacción de gliotransmisores podrían estar involucrados a través de la modulación del LTP y el LTD en las neuronas (Ota et al 2013 ; Gao et al ,2016). Por ejemplo la activación del receptor hM4Di en los astrocitos imita la respuesta de estas células a los estímulos GABAérgicos estimulando liberación de gliotransmisores, entre ellos glutamato (Durkee et al 2019; Kol et al,2019) y la ausencia de IP<sub>3</sub> R2 en astrocitos de CA1 interrumpe significativamente la señalización de Ca<sup>2+</sup> en estos , reduciendo la transmisión sináptica y alternado la depresión a largo plazo dependiente de R-NMDAR .(Pinto-Duarte et al,2019), en ambos experimentos el aumento o la disminución de la liberación de gliotransmisores parece ser fundamental en las alteraciones vistas en la memoria.

Los astrocitos también desempeñan un importante papel SNC experimentando una reacción celular protectora llamada "astroglisis reactiva" ante infecciones, traumatismo agudo, isquemia, enfermedades neurodegenerativas (Ransohoff y Brown, 2012; Crews y Vetreno., 2014; Saito et al., 2016) y la presencia de agentes tóxicos como metales pesados y el alcohol (Qin y Crews, 2012; Harada et al,2016). Durante esta reacción los astrocitos responden con un espectro amplio de alteraciones como la regulación positiva de GFAP, cambios en su arborización y un aumento de los factores proinflamatorios, generando lo que se conoce como un fenotipo de astrocito activado (Sofroniew, 2014). Como ejemplo de la reactividad de los astrocitos hipocampales en respuesta a agentes proinflamatorios en el embarazo se ha descrito el efecto en ratas adultas expuestas a LPS(lipopolisacárido) durante su gestación .En estos animales se visualizó que LPS produjo un aumento de la arborización de los astrocitos a nivel del hipocampo , estos cambios en la arborización se

presentaron en conjunto con una mayor apertura de los hemicanales Cx43 , proteínas asociadas en los astrocitos a la liberación de gliotransmisores(Chávez et al , 2019) . Esto hace pensar que si bien la respuesta de los astrocitos es inicialmente una forma de protección ante el daño, cuando este se vuelve persistente, esta respuesta podría alterar la comunicación de astrocitos a neuronas y facilitar el reclutamiento de la respuesta inmune innata (Pekny y Pekna, 2014). Estudios del hipotálamo han mostrado que la exposición a alcohol neonatal (días posnatales 2 a 6), puede contribuir a una mayor activación glial basal a largo plazo. Se reveló que el alcohol neonatal, disminuyó varios reguladores de represión de la transcripción en microglía de hipotálamo, mientras que de forma concomitante se observó un aumento de la acetilación de la histona H3 en lisina 9 (H3K9ac), un indicador de acetilación en las regiones promotoras de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Chastain et al, 2019). En conjunto, estos estudios apoyan la idea que la exposición prenatal a alcohol podría modificar la estructura y función de la glía e inducir una reacción glial alterada perdurable durante el desarrollo de la descendencia.

Investigaciones previas han demostrado que la inflamación provocada por la exposición al alcohol se acompaña de una astrogliosis reactiva (Goodlett et al,1993; Franke ,1995;Valles et al , 1997; Dalcik et al,2009;Gómez et al, 2018), por ejemplo la exposición al alcohol agudo en ratas adultas produce cambios en la morfología de los astrocitos manifestándose en un aumento del tamaño celular además de una forma irregular y ameboide (Qin y Crews, 2012), de la misma manera la administración de alcohol intermitente en ratas adolescentes ha producido cambios en la arborización de los astrocitos que se presenta como un aumento del número de ramificaciones (Gómez et al , 2018),estudios realizados en astrocitos in vitro han mostrado que el alcohol aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas (Loeches at al, 2010; Crews et al, 2009 y en cultivos de

cortes cerebrales el alcohol aumenta múltiples genes proinflamatorios como NF- $\kappa$ B (Crews y Vetreno, 2014). En la corteza cerebral de ratas adultas que fueron expuestas a alcohol durante el desarrollo se ha observado una disminución del número de astrocitos (Miller y Potempa, 1990) y un aumento en los niveles GFAP en los astrocitos remanentes (Miller y Robertson, 1993; Devito y Stone, 2001), sin embargo, no se han documentado estos efectos en otras áreas del cerebro como el hipocampo.

Estudios preclínicos de nuestro laboratorio (Plaza et al, 2020) y de otros autores (Marquardt K, Brigman, 2016) muestran que animales PAE, sobre todo en etapa adolescente, tienen déficit en la función hipocampal, ya sea en la adquisición de memoria espacial como en la plasticidad sináptica. Como ha sido mencionado anteriormente, es sabido que el astrocito cumple un papel fundamental en procesos cognitivos normales, sin embargo, aún no se entiende totalmente su papel en los déficits cognitivos gatillados por exposición prenatal a alcohol. Detectar cambios en la morfología del astrocito podría ser un importante avance en la búsqueda de mecanismos por los cuales PAE estaría afectando la regulación en la transmisión sináptica, por lo tanto, la pregunta de investigación de esta tesis está focalizada en evaluar si los astrocitos del hipocampo de animales de 21 a 35 días de edad expuestos a alcohol prenatal tienen alterada su la morfología.

## **HIPÓTESIS**

“PAE aumenta la activación glial en el hipocampo de ratas adolescentes”

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

- Evaluar si PAE contribuye a la activación de astrocitos en el hipocampo de ratas de adolescentes

### **Objetivos Específicos:**

- Evaluar si PAE modifica el número de astrocitos en el hipocampo de cerebro de ratas adolescentes
- Evaluar si PAE modifica la morfología de los astrocitos en el hipocampo de cerebro de ratas adolescentes.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales y tratamiento**

La generación de animales expuestos a alcohol prenatal (PAE), se realizó acorde a Contreras (2017). Brevemente, 6 ratas Sprague-Dawley preñadas, se expusieron a agua o alcohol (10% v / v), ambas endulzadas con 64 mg / L de sucralosa (dosis diaria). El consumo de solución de alcohol se inició el día 5 ( $\pm$  2 días) de gestación, luego del nacimiento de la descendencia, se seleccionó 1 rata macho por camada y se continuo el tratamiento por 1 semana (P7) en las crías seleccionadas. El consumo de líquidos y alimentos fue monitoreado durante todo el proceso, las crías se pesaron desde P1 hasta P7. Para calcular el peso materno promedio durante el tratamiento, se consideró el peso en el estado inicial y final del tratamiento. Se evaluó el consumo de líquido diario de las madres durante el tratamiento y luego el de las crías hasta P7. Se extrajo sangre de la cola de la madre 12 h después de apagar la luz y se usó suero para cuantificar la concentración de alcohol mediante el kit de ensayo QuantiChrom™ (DIET-500) (BioAssay Systems). Después del protocolo de alcohol, a las ratas se les dejo comida y agua a voluntad. El grupo control fue expuesto a las mismas condiciones, pero sin adición de alcohol en el agua de consumo con sucralosa. Las crías se sacrificaron entre 21-35 días después del nacimiento. Esta edad fue elegida ya que contempla la etapa de adolescencia temprana del animal (Bingham et al ,2011; Sengupta ,2013).

Los protocolos para el manejo de ratas se llevaron a cabo de acuerdo con las recomendaciones del Comité Asesor en Bioética del Fondo Nacional para el Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT, Chile) y revisados por el Comité de Bioética, Cuidado Científico y Cuidado de Animales de la Universidad. Católica del Norte, Chile.

## **Reactivos y Anticuerpos**

El alcohol se obtuvo de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). El anticuerpo monoclonal antiglial de la proteína ácida fibrilar (GFAP) se obtuvo en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El anticuerpo cabra anti-ratón Alexa Fluor 555 y DAPI se obtuvieron de Thermo Fisher (Waltham, MA, EE. UU.).

## **Inmunohistoquímica**

Para desarrollar los objetivos planteados en esta tesis, se realizó una inmunohistoquímica para GFAP. Después del destete, se eligió azarosamente un macho de tres camadas diferentes. Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano y perfundidas intracardialmente con paraformaldehído (PFA) al 4%. El cerebro fue removido, post fijado 2 h a 4°C con PFA 3% y luego deshidratado con sacarosa al 30%. Posteriormente, los cerebros fueron recubiertos con OCT (Sakura Finetek) y seccionados cada 20 micrómetros en un criostato. Se seleccionaron rebanadas de hipocampo, las que se lavaron con cloruro de amonio 50 mM por 10 minutos, con agitación para eliminar los grupos aldehído libres. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno, con agitación a temperatura ambiente, para luego proceder a bloquear con PBS Tritón X-100 0,3% + BSA 3% por 60 minutos. Después se procedió a aplicar el anticuerpo primario  $\alpha$  m GFAP diluido 1/500 (Sigma-Aldrich) y DAPI 1/1000 (Thermo Fisher) en solución de bloqueo 2 (PBS 1X+ TX-100 0,15%+BSA 1,5%). Las muestras se incubaron por 72 horas con agitación a 4°C. Posteriormente se realizaron 6 Lavados con PBS-Tritón X-100 al 0,3% aplicando 1 mL por pocillo con un tiempo de agitación de 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, fueron montados los cortes en gelatina 0,1% en los portaobjetos y se dejaron secar. Una vez secas las muestras se agregó el anticuerpo secundario (40 uL por porta objetos). Las muestras se incubaron por 120 minutos a 4°C con agitación en solución de bloqueo 2. Se lavaron 1 vez con PBS-

Tritón 0,1% por 10 minutos con agitación, para luego ser lavadas 1 vez con PBS 1X directo. Se agregó Fluoromount (Thermo Fisher )20 uL por portaobjeto, se cubrió con cubreobjetos y se selló, para posteriormente ser guardadas protegidas de la luz directa. La inmunoreactividad para GFAP se observó en un microscopio confocal (Carl Zeiss LSM 800, Alemania). Como control negativo, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente sin utilizar el anticuerpo primario, no observándose células GFAP positivas.

### **Toma de imágenes con el microscopio confocal.**

Usando el microscopio confocal, se tomaron imágenes del hipocampo en las áreas del giro dentado y CA1. Se tomaron imágenes del área hipocampal con un aumento de 10x para una visión panorámica. También se tomaron las imágenes en CA1 a nivel del estrato radiado y a nivel de la vía perforante medial en GD, usando un aumento de 40x. Por cada imagen se tomaron 25 fotografías en proyección al eje Z y se observaron los astrocitos marcados con GFAP y núcleos marcados con DAPI.

### **Conteo de astrocitos**

Para el conteo de astrocitos, fueron seleccionadas las imágenes tomadas con aumento 40X y se abrieron usando el programa Image-j (NIH, USA). Luego, usando el complemento Analyze Particles, se establecieron umbrales de tamaño para el conteo celular, para los astrocitos se escogió un ajuste de entre 20 micras a infinito. El programa procedió contar como una célula todas las partículas que cayeron dentro del umbral.

### **Análisis morfológicos**

El procesamiento de imágenes se realizó utilizando el software Fiji-Image J (Schindelin et al., 2012). Se importó un mínimo de 3 astrocitos de cada animal elegido para el análisis y sus datos de imagen se procesaron con el complemento BioFormats. Se seleccionaron los

astrocitos de acuerdo a los siguientes criterios: (i) presencia de ramificaciones no truncadas; (ii) tinción GFAP consistente y fuerte a lo largo de todo el campo de arborización; y (iii) aislamiento relativo de los astrocitos vecinos para evitar la superposición. Posteriormente las imágenes se convirtieron en máscara binaria antes de su esqueletización con la herramienta de esqueletización. La última herramienta permitió obtener la longitud del segmento y cualquier posible bifurcación de la imagen esqueletizada analizada con el software Fiji-Image J. Luego, se midió la longitud máxima y el número de ramificaciones con el complemento Analyze Skeleton de Fiji-Image J.

## **RESULTADOS**

Para determinar si el alcohol prenatal produce alteraciones en el número de astrocitos y en su morfología a nivel hipocampal, se tomaron muestras de cerebro de ratas PAE, para luego contar el número de células astrogliales y visualizar si se presentaban cambios morfológicos en las áreas del giro dentado y CA1 utilizando GFAP. Se eligió el estrato radiante en CA1 y la zona cercana a la vía perforante medial en GD ya que estudios previos han mostrado que la actividad de los astrocitos en estas áreas interviene en la formación del LTP y LTD (Yang et al, 2003; Zhang et al, 2003; Henneberger et al;2010), y en la formación de la memoria remota (Tewari y Parpura,2013; Kol et al,2019; Pinto-Duarte et al,2019).Además la evaluación de estas áreas específicas sirve para mantener una continuidad con los experimentos previamente realizados en el laboratorio .

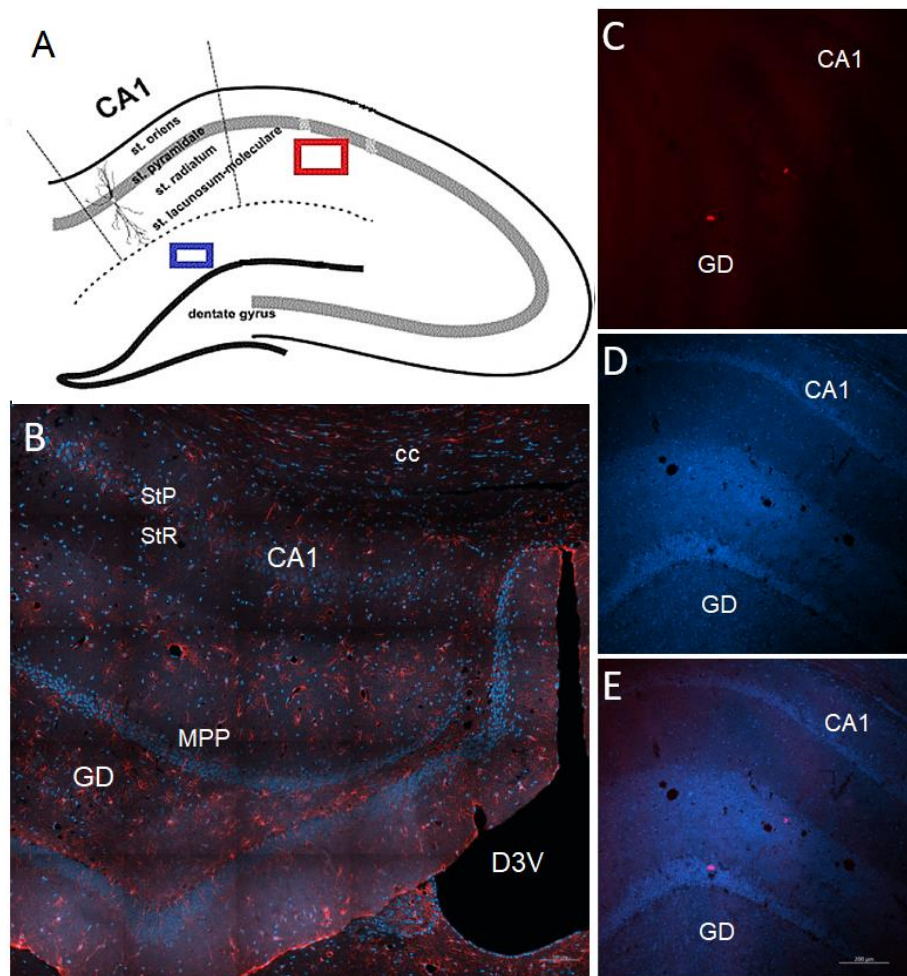


Figura 1: A. Imágenes representativas de las áreas seleccionadas del hipocampo, las imágenes de los astrocitos del cuerno de Amón (CA1) fueron tomadas en el estrato radiado (cuadro rojo), mientras las imágenes del Giro Dentado (GD) provienen de la región perforante medial (cuadro azul). B. Composición de imágenes tomadas a alta aumento (40x) donde se observa la inmunoreacción con el anticuerpo que reconoce a GFAP (rojo) y el marcador nuclear DAPI (azul). C-E. Control negativo. Las imágenes provienen de la inmunoreacción del anticuerpo secundario anti-ratón - 594 (C) con la respectiva marca nuclear (D) y la superposición de las imágenes (StP: estrato piramidal, StR: estrato radiado, cc: cuerpo calloso, MPP: vía perforante medial, D3V: tercer ventrículo).

Utilizando un anticuerpo específico, se cuantificó el número de células en las regiones encuadradas en la Figura 1 y se estableció un tamaño mínimo de 20  $\mu\text{m}$  como parámetro para identificar a los astrocitos. Con este parámetro, se realizó el análisis de los astrocitos cercanos a la vía perforante medial en el giro dentado y del estrato radiado de CA1 (Fig1). En la inmunofluorescencia (Fig. 2 A y B, Fig. 3 A y B), se puede distinguir una morfología típica de astroglia con un tamaño de alrededor de 60  $\mu\text{m}$  incluyendo sus ramificaciones y somas de aproximadamente 8  $\mu\text{m}$ . Estas características no se observaron en el control

negativo (Fig. 1, C-E). El gráfico muestra el promedio del número de células cuantificadas en fotografías obtenidas de tres animales provenientes de tres camadas distintas.

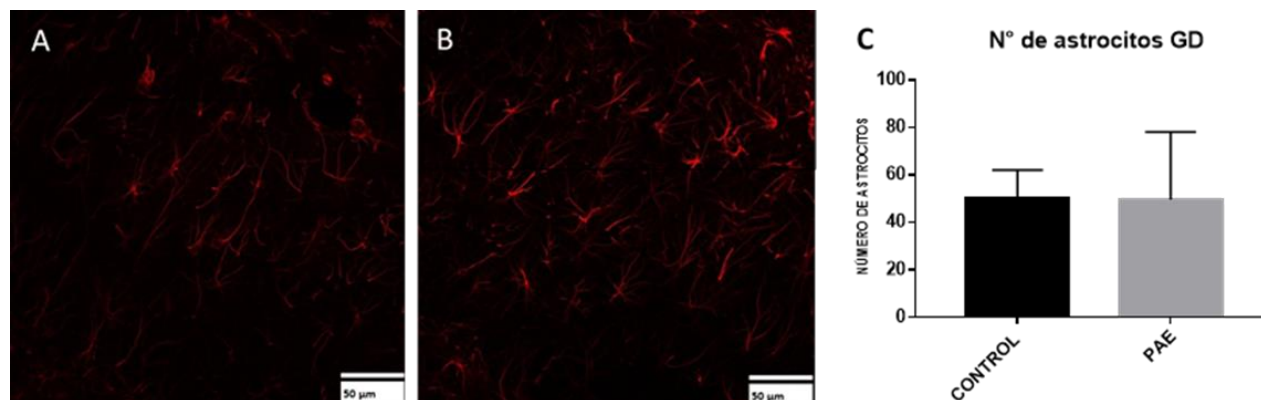


Figura 2: La exposición a alcohol prenatal no tiene efectos significativos en el número de astrocitos a nivel del GD en ratas P21. Imágenes representativas que muestran la tinción de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; rojo), en el GD de ratas control (A) y ratas después de la exposición prenatal al alcohol (B). Datos promedios del número de astrocitos en el GD (C) de ratas de control (barras negras) o ratas después de la exposición prenatal al alcohol (barras grises). \*  $p < 0.05$ , para el efecto de la exposición posterior al alcohol en comparación con la condición de control respectiva (t-student de muestras independientes) (área analizada :77929.827  $\mu\text{m}^2$ , datos obtenidos utilizando el complemento Analyze Particles del programa Fiji-Image-j).

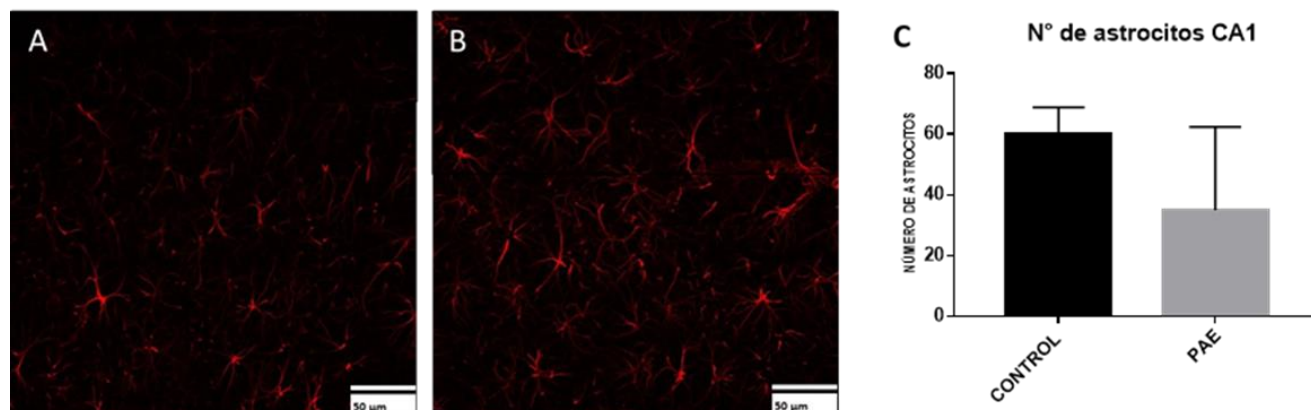


Figura 3: La exposición a alcohol prenatal no tiene efectos significativos en el número de astrocitos a nivel de CA1 en ratas P21. Imágenes representativas que muestran la tinción de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; rojo), en CA1 de ratas control (A) y ratas después de la exposición prenatal al alcohol (B). Datos promedios del número de astrocitos en CA1 (C) de ratas de control (barras negras) o ratas después de la exposición prenatal al alcohol (barras grises). \*  $p < 0.05$ , para el efecto de la exposición posterior al alcohol en comparación con la condición de control respectiva (t-student de muestras independientes) (área analizada :77929.827  $\mu\text{m}^2$ , datos obtenidos utilizando el complemento Analyze Particles del programa Fiji- Image-j).

Como se puede ver en la figura 2 y figura 3, la condición PAE en CA1 y GD no mostró diferencias significativas con los controles en el número de astrocitos como si fueron observados en estudios de otras áreas del cerebro por la administración de alcohol prenatal para algunos modelos síndrome de alcoholismo fetal (Miller y Potempa, 1990; Ademark y Bowers , 2016 ) (FAS) (Wilhelm y Guizzetti, 2016). De acuerdo con Gómez (2018), el grado de activación del astrocito se observa a través de cambios en la morfología celular, para revisar esto cuantificamos el largo de las ramificaciones el número de ramificaciones por astrocito. El análisis de astrocitos individuales, para las mismas áreas estudiadas, no reveló una diferencia en la longitud máximo de las ramificaciones, ni en GD (Figura 4 C) ni en CA1 (Figura 5 C). Tampoco se detectó una mayor extensión de las ramificaciones en los astrocitos PAE, característica esperable como signo de astrogliosis.

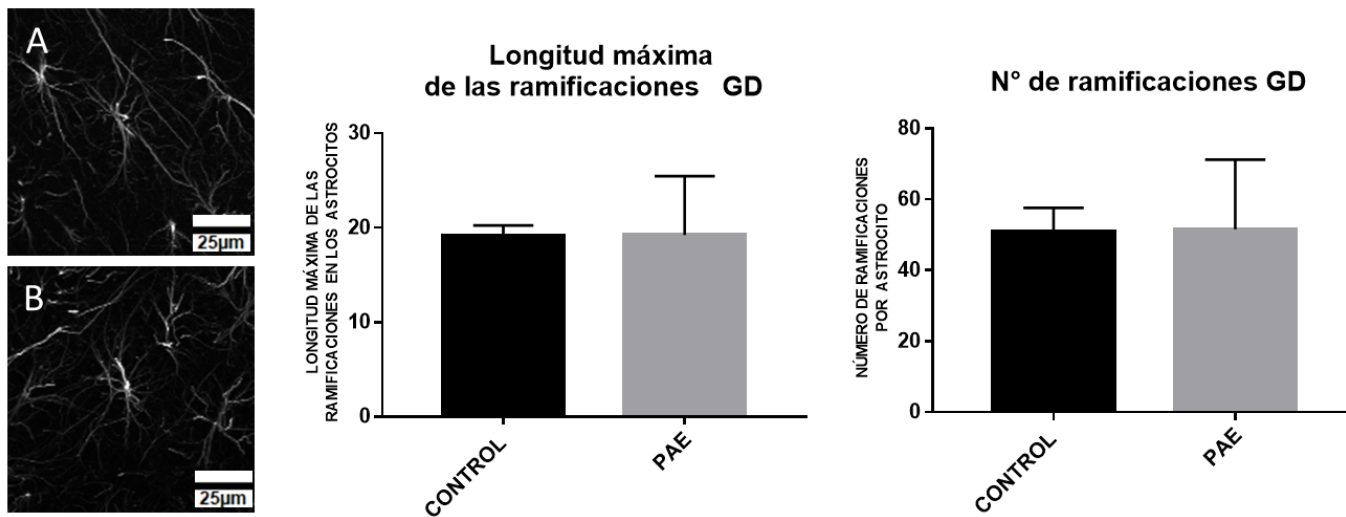


Figura 4: La exposición prenatal a alcohol no produce alteraciones significativas en la arborización de astrocitos en el GD de las ratas P21. (A, B) Astrocitos positivos representativos de GFAP (blanco) del GD de ratas control (A) y ratas PAE (B). Datos promedios de longitud máxima de las ramificaciones (C), y número de ramificaciones (D) por astrocitos en el GD de ratas de control (barras negras) o ratas después de la exposición prenatal al alcohol (barras grises). \*  $p < 0.05$ , para el efecto de la exposición posterior al alcohol en comparación con la condición de control respectiva (t-student de muestras independientes) (datos obtenidos utilizando el complemento Analyze Skeleton del programa Fiji-Image-j).

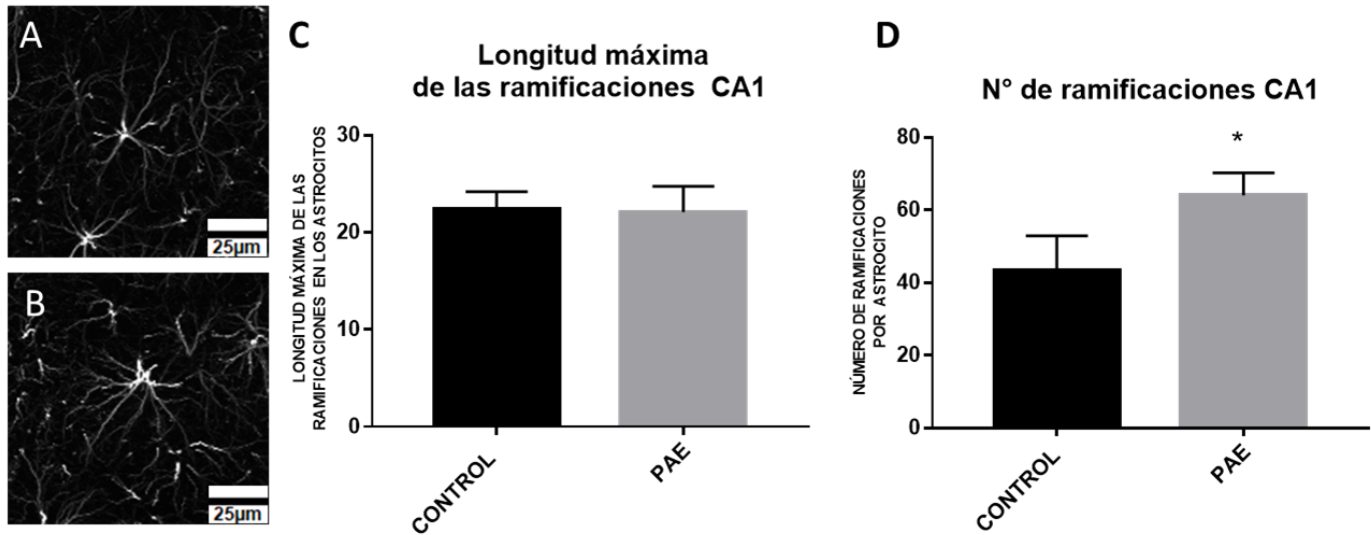


Figura 5: La exposición prenatal a alcohol aumenta la arborización de astrocitos CA1 en el estrato radiado de las ratas P21, modificando el número de ramificaciones, pero sin alterar la longitud de estas. (A, B) Astrocitos positivos representativos de GFAP (blanco) del estrato radiado de ratas control (A) y ratas PAE (B). Datos promedios de longitud máxima de las ramificaciones (C), y número de ramificaciones (D) por astrocitos en CA1 de ratas de control (barras negras) o ratas después de la exposición prenatal al alcohol (barras grises). \*  $p < 0.05$ , para el efecto de la exposición posterior al alcohol en comparación con la condición de control respectiva (t-student de muestras independientes) (datos obtenidos utilizando el complemento Analyze Skeleton del programa Fiji -Image-j).

Finalmente, la evaluación del número de ramificaciones para los astrocitos no mostró diferencia significativa para las muestras PAE obtenidas de la vía perforante medial del GD (Figura 4 D), sin embargo, presentaron diferencias significativas en el estrato radiado de CA1 (Figura 5 D). Los astrocitos PAE en CA1, mostraron un mayor número de ramificaciones en comparación con los controles, siendo esta una característica vista en astrocitos reactivos (Qin y Crews, 2012; Gomez et al, 2018).

Con el objetivo de evaluar si había diferencias entre las zonas de estudio a nivel del número de astrocitos y de sus características morfológicas se realizó adicionalmente un análisis comparativo entre GD y CA1 en condiciones control y PAE, este análisis mostró una tendencia a un mayor número de astrocitos en CA1, aunque esta no fue significativa, la longitud de las ramificaciones no mostró diferencias estadísticamente significativas, así como tampoco el número de ramificaciones (Fig.6).

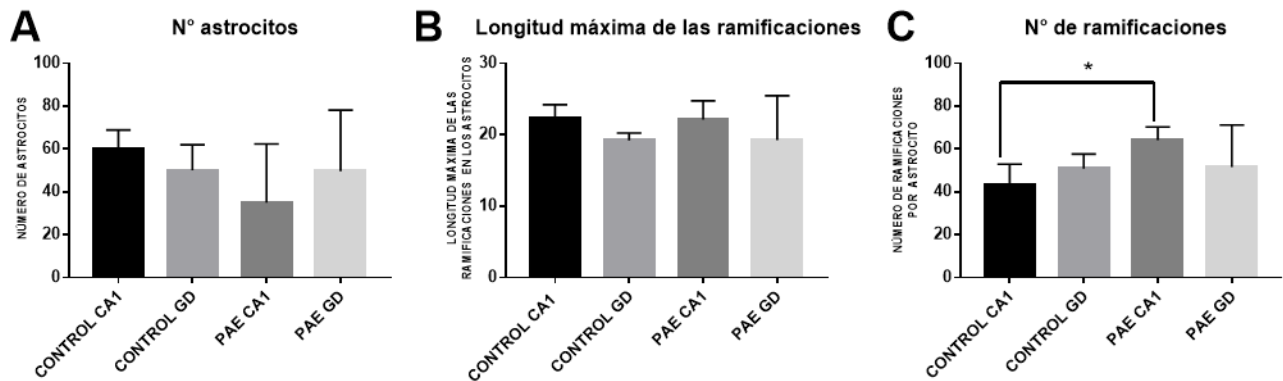


Figura 6: Comparación del número de astrocitos y morfología entre las áreas CA1 y GD en condición control y PAE. (A, B y C). Datos promedios del número de astrocitos en CA1 y GD (A) de la longitud máxima de las ramificaciones en CA1 y GD (B), y número de ramificaciones (C) por astrocitos ratas control en CA1 y GD (barras negras y gris claro) o ratas después de la exposición prenatal al alcohol en CA1 y GD (barras grises y blancas). \* p<0.05, para el efecto comparación entre áreas respectivas (t-student de muestras independientes).

## DISCUSIÓN

El hallazgo principal de esta tesis resultó ser que la exposición prenatal a alcohol puede aumentar ligeramente la arborización de los astrocitos en CA1, al aumentar el número de ramificaciones y que esta alteración puede mantenerse a largo plazo. Este cambio morfológico es sugerente de ser un indicador de una mayor actividad de las células astrogiales (Sofroniew, 2014; Chavez et al, 2019).

Se sabe que una breve exposición de los astrocitos al alcohol aumenta la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en la regulación de la transcripción, la proliferación y diferenciación celular, y de los genes del citoesqueleto y la matriz extracelular (Pignataro et al, 2013). Estos cambios ocurren en conjunto con la expresión del marcador astrocítico GFAP, después de la administración de alcohol y otras drogas de abuso, lo que demuestra que el astrocito es blanco para este tipo de sustancias (Pignataro et al, 2013). Actualmente hay evidencia suficiente que permite visualizar los mecanismos por los cuales el alcohol estaría alterando la morfología de los astrocitos, se sabe que el alcohol es capaz de inducir la producción de ROS en el astrocito por medio de la actividad de la catalasa o el citocromo P450 (Pignataro et al ,2013), lo cual estaría activando la señalización del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Linngapan ,2018). NF- $\kappa$ B activaría genes proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-6 (IL-6), que a su vez reactivarían el astrocito por medio la activación de STAT3, este último provocaría la reorganización de la actina por medio de la proteína GAP43, aumentando las ramificaciones en los astrocitos (Hung et al ,2016).

Resultados similares en la arborización de los astrocitos a los encontrados en este trabajo se han reportado en el estrato radiado del área CA1 de ratas adultas expuestas prenatalmente a LPS, donde el aumento de la arborización de los astrocitos se correlacionó con un

aumento en la actividad de los hemicanales Cx43 y los canales Panx1 en el hipocampo (Chávez et al, 2019). Esta no es la única evidencia de que el aumento de la arborización en los astrocitos está relacionado con la actividad de los hemicanales, el alcohol administrado de manera intermitente ha mostrado aumentar la arborización y la actividad de los hemicanales y canales Panx 1 en los astrocitos del hipocampo en ratas adolescentes (Gómez et al ,2018), la que fortalece la idea de una relación entre ambos fenómenos.

Estudios anteriores en nuestro laboratorio han mostrado una relación entre PAE y la alteración de adquisición de memoria espacial dependiente de hipocampo, que a su vez se ha correlacionado con un aumento de la transmisión sináptica mediada por R-NMDAR en el área CA1 del hipocampo (Plaza et al, 2020). Una pregunta interesante que se abre al comparar los resultados de Plaza et al con los de esta tesis es ¿Cómo el aumento en la arborización en los astrocitos de CA1 puede explicar la alteración de la actividad sináptica mediada por R-NMDAR observada en CA1 y la disminución de memoria?

Una posible explicación que puede relacionar los cambios en la arborización de los astrocitos con las alteraciones en la transmisión sináptica de R-NMDA está en el gliotransmisor D-Serina. Actualmente se sabe que D-serina facilita la activación del R-NMDA como coagonista de glutamato y que al proporcionar D-serina extracelular el astrocito participa de manera activa en la plasticidad dependiente de R-NMDAR en muchos miles de sinapsis excitadoras que ocurren cerca a través de la sinapsis tripartita (Yang et al, 2003; Henneberger et al,2010; Ota et al,2013; Hahn et al,2015). Se ha observado que cambios en los niveles de liberación de D-Serina por parte del astrocito inducidos por una lesión en el hipocampo contribuye a la alteración sináptica (Harada et al,2016) y que los hemicanales Cx43 contribuyen a la liberación de D-serina en los astrocitos, estos hemicanales aumentan su actividad luego del daño prenatal inducido por toxinas como el

LPS o el alcohol (Meunier et al, 2017;Pérez et al 2017; Chávez et al , 2019). Esto podría ser uno de los mecanismos mediante el cual los cambios en la arborización de los astrocitos podrían influir en el desempeño de R-NMDA, ya que como vimos anteriormente los aumentos en la arborización de los astrocitos están acompañados de una apertura de los hemicanales Cx43 en el hipocampo (Gómez et al ,2018; Chávez et al, 2019).

Un astrocito más ramificado liberaría más D-serina al medio extracelular (Ramani et al , 2016;Chávez et al,2019 ), los astrocitos presentan diversas proteínas de membrana en sus ramificaciones entre las que se encuentran las proteínas Cx43 que forman los hemicanales (Masaki,2013;Boulay et al,2017;Popuin et al,2017;Schiweck et al, 2018), por lo tanto un aumento en la arborización de los astrocitos podría significar un aumento en nuevas unidades de Cx43 formando más hemicanales en cada nueva ramificación ,esto se corresponde con los hallazgos en los cuales se ha observado un aumento en la expresión de Cx43 en los astrocitos reactivos (Ramani et al,2016;Boulay et al,2017;) y con el aumento de la producción y liberación de D-serina en los mismos lo cual se ha visto contribuye al daño sináptico y la disfunción (Pérez et al,2017), debido al efecto de D-serina en la activación de R-NMDA. No podemos descartar la participación en estos procesos de la D-serina liberada desde las neuronas, sin embargo hay evidencia de que el daño en el hipocampo disminuye los niveles de D- serina en las neuronas , mientras que los astrocitos mejoran la producción y liberación de D- serina (Pérez et al ,2017) .Es importante mencionar también que la cobertura de la arborización de los astrocitos se relaciona con estructuras neuronales como las espinas dendríticas, ejes dendríticos y botones axonales en el neuropilo hipocampal, un solo astrocito de roedor puede asociarse con hasta 120,000 sinapsis , mientras que un astrocito humano contacta hasta dos millones de sinapsis(Khakh and Sofroniew,2015; Popuin et al,2017;Gravilov et al,2018; Schiweck et al, 2018), esta

asociación estructural parece ser importante en la formación de la sinapsis excitadora durante el desarrollo y la madurez ,ya que se ha encontrado que en el hipocampo la densidad de las corrientes evocadas por R-NMDA eran aproximadamente dos veces mayor en las neuronas cultivadas en presencia de glía que en las neuronas cultivadas de forma aislada (Ota et al ,2013;Hahn et al, 2015; Boulay et al,2017), el cómo influyen directamente los cambios en la arborización de los astrocitos en estas asociaciones con la neurona es aún desconocido pero es posible especular su implicancia en las alteraciones sinápticas observadas, ya que al aumentar la arborización en los astrocitos , también lo haría el número de contactos sinápticos y por lo tanto la difusión de sustancias neuroactivas(Bernardinelli et al,2014).

Las alteraciones observadas en CA1, no se presentaron en el giro dentado. Tampoco se observaron cambios para los otros parámetros medidos, como el largo de las ramificaciones o el número de astrocitos, esto tanto en giro dentado como para CA1. Se debe aclarar que la evidencia científica muestra que el comportamiento de las células gliales es muy diverso dependiendo del área. Por ejemplo, en la corteza de ratas adultas expuestas a alcohol durante el desarrollo se ha podido ver una disminución del número de astrocitos (Miller y Potempa, 1990). Así también, otros estudios han mostrado una reducción en el número de células gliales en modelos animales del síndrome de alcoholismo fetal (FAS) (Wilhelm y Guizzetti, 2016). En otros casos, se ha observado un aumento en el número de astrocitos en la corteza cerebral de rata después de la exposición a alcohol (Ademark y Bowers, 2016). En cambio, estudios llevados a cabo en el VTA, no han mostrado ninguna variación en el número de astrocitos PAE, pero si en su morfología al disminuir el número de ramificaciones en los astrocitos (Aghaie et al ,2019).

Los cambios en la morfología de los astrocitos en CA1 apoyan su participación en el déficit de memoria espacial y plasticidad en animales PAE descrito en el artículo de Plaza et al 2020, ya que se ha observado que los astrocitos en CA1 estarían modulando la adquisición y memoria espacial remota (Kol et al, 2019). Por otro lado, alteraciones semejantes en CA1 vistos tras la exposición a LPS se asociaron con una mayor latencia de escape y una mayor distancia para alcanzar el objetivo en el laberinto de Morris (Hao et al ,2010). Si bien, nosotros no observamos cambios en la morfología ni número de células gliales en el GD también se ha descrito que el GD tiene un importante papel en la memoria espacial, experimentos con lesiones realizadas a nivel GD han resultado en un déficit en la realización de tareas que involucran este tipo de memoria (Gilbert et al,2001; Kessner 2007).

La diferencia observada entre las dos regiones del hipocampo puede deberse a que se ha descrito que el cambio en el número de astrocitos y en su morfología en cerebros afectados por alcohol, puede ser dependiente del tiempo, la región y el método de administración de alcohol (Bull et al., 2015). Por ejemplo, experimentos en administración del alcohol en ratas adolescentes, han mostrado que los efectos inflamatorios permanecen después de una semana de la última administración, pero disminuyen drásticamente al pasar 3 semanas, lo cual evidencia que la distancia temporal del evento tiene una implicancia en los efectos observados en las células astrogiales (Gomez et al, 2018).

Otra razón para esta respuesta diferencial podría estar en que los astrocitos reactivos comprenden un grupo heterogéneo constituido por subpoblaciones celulares que pueden diferir entre sí en términos de firma molecular, función y respuesta a varios estímulos fisiológicos y patológicos (Oberheim et al, 2012). Estas diferencias podrían ser explicadas por los distintos linajes celulares que dan origen a los astrocitos tanto a nivel espacial como

temporal (Schiweck et al, 2018; Matias et al, 2019). Por ejemplo, en el hipocampo, los astrocitos muestran una gran diversidad y heterogeneidad, en particular, los astrocitos cercanos al estrato piramidal están organizados en redes que permanecen paralelas a esta capa, mientras que los astrocitos en el estrato radiante tienen redes circulares (Houades et al, 2006). Asimismo, las características electrofisiológicas de los astrocitos del hipocampo también varían según su ubicación en diferentes subregiones del hipocampo (Ben Haim y Rowitch, 2017). Por ejemplo, los astrocitos de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo muestran diferentes niveles de acoplamiento célula-célula. Además de la heterogeneidad glial, también es importante considerar que el aumentar la distancia con respecto al origen de un fenómeno inflamatorio, los signos distintivos de este en la morfología inflamatoria de los astrocitos, como la hipertrofia y los niveles elevados de GFAP, tienden a disminuir y parecen ser análogos a las lesiones difusas y leves del SNC (Schiweck et al, 2018). Con el aumento de la distancia de las áreas de daño tisular, el grado de proliferación y superposición de los procesos de astrocitos disminuye. Primero, se visualizan a áreas donde las ramificaciones permanecen dentro de sus dominios individuales, pero los astrocitos siguen siendo hipertróficos y reactivos. Luego, se ve una transición gradual a áreas donde los astrocitos son indistinguibles en fenotipo de aquellos en tejido sano. Tales hallazgos proporcionan evidencia clara de que hay una heterogeneidad fenotípica derivada de la distancia de los astrocitos reactivos con respecto a al foco de inflamación (Anderson et al, 2013). En el caso del alcohol una difusión desigual durante su consumo podría explicar los efectos en diferentes regiones como CA1 y GD, ya que también es posible pensar que la distancia entre cada astrocito y la fuente de alcohol este determinada por los patrones vasculares específicos de la región estudiada. Si bien se sabe relativamente poco sobre las diferencias topográficas en el suministro vascular, la distribución y la densidad de los

capilares cerebrales en diferentes regiones del SNC (Cavaglia et al, 2001), hay algunos estudios que muestran que el lecho vascular no es homogéneo en las distintas áreas del hipocampo de rata (Grivas et al,2003).

Nuestra investigación respalda la hipótesis de que la exposición agente nocivos durante el periodo prenatal puede alterar la morfología de los astrocitos a largo plazo, observándose en PAE un aumento de la arborización de los astrocitos del hipocampo en CA1. Se necesitarán estudios futuros para esclarecer si los aumentos de la arborización en los astrocitos de animales PAE se relacionan directamente con las alteraciones vistas en la transmisión sináptica del hipocampo, así como para dilucidar los mecanismos moleculares que pueden mantener esta alteración originada en periodos prenatales durante etapas posteriores del desarrollo.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Adermark L and Bowers M. (2016) Disentangling the role of astrocytes in alcohol use disorder. *Alcohol Clin Exp Res. Sep; 40(9): 1802–1816.***
- Aghaie C, Hausknecht K, Wang R, Dezfuli P, Haj-Dahmane S, Kane C, Sigurdson W, Shen R. (2020) Prenatal Ethanol Exposure and Postnatal Environmental Intervention Alter Dopaminergic Neuron and Microglia Morphology in the Ventral Tegmental Area During Adulthood. *Alcohol Clin Exp Res. Feb;44(2):435-444***
- Anderson M, Ao Y, Sofroniew M. (2014) Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett. Apr 17; 565:23-9.***
- Bazargani N, Attwell D. (2016) Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat Neurosci. Feb;19(2):182-9***
- Ben-Haim and Rowitch. (2017) Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci. Jan;18(1):31-41***
- Berman R, Hannigan J. (2000) Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: Spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy. *Hippocampus. 2000; 10:94–110.***
- Bernardinelli Y, Muller D, and Nikonenko I. (2014) Astrocyte-Synapse Structural Plasticity. *Neural Plast. 2014; 2014: 232105.***
- Bingham B,McFadden K, Zhang X, Bhatnaga S,Beck S, and Valentino R.(2011)Early Adolescence as a Critical Window During Which Social Stress Distinctly Alters Behavior and Brain Norepinephrine Activity. *Neuropsychopharmacology. 2011 Mar; 36(4): 896–909.***
- Boulay A, Saubaméa B,Adam N,Chasseigneaux S, Mazaré N,Gilbert A,Bahin M,Bastianelli L, Blugeon C, Perrin S,Pouch J,Ducos B, Le Crom S, Genovesio A,Chrétien F, Declèves X, Laplanche J and Cohen-Salmon M.(2017) Translation in astrocyte distal processes sets molecular heterogeneity at the gliovascular interface. *Cell Discov. 2017; 3: 17005.***
- Brady M, Allan A, Caldwell K. (2012) Limited access mouse model of prenatal alcohol exposure that produces long-lasting deficits in hippocampal-dependent learning and memory.*Alcohol Clin Exp Res. 2012; 36 : 457–66.***
- Bull C, Freitas K, Zou S, Poland R, Syed W, Urban D, Minter S, Shelton K, Hauser K, Negus S, Knapp P, Bowers M. (2014) Rat nucleus accumbens core astrocytes modulate reward and the motivation to self-administer ethanol after abstinence. *Neuropsychopharmacology. 39:2835–2845.***

- Caldwell K, Goggin S, Tyler CR, Allan A. (2014) Prenatal alcohol exposure is associated with altered subcellular distribution of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in the adolescent mouse hippocampal formation. *Alcohol Clin Exp Res.*; 38:392–400
- Caldwell K, Goggin S, Labrecque M, and Allan A. (2015) The impact of prenatal alcohol exposure on hippocampal-dependent outcome measures is influenced by prenatal and early-life rearing conditions. *Alcohol Clin Exp Res.* Apr; 39(4): 631–639.
- Cavaglia M, Dombrowski SM Drazba J, Vasanji A, Bokesch P, Janigro D. (2001) Regional variation in brain capillary density and vascular response to ischemia. *Brain Res.* Aug 10;910(1-2):81-93.
- Chastain L, Franklin T, Gangisetty O, Cabrera M, Mukherjee S, Shrivastava P, Jabbar S & Sarkar D.(2017) Early life alcohol exposure primes hypothalamic microglia to later-life hypersensitivity to immune stress: possible epigenetic mechanism. *Neuropsychopharmacology* volume 44, pages1579–1588.
- Chávez C, Oyarzún J, Avendaño B, Mellado L, Inostroza C, Alvear T, Orellana J. (2019) The Opening of Connexin 43 Hemichannels Alters Hippocampal Astrocyte Function and Neuronal Survival in Prenatally LPS-Exposed Adult Offspring. *Front Cell Neurosci.* Oct 11; 13:460.
- Coles C, Goldstein F, Lynch M, Chen X, Kable J, Johnson K,1 and Hu X.(2011) Memory and Brain Volume in Adults Prenatally Exposed to Alcohol. *Brain Cogn.* Feb; 75(1): 67–77.
- Contreras M, De la Fuente E, Vargas S, Muñoz D, Goic C, and Haeger P.(2017) NADPH Oxidase Isoform 2 (NOX2) Is Involved in Drug Addiction Vulnerability in Progeny Developmentally Exposed to Ethanol. *Front Neurosci.*; 11: 338.
- Crews F y Vetreno R. (2014) Neuroimmune Basis of Alcoholic Brain Damage. *Int Rev Neurobiol.* 118: 315–357.
- Crews F., Bechara R., Brown L.A, Guidot D, Mandrekar P., Oak S., Qin L., Szabo G., Wheeler M., Zou J. (2006) Cytokines and alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30:720–730.
- Crews F, Nixon K. (2009) Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol*; 44:115–127.
- DeVito W, Stone S. (2001) Prenatal exposure to ethanol alters the neuroimmune response to a central nervous system wound in the adult rat. *Alcohol.* Aug;25(1):39-47.
- Dalcik H, Yardimoglu M, Filiz S, Gonca S, Dalcik C, Erden B. (2009) Chronic ethanol-induced glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity: an immunocytochemical observation in various regions of adult rat brain. *Int. J. Neurosci.* 119:1303–1318.

- Durkee C, Covelo A, Lines J, Kofuji P, Aguilar J, Araque I. (2019) Gi/o protein-coupled receptors inhibit neurons but activate astrocytes and stimulate gliotransmission. *Glia* 67, 1076–1093.
- Eggen B, Raj D, Hanisch U, Boddeke H. Microglial phenotype and adaptation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2013; 8:807–823
- Franke H. (1995) Influence of chronic alcohol treatment on the GFAP-immunoreactivity in astrocytes of the hippocampus in rats. *Acta Histochem.* 1995; 97:263–271.
- Gao V, Suzuki A, Magistretti P, Lengacher S, Pollonini G, Steinman M, Alberini C. (2016) Astrocytic  $\beta$ 2-adrenergic receptors mediate hippocampal long-term memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 26;113(30):8526-31.
- Gavrilov N, Golyagina I, Brazhe A, Scimemi A, Turlapov Y and Semyanov A. (2018) Astrocytic Coverage of Dendritic Spines, Dendritic Shafts, and Axonal Boutons in Hippocampal Neuropil. *Front Cell Neurosci.* 2; 12: 248.
- Gilbert, P., Kesner, R. y Lee I. (2001) Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11, 626–636
- Gómez G, Falcon R, Maturana C, Labra V, Salgado N, Rojas C, Oyarzun J, Cerpa, W, Quintanilla R and Orellana J. (2018) Heavy Alcohol Exposure Activates Astroglial Hemichannels and Pannexons in the Hippocampus of Adolescent Rats: Effects on Neuroinflammation and Astrocyte Arborization. *Front Cell Neurosci.*; 12: 472.
- Goodlett C, Leo J, O'Callaghan J, Mahoney J, West J. (1993) Transient cortical astrogliosis induced by alcohol exposure during the neonatal brain growth spurt in rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993 Mar 19;72(1):85-97.
- Grivas I, Michaloudi H, Batzios Ch, Chiotelli M, Papatheodoropoulos C, Kostopoulos G, Papadopoulos G. (2003) Vascular network of the rat hippocampus is not homogeneous along the septotemporal axis. *Brain Res.* May 9;971(2):245-9.
- Guerri C, Pascual M, Renau-Piqueras J. (2001) Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology.* Oct; 22(5):593-9.
- Guizzetti M, Moore N, Giordano G and Costa L. (2008) Modulation of Neuritegenesis by Astrocyte Muscarinic Receptors. *J Biol Chem.* Nov 14; 283(46): 31884–31897.
- Guerri C., Bazinet A., Riley E. (2009) Fetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol.* 44:108–114
- Hahn J, Wang X, and Margeta M. (2015) Astrocytes increase the activity of synaptic GluN2B NMDA receptors. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9: 117.

- Hao L, Hao X, Li S, Li X. (2010) Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats. *Neuroscience*. Mar 31;166(3):763-70.
- Harada K, Kamiya T, and Tsuboi T. (2016) Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Front Neurosci.*; 9: 499.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet S, and A. Rusakov D. (2010) Long term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*. Jan 14; 463(7278): 232–236.
- Houades V, Rouach N, Ezan P, Kirchhoff F, Koulakoff A, Giaume C. Shaping of gap junction-mediated astrocyte networks in the cortex and the hippocampus of the mouse. *Neuron Glia Biol*. 2006; 2:3–14.
- Hung C, Lin C, Chang H, Wang C, Lin S, Hsu P, Sun Y, Lin T, Shie F, Kao L, Chou C, Lee Y.(2016) Astrocytic GAP43 Induced by the TLR4/NF- $\kappa$ B/STAT3 Axis Attenuates Astroglial-Mediated Microglial Activation and Neurotoxicity. *J Neurosci*.Feb 10;36(6):2027-43
- Hussaini S and Jang M. (2018) New Roles for Old Glue: Astrocyte Function in Synaptic Plasticity and Neurological Disorders. *Int Neurology J*. Oct; 22(Suppl 3): S106–114.
- Kesner R. (2007) A behavioral analysis of dentate gyrus function. *Prog Brain Res.*; 163:567-76.
- Khakh B and Sofroniew M. (2015) Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci*. 2015 Jul; 18(7): 942–952.
- Kirkley K, Popichak K, Afzali M, Legare M and Tjalkens R. (2017) Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. *J Neuroinflammation*. 14: 99.
- Kol A, Adamsky A, Groysman M, Kreisel T, London M, Goshen I.(2019) Astrocytes Contribute to Remote Memory Formation by Modulating Hippocampal-Cortical Communication During Learning Preprint from bioRxiv, 25 Jun
- Lingappan K. (2018) NF- $\kappa$ B in Oxidative Stress. *Curr Opin Toxicol*. Feb; 7:81-86.
- Loeches S., Pascual L, Blanco A., Sanchez-Vera I., Guerri C. (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J. Neurosci*. 30:8285–8295.
- Masaki K. (2013) Connexin pathology in acute multiple sclerosis, Baló's disease and neuromyelitis óptica. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* December 4(s1)

- Marquardt K, Brigman J. (2016) The impact of prenatal alcohol exposure on social, cognitive, and affective behavioral domains: Insights from rodent models. Alcohol 51:1–15.**
- Matias I, Morgado J, Gomes FCA1. (2019) Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. Front Aging Neurosci. Mar 19; 11:59.**
- Meunier C, Wang N, Yi C, Dallerac G, Ezan P, Koulakoff A, Leybaert L, Giaume C. (2017) Contribution of Astroglial Cx43 Hemichannels to the Modulation of Glutamatergic Currents by D-Serine in the Mouse Prefrontal Cortex. J Neurosci. Sep 13;37(37):9064-9075**
- Miller M and Potempa G. (1990) Numbers of neurons and glia in mature rat somatosensory cortex: effects of prenatal exposure to ethanol. J Comp Neurol. Mar 1; 293(1):92-102.**
- Miller M, Robertson S. (1993) Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. J Comp Neurol. Nov 8;337(2):253-66.**
- Nahirnyj A, Livne-Bar I, Guo X, Sivak J. (2013) ROS detoxification and proinflammatory cytokines are linked by p38 MAPK signaling in a model of mature astrocyte activation. PLoS One. 2013 Dec 23;8(12): e83049**
- Norden D, Trojanowski P, Villanueva E, Navarro E and Godbout J. (2016) Sequential Activation of Microglia and Astrocyte Cytokine Expression Precedes Increased Iba-1 or GFAP Immunoreactivity following Systemic Immune Challenge. Glia. Feb; 64(2): 300–316**
- Oberheim N, Goldman S, Nedergaard M. (2012) Heterogeneity of astrocytic form and function. Methods Mol Biol. 2012; 814:23-45.**
- Ota Y, Zanetti A. and Hallock R. (2013) The Role of Astrocytes in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory Formation. Review Article Volume 2013 |Article ID 185463 | 11 pages**
- Perez E, Tapanes S, Loris Z, Balu D, Sick T, Coyle J and Liebl D. (2017) Enhanced astrocytic d-serine underlies synaptic damage after traumatic brain injury. J Clin Invest. Aug 1; 127(8): 3114–3125.**
- Pekny M, Pekna M. (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. Physiol Rev. 2014 Oct;94(4):1077-98.**
- Pignataro L, Varodayan F, Tannenholz L, Protiva P and Harrison N. (2013) Brief alcohol exposure alters transcription in astrocytes via the heat shock pathway. Brain Behav. Mar; 3(2): 114–133.**
- Pinto-Duarte A, Roberts A, Ouyang K, Sejnowski T. (2019) Impairments in remote memory caused by the lack of Type 2 IP3 receptors. Glia. Oct;67(10):1976-1989.**

- Plaza, W., Estay S, de la Fuente-Ortega E, Gutiérrez C, Andrés E. Chávez and Paola Haeger. (2020) NMDA receptor modulation by NOX2 drives synaptic plasticity and spatial memory impairments in rats exposed pre and postnatally to ethanol". *Antioxid Redox Signal.* Mar 20;32(9):602-617
- Papouin T, Dunphy J, Tolman M, Foley J and Haydon P. (2017) Astrocytic control of synaptic function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Mar 5; 372(1715): 20160154.
- Qin L, Crews F. (2012) NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration. *Neuroinflammation.* Jan 12; 9:5.
- Ramani M, Mylvaganam S, Krawczyk M, Wang L, Zoidl C, Brien J, Reynolds J, Kapur B, Poulter M, Zoidl G, Carlen P. (2016) Differential expression of astrocytic connexins in a mouse model of prenatal alcohol exposure. *Neurobiol Dis.* Jul; 91:83-93
- Ransohoff R, Brown M. (2012) Innate immunity in the central nervous system. *Clin Invest.* Apr; 122(4):1164-71.
- Saito M, Chakraborty G, Hui M, Masiello M. (2016) Ethanol-Induced Neurodegeneration and Glial Activation in the Developing Brain. *Brain Sci.* Sep; 6(3): 31.
- Sanchez J, Noor S, Davies S, Savage D, Milligan E. (2017) Prenatal alcohol exposure is a risk factor for adult neuropathic pain via aberrant neuroimmune function. *J Neuroinflammation.* Dec 19; 14(1)
- Schiweck J, Eickholt B, and Murk K. (2018) Important Shapeshifter: Mechanisms Allowing Astrocytes to Respond to the Changing Nervous System During Development, Injury and Disease. *Front Cell Neurosci.*; 12: 261
- Sengupta P. (2013) The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. *Int J Prev Med.* Jun; 4(6): 624–630.
- Sofroniew M. (2014) Astrogliosis: *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Nov 7; 7(2): a020420.
- Taléns-Visconti R, Sanchez-Vera I, Kostic J, Perez-Arago MA, Erceg S, Stojkovic M, Guerri C. (2011) Neural differentiation from human embryonic stem cells as a tool to study early brain development and the neuroteratogenic effects of ethanol. *Stem Cells Dev.* Feb; 20(2):327-39.
- Valles S, Pitarch J, Renau-Piqueras J, Guerri C. (1997) Ethanol exposure affects glial fibrillary acidic protein gene expression and transcription during rat brain development. *J. Neurochem.* 69:2484–2493
- Wilhelm J and Guizzetti M. (2016) Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview from the Glia Perspective. *Front. Integr. Neurosci.*, 11

**Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S. (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 9;100(25):15194-9.**

**Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan J, and Hong J. (2010) Astroglial pathology in CNS Pathologies: Is There A Role for Microglia? Mol Neurobiol. Jun; 41(0): 232–241.**