

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Plan 1992

Profundización en Biología Celular

Tesina de grado

Modulación de la comunicación a través de panexones de panexina 1 en pericitos cerebrales por Angiotensina-II y Endotelina-1 *in vitro* y *ex vivo*

Martín Figares

Orientadora: Dra. Verónica Abudara

Co-Orientadora: Dra. Eugenia Isasi

Laboratorio de ejecución: Laboratorio de Comunicación Celular,
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UdelaR.

Agradecimientos

Agradezco a todos aquellos que hicieron posible la realización de este trabajo que culmina mis estudios de grado, tanto a personas como equipos y recursos, y entidades financiadoras. Les estoy sumamente agradecido.

Sin embargo, quisiera agradecer particularmente a:

Ignacio Figares, por ayudarme a buscar nuevas formas de simplificar los conceptos para explicarlos mejor

Virginia Marset, por mostrarme la perspectiva de un estudiante de otra carrera, y por colaborar en buena parte de los experimentos de este trabajo

Sandra Mai, que por su orientación técnica y teórica podría decirse que fue la tercera orientadora de este trabajo

Y a Verónica Abudara y Eugenia Isasi, por su paciencia, dedicación para enseñarme, y por darme una mano siempre que lo necesité.

Tabla De Contenidos

Agradecimientos	1
Resumen	3
Introducción.....	4
Importancia de la regulación del flujo sanguíneo cerebral	4
Pericitos en la UNV	5
Regulación de vasoconstrictores sobre los pericitos	7
Regulación del agente vasoconstrictor ET-1 sobre los pericitos.	7
Regulación del agente vasoconstrictor AT-II sobre los pericitos.	7
Pericitos y su comunicación con el medio extracelular circundante.....	8
Antecedentes experimentales del laboratorio	10
Hipótesis Y Objetivos	12
Hipótesis	12
Objetivo General.....	12
Objetivos Específicos	13
Estrategia experimental.....	13
Métodos.....	14
Animales.....	14
Disección de hipocampo de ratón	15
Obtención de rodajas agudas de Hipocampo e identificación de pericitos (<i>Ex Vivo</i>).....	17
Cultivos primarios de pericitos de cerebro de rata	17
Estudio de la permeabilidad en pericitos pericapilares (ensayo de captación de Bromuro de Etidio) ..	21
Adquisición y análisis de imágenes.....	22
Estadística	24
Resultados.....	25
La AT-II y la ET-1 aumentan la permeabilidad pericitaria en rodajas agudas de hipocampo (<i>ex vivo</i>)... 25	
En ausencia total de Panexina1, la permeabilidad pericitaria <i>ex vivo</i> no varía ante el tratamiento con los agentes vasoactivos AT-II y ET-1.....	27
La AT-II aumenta la permeabilidad pericitaria en cultivos de pericitos de cerebro de rata (<i>in vitro</i>)	29
Discusión	31
Perspectivas	35
Bibliografía	36

Resumen

Una regulación dinámica y precisa del flujo sanguíneo cerebral es fundamental para el adecuado funcionamiento del encéfalo. Los pericitos son posibles efectores de dicha regulación. Éstos son células contráctiles ubicadas en la periferia de los microvasos. Experimentos recientes de nuestro laboratorio prueban que los pericitos se comunican de forma dinámica con el medio externo mediante canales de panexina1 (panexones). Estos poseen un poro central que permite la liberación de ATP. Este trabajo propone que los pericitos cerebrales varían su permeabilidad al medio, a través de panexones, al recibir señales de los agentes vasoactivos angiotensina-II (AT-II) y endotelina-1 (ET-1), quienes modifican su tono contráctil. Para evaluar la permeabilidad de membrana utilizamos el agente intercalante Bromuro de Etidio (BrEtd) que permea por los panexones. Realizamos ensayos de captación de BrEtd en rodajas agudas de hipocampo de ratones salvajes (Wild-Type; WT), Knock-Out Panx1^{-/-} (KO-Panx1) y cultivos de pericitos aislados de encéfalo de rata WT. Encontramos un aumento del 57% en la fluorescencia pericitaria de BrEtd en rodajas WT incubadas con AT-II [10nM], y ET-1 [10nM]. En los pericitos de rodajas KO-Panx1 no obtuvimos diferencias significativas en la fluorescencia del BrEtd. En cultivos primarios de pericitos cerebrales, la fluorescencia de BrEtd aumentó en 46% para Angiotensina-II. En suma, nuestros resultados evidencian la capacidad de los pericitos de transducir señales de agentes vasoconstrictores en un aumento de la permeabilidad al medio extracelular siendo este efecto mediado por la actividad de la panexina1. La apertura de panexones pericitarios podría permitir la liberación de ATP endógeno, seguida por la estimulación de receptores purinérgicos que luego incrementarían el calcio intrapericitario, favoreciendo la contracción pericitaria. Un incremento exacerbado de dicho mecanismo inducido por ET1 y ATII contribuiría a generar alteraciones cerebrovasculares que acompañan algunos desórdenes agudos y crónicos del sistema nervioso central (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica) en los que dichos agentes jugarían un rol clave.

Introducción

Importancia de la regulación del flujo sanguíneo cerebral

“Una cuidadosa consideración de los mecanismos básicos del encéfalo es esencial para un entendimiento cabal de la fisiología cerebral. Irregularidades en el metabolismo cerebral son observadas en diversas condiciones patológicas, como enfermedades neurodegenerativas, infartos, epilepsia y migrañas” y pueden agravar el curso evolutivo de la patología subyacente (Tomado de Squire *et al.*, 2008).

El encéfalo representa aproximadamente el 2% de la masa corporal, sin embargo, consume cerca del 25% de la glucosa y el 20% del O₂ de todo el cuerpo, cuando funciona correctamente (Squire *et al.*, 2008), con un flujo sanguíneo cerebral (FSC) promedio de $500 \frac{ml}{Kg*min}$ (Kety & Schmidt, 1948).

Desde hace tiempo se investiga sobre cómo la actividad neural ajusta el FSC para adecuar el aporte de gases y nutrientes a las demandas metabólicas del encéfalo (Roy & Sherrington, 1890). La relación entre la actividad neural local y las variaciones del FSC se conoce como *acoplamiento neurovascular*; al aumento del FSC local que se observa ante el aumento de la actividad cerebral se lo conoce como *hiperemia funcional*. El acoplamiento neurovascular está regulado por la unidad neurovascular (UNV) que, a nivel de la microvasculatura del sistema nervioso central (SNC), está formada por neuronas, glía, células vasculares endoteliales (CEs), pericitos y músculo liso vascular (MLV) (Armulik *et al.*, 2010; Sá-Pereira, Brites & Brito, 2012; Atwell *et al.*, 2015) (Fig. 1 y 2). La UNV también afecta el intercambio a través de la barrera hematoencefálica (BHE), dado que es la estructura que controla el paso de solutos y nutrientes de la sangre al cerebro y viceversa (Squire *et al.*, 2008).

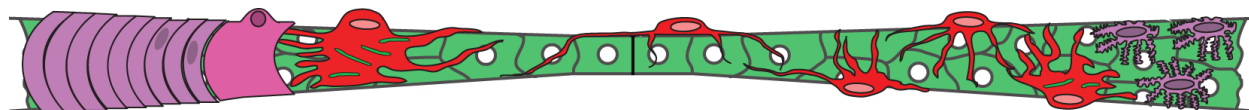


Figura 1 - Esquema de la red vascular donde se representan de izquierda a derecha: las arteriolas, delimitadas por la cobertura con MLV (Violeta) en forma de bandas que envuelven al vaso, a continuación, los capilares donde se observa una monocapa de células endoteliales (Verde) recubierta de manera no uniforme por pericitos de morfologías diversas (Rojo), y finalmente sobre la derecha, se ilustran vénulas con MLV con una morfología estrellada (Violeta) Tomado de Hartman *et al.* (2015).

Los pericitos son células perivasculares, espaciadas sobre el capilar, envueltas en la lámina basal, adyacentes a las CE de los capilares y vénulas postcapilares con las que mantienen una íntima relación (Rouget, 1874; Attwell *et al.*, 2015; Fig. 2). Estas células expresan proteínas contráctiles como la alfa-actina de músculo liso (α -SMA) o la tropomiosina (Sá-Pereira, Brites & Brito, 2012; Attwell *et al.*, 2015), lo que les permitiría regular su tono contráctil, el diámetro del capilar adyacente y así el FSC a dicho nivel según las demandas metabólicas neuronales (Yemisci, *et al.*, 2009; Hall, *et al.*, 2014). A pesar de que se conocen una gran variedad de marcadores para pericitos, la mayoría sino todos ellos son comunes a varios tipos celulares cercanos en el tejido, por lo que suele ser necesario colocalizar varios marcadores o recurrir a otras técnicas más allá de la inmunohistoquímica para reconocerlos (Krueger & Bechmann, 2010; Lacar *et al.*, 2012; Damisah *et al.*, 2017, Grutzendler & Nedergaard, 2019). Ejemplos de marcadores pericitarios son el antígeno Neural/Glial-2 (NG2), vimentina, el receptor del factor de crecimiento asociado a las plaquetas tipo β (PDGFR- β), nestina, desmina, factor transformante- β (TGF- β), CD44, CD73, CD90, CD105, entre otros (Fisher, 2009; Krueger & Bechmann, 2010, Sa-Pereira *et al.*, 2012). Trabajos recientes muestran que otra forma de marcar de manera específica a este tipo celular es a través de la captación específica de algunos colorantes fluorescentes como el TO-PRO-3 y el NeuroTrace 500/525 en modelos *ex vivo* e *in vivo* (Lacar *et al.*, 2012; Damisah *et al.*, 2017, Grutzendler & Nedergaard, 2019). Su morfología de cuerpo fusiforme, con largos procesos que envuelven a los capilares es característica de los pericitos, generando una imagen típica denominada “*nudo en un tronco*” (“Bump on a log” en inglés; Rouget, 1873; Krueger & Bechmann, 2010; Attwell *et al.*, 2015; Hartmann *et al.*, 2015).

Se ha demostrado un rol predominante de los astrocitos en la regulación del acoplamiento neurovascular, como intermediarios entre las neuronas y las células vasculares (Gordon *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2016). Estudios recientes evidencian que los pericitos pueden modificar las propiedades de la BHE y el FSC mediando así el intercambio de O_2 , CO_2 y glucosa. Se acepta clásicamente que la disminución de la resistencia arteriolar pre-capilar por relajación del músculo liso vascular gatillada por señales astrocitarias subyace el incremento del FSC durante la actividad neuronal (Mulligan & MacVicar, 2004; Metea & Neuman, 2006; Takano *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios recientes *ex vivo* e *in vitro*, demuestran que la relajación activa de los pericitos durante la actividad cerebral se correlaciona con un aumento del diámetro capilar, incrementando el FSC en las áreas activas, e incluso que el capilar es el primer elemento vascular en responder a la actividad neuronal (Peppiatt *et al.*, 2006; Attwell *et al.*, 2010;

Fernández-Klett *et al.*, 2010; Hamilton *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2014, Grutzendler & Nedergaard, 2019). En este sentido, se ha reportado recientemente que la contribución de la vasodilatación capilar al incremento del FSC durante la actividad cerebral se refleja significativamente en los estudios de imagenología funcional (Hall *et al.*, 2014), sin embargo, no hay consensos sobre la validez de estas mediciones (Grutzendler & Nedergaard, 2019). En suma, a pesar de que hay evidencia que soporta la contribución de músculo liso vascular/arteriolas y pericitos/capilares en la regulación del acoplamiento neurovascular, sigue siendo un tema de debate cuál es la contribución de cada parte (Peppiatt *et al.*, 2006; Yemisci *et al.*, 2009; Orellana *et al.*, 2011b; El Ali *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2015; Attwell *et al.*, 2015; Sweeney *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2016; Isasi *et al.*, 2019; Grutzendler & Nedergaard, 2019).

Los pericitos también cumplen funciones en la angiogénesis, inducción de la polarización de los pies astrocitarios en el SNC, inflamación, mantenimiento e integridad de la BHE, expresión génica de patrones BHE-específicos en CEs y se postula que son células multipotenciales capaces de diferenciarse en diversos tipos celulares (Crisan *et al.*, 2008; Armulik *et al.*, 2010).

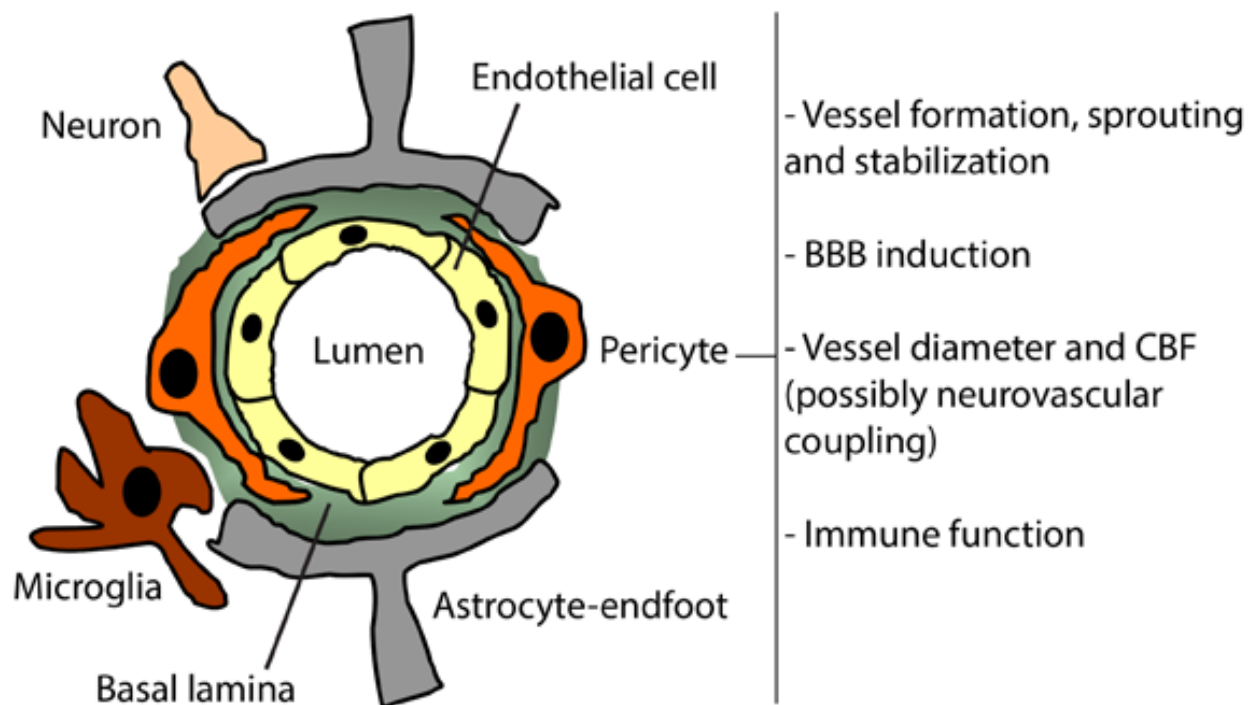


Figura 2 - El esquema representa la interacción de los distintos actores de la UNV. En la imagen se muestran células endoteliales (amarillo), pericitos (anaranjado) incrustados en lámina basal (verde), pies astrocitarios (gris) y otros elementos como proyecciones de neuronas (anaranjado claro) y microglía (rojo). En el cuadro de la derecha se enumeran funciones asociadas al pericito en la UNV, entre las cuales se incluyen: la formación y desarrollo vascular, inducción de la barrera hematoencefálica, acoplamiento neurovascular y finalmente función inmune. Tomado de El Ali *et al.* (2014).

Los pericitos poseen gran relevancia clínica ya que pueden modificar las propiedades de la BHE y alterar el FSC; e incluso, se los ha involucrado en algunos mecanismos patogénicos que explican las alteraciones de la microvasculatura cerebral en situaciones patológicas (Yemisci *et al.*, 2009; Orellana *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2016; Isasi *et al.*, 2019; Nortley *et al.*, 2018)

Regulación de vasoconstrictores sobre los pericitos

Los pericitos son células contráctiles, éstas responden ante la presencia de varios agentes vasoconstrictores como el ATP, entre otros (Kawamura *et al.*, 2003; Oishi *et al.*, 2007; Lohman *et al.*, 2012; Mai *et al.*, 2016). Publicaciones recientes han evidenciado la expresión de receptores para mediadores vasoactivos en pericitos, tales como angiotensina-II (AT-II) y endotelina-1 (ET-1), quienes tienen efectos constrictores sobre los mismos (Matsugi *et al.*, 1997; Asashima *et al.*, 2003, Yemisci *et al.*, 2009; Hamilton *et al.*, 2010; Nortley *et al.*, 2018).

Regulación del agente vasoconstrictor ET-1 sobre los pericitos.

La ET-1 es un potente péptido vasoconstrictor de 21 aminoácidos, de acción autócrina/parácrina generado por las CE (Valdez, 2013) que es reconocido por 2 tipos de receptores acoplados a proteínas G en mamíferos: ET_A y ET_B. En el MLV tras la estimulación de sus receptores ET_A, ET-1 acrecienta la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) mediante el aumento de la actividad de canales Ca^{2+} -específicos, canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, canales iónicos no específicos y liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares del retículo endoplásmico. Esta última acción es mediada por la vía de la fosfolipasa C- β (PLC- β). Se generan inositol 1, 4, 5, trifosfato (IP₃) y el diacil-glicerol (DAG): dos moléculas señalizadoras que inducen un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$; activando la kinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), provocando la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y por ende su interacción con la actina (Kawamura *et al.*, 2002; Tirapelli *et al.*, 2005; Wynne *et al.*, 2009; Valdez, 2013).

Regulación del agente vasoconstrictor AT-II sobre los pericitos.

La AT-II es un péptido bioactivo del sistema Renina-Angiotensina (RAS) que participa en la regulación de la presión arterial sistémica (Higuchi *et al.*, 2007; Wynne *et al.*, 2009). Además de tener un rol fundamental en la homeostasis de sodio y agua, participa en la constricción de MLV a través de receptores acoplados a proteínas G (Ohtsu *et al.*, 2006). Existen dos tipos de receptores conocidos de AT-II: AT₁ y AT₂; el primero

se encuentra en tejidos como riñón, corazón, glándula adrenal, cerebro, pulmón y tejido adiposo (Touyz & Berry, 2002) y su señalización se debe a la activación de proteínas G como $G_{q/11}$, G_i , G_{12} y G_{13} , que generan la activación de PLC (Touyz & Berry, 2002, Ohtsu *et al.*, 2006, Higuchi *et al.*, 2007). Las PLC a su vez desencadenan la activación de la MLCK, generando de esta manera una contracción rápida (similar al caso de ET-1; Wynne *et al.*, 2009). Existe evidencia de que hay receptores de AT-II (y respuesta a los mismos) en líneas celulares de pericitos del SNC en modelos murinos (Matsugi *et al.*, 1997; Asashima *et al.*, 2003) y que, en retina bovina, los pericitos presentan una respuesta contráctil mediada por estos receptores (Matsugi *et al.*, 1997).

Pericitos y su comunicación con el medio extracelular circundante

Dado que los pericitos se encuentran localizados en un lugar estratégico de la UNV, en la interfaz neurovascular, es de esperar que mantengan un diálogo fluido tanto con células endoteliales como con los pies astrocitarios y neuronas. Una forma, entre otras, de lograr este cometido será mediante señalización parácrina. En los últimos años, los canales formados por conexinas (Cxs) y panexinas (Panxs) emergen como vías para la comunicación parácrina neuro-glío-vascular (Goodenough & Paul, 2003; Sáez *et al.*, 2003; Sáez *et al.*, 2003b; Evans *et al.*, 2006; Giaume *et al.*, 2013).

Las Panxs son glicoproteínas que establecen canales (panexones) con un gran poro central al formar hexámeros (isoformas Panx1 y Panx3) o heptámeros y octámeros (isoforma Panx2; Fig. 3 y 4; Panchin *et al.*, 2000; Sosinsky *et al.*, 2011; Lohman & Isakson, 2014). Estructuralmente, las Panxs presentan cuatro hélices transmembrana unidas por una región intracelular y dos extracelulares, y los dominios N y C terminal se encuentran en el interior celular. Las regiones extracelulares se unen entre sí por puentes de sulfuro, característica similar a las inexas en invertebrados (Fig. 3; Bruzzone *et al.*, 2003; Sáez *et al.*, 2003; Orellana *et al.*, 2011; Lohman & Isakson, 2014). En el SNC se han detectado dos isoformas, Panx1, (de mayor expresión) y Panx2. La Panx3 se expresa en piel, cartílago y hueso (Bruzzone *et al.*, 2003; Lohman *et al.*, 2012; Penuela *et al.*, 2013; Lohman & Isakson, 2014). La presencia de Panx1 se ha detectado en varios tipos de células, incluyendo ovocitos de *Xenopus* (Bruzzone *et al.*, 2003), células HEK293 (Pelegrin & Suprenant, 2006), neuronas piramidales (Thompson *et al.*, 2008) y astrocitos (Huang *et al.*, 2007; Iglesias *et al.*, 2009; Garré *et al.*, 2010). Los pericitos cerebrales también expresan Panx1 (Mai *et al.*, 2016, Fig. 5).

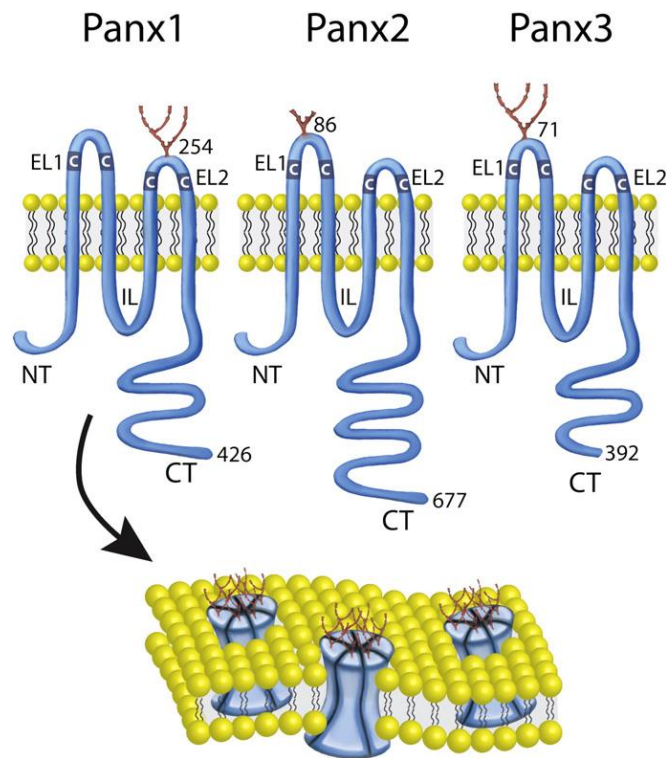


Figura 3 - Esquema de la estructura de las panexinas al hexamerizarse en la membrana. Se indican las diferencias entre las tres isoformas, Panx1, 2 y 3. Tomado de Penuela et al. (2013)

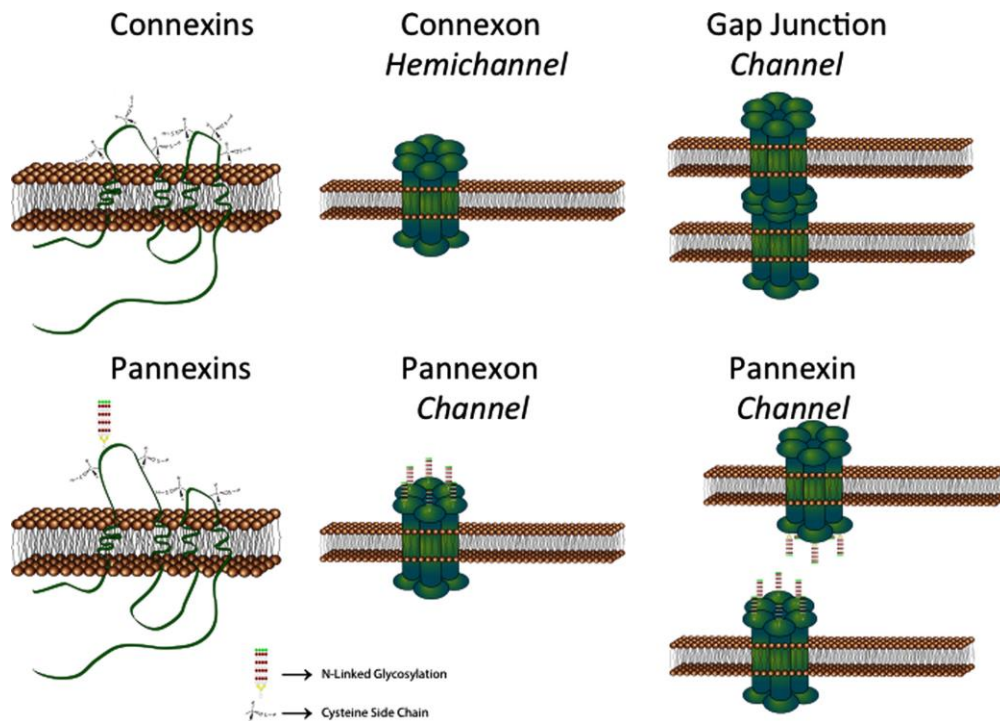


Figura 4 - Esquema mostrando los tipos de canales que suelen formar conexinas y panexinas. Si bien las conexinas si logran formar canales intercelulares o de uniones Gap, las panexinas se encuentran en mayor medida como canales únicos de membrana no ensamblados. Tomado de Giaume et al. (2013)

Cuando se abren, estos canales favorecen la señalización purinérgica al liberar, entre otras biomoléculas, ATP y adenosina (Garré *et al.*, 2010, Suadicani *et al.*, 2012; Good *et al.*, 2015, Chiu *et al.*, 2018; Whyte-Fagundes & Zoydl, 2018). Las CE y el MLV liberan ATP a través de panexones funcionales (Lohman *et al.*, 2012; Lohman and Isakson; 2014; Godecke *et al.*, 2011) para controlar el tono vascular de las arteriolas, el flujo sanguíneo y las respuestas inflamatorias (Billaud *et al.*, 2011; Lohman & Isakson, 2014; Good *et al.*, 2015; Begandt *et al.*, 2017). En pericitos pericapilares del hipocampo, el ATP liberado a través de panexones activaría receptores purinérgicos de membrana como P2X₇ y/o P2Y₆, que parecen necesarios para sostener la actividad basal de Panx1 (Mai *et al.*, 2016), ya que la apertura de panexones podría estar mediada por aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ (Locovei *et al.*, 2006). En este escenario, la Panx1 regularía el tono pericitario y así el intercambio a través de la microvasculatura.

Antecedentes experimentales del laboratorio

En nuestro laboratorio es de uso habitual la identificación de los pericitos en base a su captación diferencial de TO-PRO-3 (Lacar *et al.*, 2012), un agente intercalante que se asocia al ADN de doble cadena con gran afinidad (Fig. 5). Para determinar la actividad de los canales formados por Panx1 empleamos la técnica de captación de colorante en rodajas de hipocampo y en cultivos celulares primarios de pericitos de cerebro (Fig. 5 y 8). Resultados preliminares de nuestro grupo muestran que los inhibidores específicos de Panx1 (PBD y ₁₀PX1) y el inhibidor genérico de Cxs/Panx1, la CBX, inhiben la captación de BrEtd mientras que los inhibidores de Cxs (La³⁺ y Gap₂₆ o Gap₁₉) no poseen efecto. La inhibición de la captación de BrEtd, un agente intercalante de 0.394 KDa que permea por canales de gran poro, por los inhibidores de la Panx1 se previenen en rodajas derivadas de ratones KO para Panx1 (Panx1^{-/-}) (Fig. 5). Estos resultados indican que panexones formados de Panx1 median un intercambio molecular entre el pericito cerebral y el fluido circundante. Además, tanto en rodajas agudas como en cultivos, ocurre un aumento de la permeabilidad de la membrana pericitaria mediada por Panexina1 en presencia del vasoconstrictor ATP y efectos opuestos frente al vasodilatador, adenosina (Mai *et al.*, 2016). A su vez, se vio que en rodajas la inhibición farmacológica de los receptores P2X₇ y P2Y₆ reduce la captación de BrEtd (Mai *et al.*, 2016).

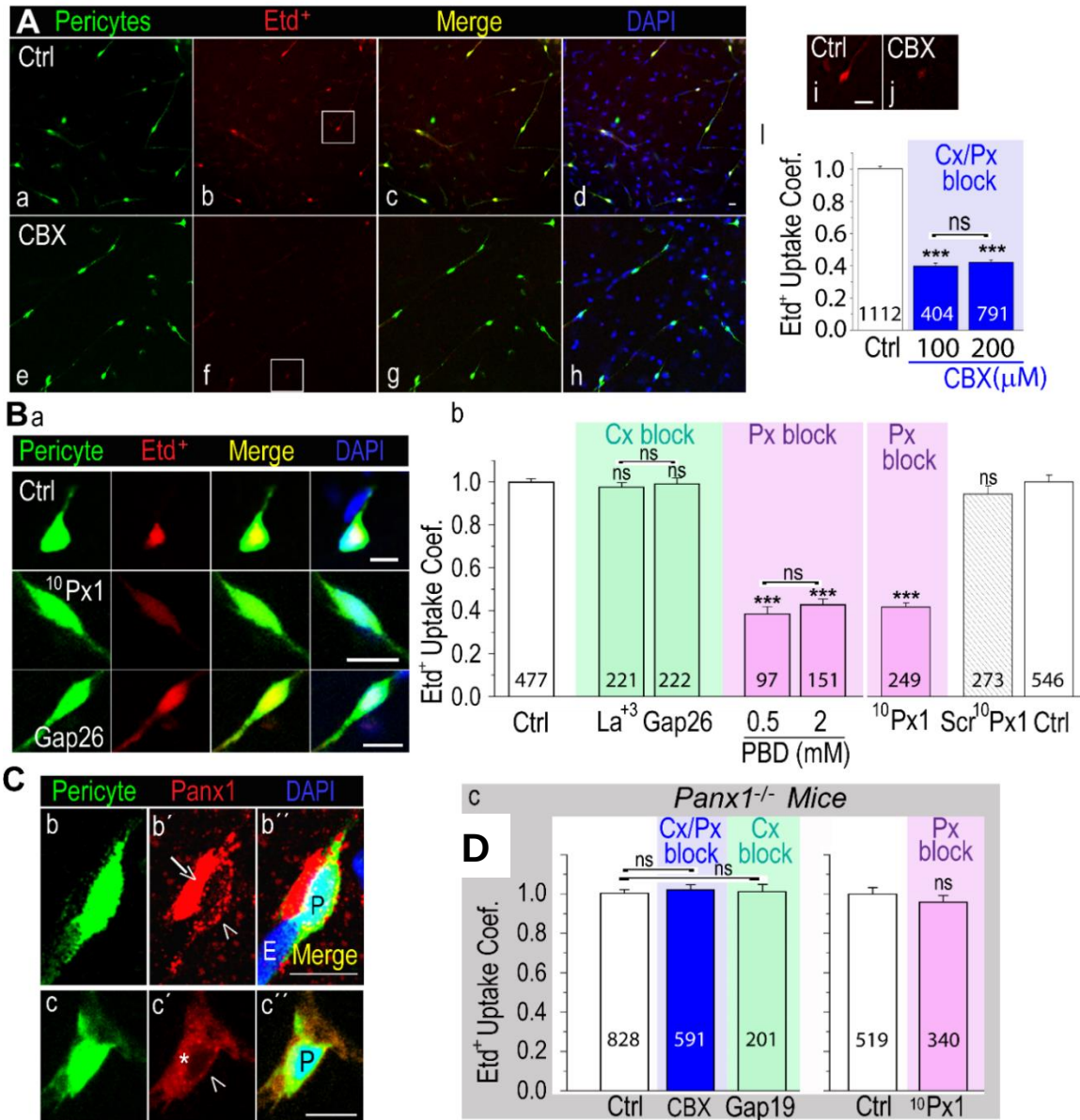


Figura 5 - Los pericitos captan BrEtD a través de canales de Panx1 en rodajas agudas de hipocampo. (A) Micrografías fluorescentes muestran la diferencia de captación de BrEtD (Canal Rojo) en pericitos (marcados con TO-PRO-3, Canal Verde) entre una situación control (Ctrl; a, b, c, d) y una con Carbenexolona (CBX), un bloqueante general de panexones y conexones (e, f, g, h). Se magnifica un pericito de cada condición presentada en los cuadros i y j. En l se muestra el coeficiente de captación de BrEtD para pericitos en la situación Ctrl y bajo dos concentraciones de CBX (100 y 200 μ M). Las diferencias con respecto al control son significativas con un p-valor <0.001 (***) pero no significativas entre los grupos tratados con CBX (p-valor >0.05; ns). **(B)** La captación de BrEtD es sensible a bloqueantes de panexones, pero no a bloqueantes de conexones y uniones gap. **a:** las imágenes ilustran las diferencias de captación entre la condición Ctrl, y el péptido mimético de Panx1, 10Px1 (bloqueante específico de Panx1) y el péptido mimético de Cx43, Gap26 (bloqueante específico de Cx43). Se observa menor captación en el pericito de la rodaja tratada con 10Px1, pero no en la rodaja con Gap26. **b:** gráficos que muestran los coeficientes de captación de BrEtD con respecto al control (barras blancas), para distintos tratamientos. En barras rosadas se representan los bloqueantes de panexones Probenecid (PBD) 0.5mM y 2mM y 10Px1, en verde se presentan los bloqueantes de conexones y uniones Gap, La³⁺ y Gap26. El péptido Scr10Px1 es un control del bloqueante 10Px1, una secuencia "revuelta" (o "scrambled" en inglés) del mismo largo y composición que 10Px1, pero con sus aminoácidos en distinto orden. **(C)** Los pericitos pericapilares del hipocampo expresan Panx1. Se muestran dos pericitos (b, b' y b'', y c, c' y c''), ambos con expresión de Panx1, con distinta distribución citoplasmática y de membrana. **(D)** Los gráficos muestran coeficientes de captación con respecto al control en ratones KO-Panx1^{-/-} tratados con bloqueantes de Panx1 y Cx43. Tanto los bloqueantes específicos de conexinas, como los de panexinas, como los que bloquean ambos no generan diferencias significativas en las medias de captación. Imagen generosamente prestada por Mai et al. (2016)

Hipótesis Y Objetivos

Hipótesis

Los pericitos transducirán la señal de los agentes vasoactivos generando un cambio en la permeabilidad de su membrana, mediado única o mayoritariamente por Panx1. Dicho cambio resultaría en una modulación del tono pericitario, que a su vez impactaría en el diámetro capilar. De esta forma se induciría una modulación localizada del FSC y, en consecuencia, del intercambio de gases, nutrientes y productos de deshecho a través de la BHE. El cierre de los panexones conduciría a una disminución de la liberación de ATP al medio extracelular resultando en una disminución del calcio intracelular y del tono pericitario, en un aumento del calibre capilar (dilatación) y del intercambio a través de la BHE, mientras que la apertura de los panexones determinaría efectos opuestos. En este escenario la modulación de la actividad de la Panx1 surge como mecanismo novedoso para modificar el tono pericitario, posiblemente por regular de manera directa o indirecta la entrada y/o la liberación de calcio al citosol, paso crítico para que la maquinaria contráctil de la célula opere. En el mismo sentido, en ausencia de Panx1 funcional (como ocurre en una cepa de ratones *Knock-Out* Panx1^{-/-}), la respuesta debería verse alterada.

En este proyecto evaluaremos los efectos de dos agentes vasoconstrictores sobre la actividad de panexones pericitarios, uno liberado por el endotelio y de acción parácrina: la ET-1, y el otro liberado a nivel sistémico y de acción endócrina: la AT-II.

Objetivo General

Determinar si los agentes vasoactivos ET-1 y AT-II modulan la interacción pericito-medio extracelular mediante cambios en la actividad de los canales formados por Panx1.

El interés del proyecto será evidenciar una relación entre la permeabilidad pericitaria (mediada por canales de Panx1) y algunas señales del medio extracelular a nivel de la UNV, que pudieran asociar a este tipo celular directamente con la capacidad de regular el FSC y/o el intercambio a través de la microcirculación.

Objetivos Específicos

- 1) Determinar si los agentes vasoactivos AT-II y ET-1 regulan la interacción pericito-medio extracelular mediada por canales de gran poro que permitan el pasaje de moléculas pequeñas e iones (panexones o conexones).
- 2) De confirmar el Objetivo Específico 1, pasaremos a determinar la naturaleza molecular de los canales involucrados en la modulación del intercambio entre los pericitos pericapilares y el medio extracelular por los agentes AT-II y ET-1. Específicamente, investigaremos si dicha regulación es mediada por panexones de tipo 1.
- 3) Determinar si la transducción de las señales de los agentes vasoactivos estudiados en los objetivos específicos anteriores ocurre a nivel pericitario o si depende en forma obligada del contexto de la unidad neurovascular para modificar la permeabilidad de los pericitos.

Estrategia experimental

A continuación, se detalla la estrategia experimental de acuerdo con cada objetivo específico:

- 1) Exponer rodajas agudas de hipocampo de ratón (*ex vivo*) a medios que simulen un ambiente fisiológico (líquido céfalo-raquídeo artificial; aCSF), en presencia de agentes vasoactivos (AT-II o ET-1) junto con un agente intercalante que permea los canales de Cxs/Panxs, el BrEtd, buscando evidenciar diferencias significativas en la captación de este, durante los tratamientos con los agentes vasoactivos en comparación a las condiciones control.
- 2) Exponer rodajas agudas de hipocampo de ratón (*ex vivo*) de una cepa transgénica de ratones Knock-Out totales para *Panx1*^{-/-} (KO *Panx1*^{-/-}), a los mismos tratamientos que en 1), esperando encontrar variaciones diferentes a las halladas para la cepa de fenotipo salvaje.
- 3) Exponer a cultivos celulares de rata, de fenotipo salvaje, altamente enriquecidos en pericitos (*in vitro*) a medios con agentes vasoactivos, buscando evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos y los cultivos en condición control y/o con los resultados obtenidos en 1) y 2).

Métodos

Animales

Para los experimentos *ex vivo* (rodajas agudas de hipocampo), se emplearon ratones C57BL/6-J (fenotipo salvaje; WT) provistos por la Unidad de Reactivos y Biomodelos de experimentación (URBE; Facultad de Medicina) y ratones C57BL/6-Gt (Rosa) 26Sor^{tm16(Cre)Arte}, a los que se les removió con una recombinasa el exón 2 de Panxina1, que genera un codón de finalización de la traducción prematuro (Qu *et al.*, 2011; fenotipo KO Panx1^{-/-}, esquema explicativo en la Fig. 6). Para el armado de la colonia de estos últimos, generosamente Genentech™ donó embriones criogenizados heterocigotas para la Panx1 no funcional. Estos ratones fueron crio-recuperados por la Unidad de animales transgénicos y de experimentación (Institut Pasteur, Montevideo), derivados a la URBE y a partir de los ratones heterocigotas obtenidos se generaron colonias de Knock-Out homocigotas para la Panx1 no funcional. Los ratones que se utilizan son mayores a 21 días porque a partir de esta edad presentan un desarrollo completo de las conexinas en la UNV (Ezan *et al.*, 2012) y menores a 31 días para minimizar el daño de los vasos (Mishra *et al.*, 2014). Para los experimentos *in vitro* (cultivos de pericitos del SNC), se utilizaron ratas Sprague Dawley (SD) de 2 a 3 semanas de edad provistas por la URBE. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales empleados y su sufrimiento. Los procedimientos experimentales fueron supervisados por la orientadora y la co-orientadora de este proyecto, quienes cuentan con acreditaciones para experimentación animal C2 y B, respectivamente. Se cumplieron las normativas éticas vigentes a nivel nacional organizadas en la Ordenanza Universitaria “Uso de animales en experimentación, docencia e investigación Universitaria”, CDC Exp- 4332/99, Diario Oficial N° 25467, Feb. 21/00, Udelar, <http://www.csic.edu.uy/chea>. El Protocolo de experimentación para este proyecto tiene la aprobación de la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) por Resolución del 10/04/2019 (validez por 5 años) y puede localizarse con el número de expediente: Exp. N°070153-000109-19.

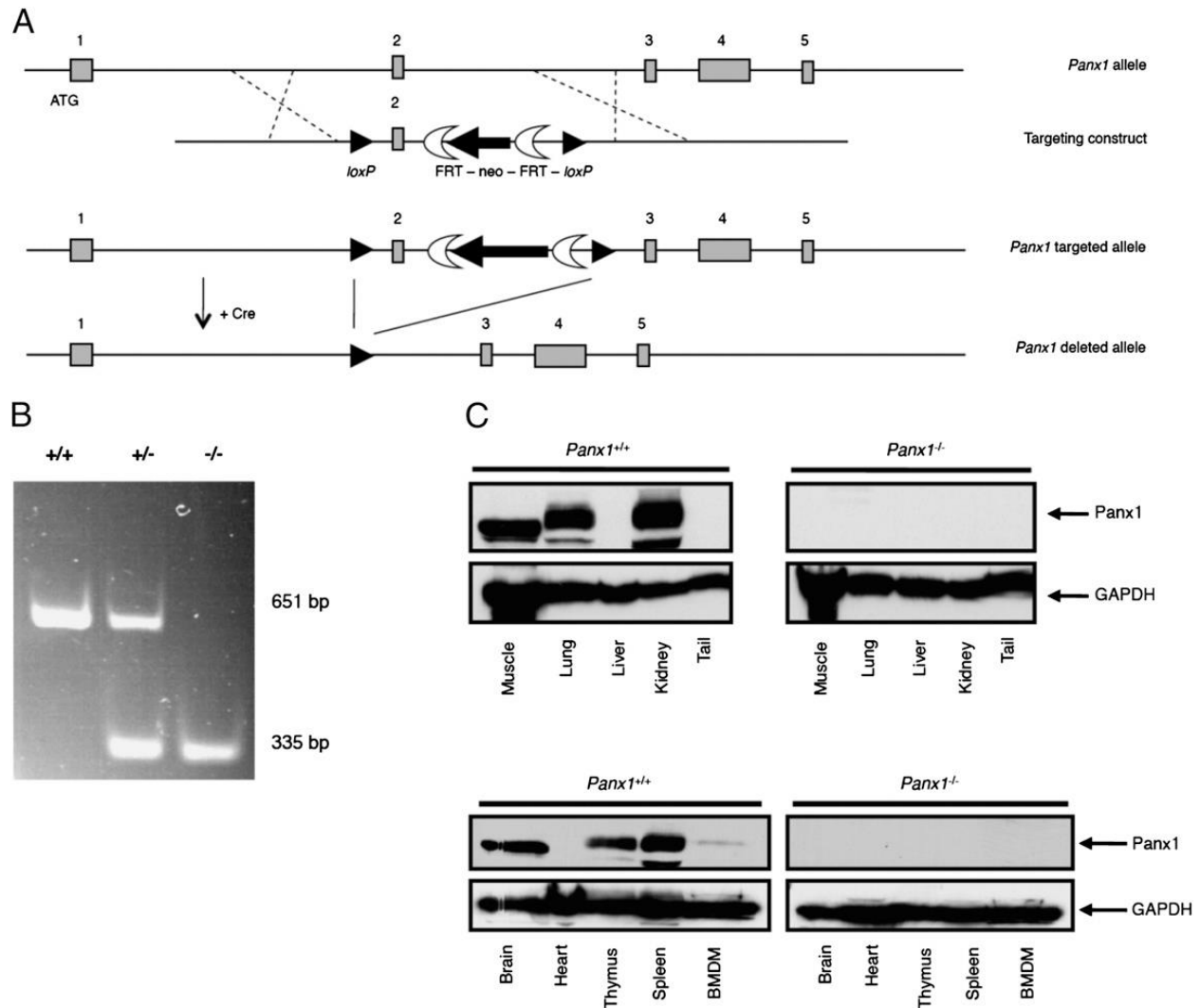


Figura 6 - Proceso de edición genética en los ratones de fenotipo deficiente en *Panx1*. (a) Esquema que indica cómo se realizaron los cortes de las recombinasas para generar la escisión del codón 2 del gen que codifica *Panx1*. (b) PCR y posterior electroforesis de los amplicones, indicando los genotipos de los ratones a los cuales se les realizó un proceso de edición. Se muestran tres carriles: el primero (+/+) contiene una banda correspondiente a un ratón sin alelos modificados, el segundo (-/+) muestra amplicones derivados de cromosomas editados con éxito y otros sin edición, y el tercero (-/-) indica el genotipo de un ratón al que se le editaron exitosamente ambos alelos para *Panx1* en su genoma. (c) Western Blot que muestra la diferencia de expresión a nivel traduccional de *Panx1* entre los ratones con un fenotipo salvaje (+/+) y uno con sus alelos para *Panx1* editados (-/-). Tomado de Qu et al. (2011).

Disección de hipocampo de ratón

Los ratones (P21-P31) se decapitan rápidamente y se procede a obtener los hipocampos de acuerdo al proceso de disección ilustrado en la Figura 7. Se realiza una incisión longitudinal en la piel que recubre el cráneo. Luego se remueve el cráneo mediante pinzas y se exponen los hemisferios cerebrales, los cuales

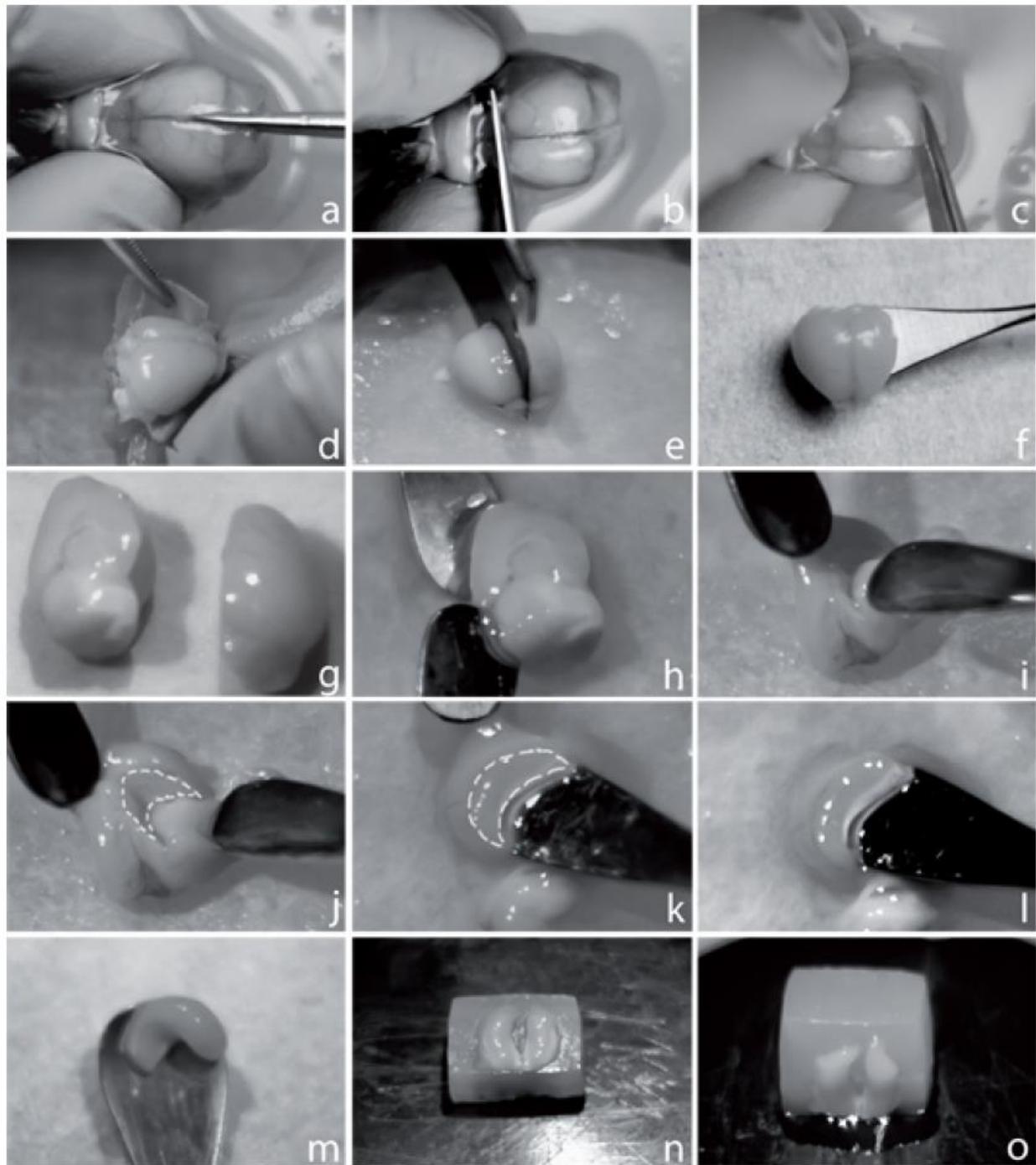


Figura 7 - Secuencia de eventos para disección de hipocampo de ratón. (a) se secciona el cráneo por la sutura central y (b) a la altura de los bulbos olfatorios, en forma coronal. (c, d) se remueve el cráneo cuidadosamente, (e) se realiza un corte longitudinal separando los hemisferios y (f) se remueven las mitades con una espátula. (g-h) En ambos hemisferios, se expone el corte del cuerpo calloso hacia arriba para, de manera delicada, proceder a (i-k) exponer los hipocampos de cada hemisferio. Finalmente (l-m) se remueven los mismos delicadamente con espátulas. (n-o) los hipocampos obtenidos se montan en un bloque de gelatina para ser seccionados. Tomado de Pannasch et al., 2011.

se separan mediante una incisión longitudinal realizada con bisturí. Se retiran los hemisferios cerebrales del cráneo y se incuban en aCSF equilibrado con carbógeno (95% O₂; 5% CO₂) a pH = 7.4. Posteriormente se remueven ambos hipocampos de cada hemicerebro y se sumergen en aCSF a 4°C equilibrado con carbógeno. El aCSF contiene en mM: NaCl 134; KCl 2,8; NaHCO₃ 29; NaH₂PO₄ 1,1; d-glucosa 12; MgSO₄ 1,5; CaCl₂ 2,5.

Obtención de rodajas agudas de Hipocampo e identificación de pericitos (*Ex Vivo*)

Las rodajas agudas de hipocampo de ratón se obtuvieron de acuerdo con protocolo descrito en Rouach *et al.* (2008) y Abudara *et al.* (2015). Luego de obtenidos los hipocampos, los mismos se montan en un bloque de gelatina que, a su vez, se adhiere al soporte de una cámara de acrílico que se monta en un vibrátomo (disposición mostrada en la Fig. 7, n, o). Se obtienen rodajas de 300 µm que se dejan reposar en cámaras sumergidas en aCSF equilibrado a pH 7.4 con carbógeno.

Los pericitos se identifican en la rodaja tras la exposición al marcador TO-PRO-3 (excitación/emisión en 642 nm / 661 nm) dada su captación diferencial en relación con los otros tipos celulares (Lacar *et al.*, 2012; Fig. 5 y 8,a). Dicho marcador tiene gran afinidad por el ADN de doble cadena, por lo que la marca más fuerte generada es nuclear. Se realiza el protocolo reportado por Lacar *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Se incuban las rodajas agudas de hipocampo por 20 minutos a temperatura ambiente en TO-PRO-3 1µM concentración final (tomando de una solución de stock 1mM en DMSO), en aCSF equilibrado con carbógeno, luego lavando por 10 minutos, 3 veces, en aCSF equilibrado con carbógeno. Posteriormente se realizan tratamientos (captación *ex vivo* de BrEtd bajo el efecto de vasoconstrictores) y finalmente se fija el tejido con paraformaldehído (PAF) 4% en PBS, 45 minutos (Fig 8,a)

Cultivos primarios de pericitos de cerebro de rata

Los cultivos primarios de pericitos son preparados siguiendo el procedimiento descrito en Isasi *et al.* (2019). Brevemente, las ratas son sacrificadas y su cerebro es disecado, removiendo cuidadosamente las meninges. El cerebro se corta en trozos con un bisturí y se incuba 1 hora a 37°C en una solución enzimática conteniendo 0.225mg/ml de colagenasa, CaCl₂ 1,5mM y 40ug/ml de ADNasa en el medio de cultivo DMEM. Luego de la digestión enzimática se realiza disgregación mecánica con una pipeta de 1ml. Se filtra

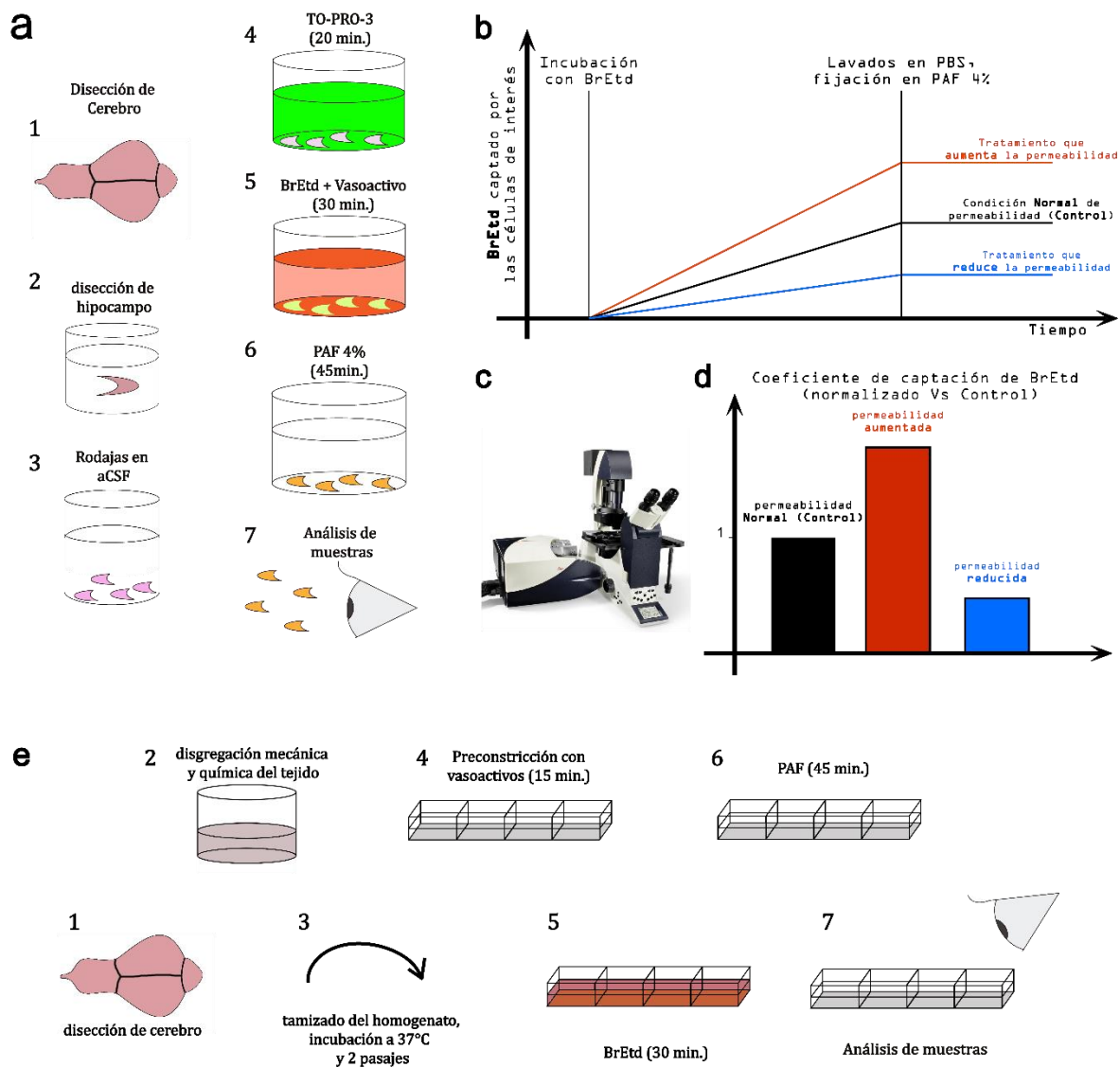


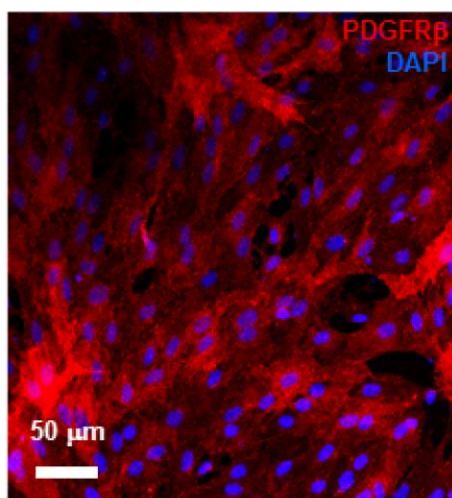
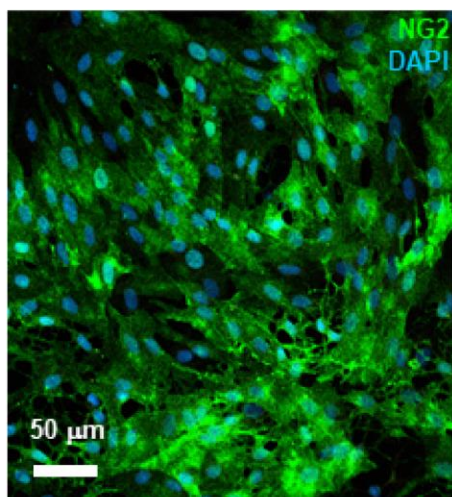
Figura 8 - Esquemas explicativos de la metodología de captación de BrEtD. **(a)** Protocolo para la captación de BrEtD en rodajas de hipocampo. **(b)** Medición de la permeabilidad a través de la captación de BrEtD. Se proponen tres condiciones experimentales, una situación de permeabilidad inalterada o normal: la situación control (**Negro**), una de permeabilidad aumentada (**Rojo**) y otra de menor captación (**Azul**). **(c)** Las rodajas son observadas al microscopio confocal y luego del análisis de imágenes se espera ver **(d)** un valor en promedio mayor al observado en la situación control en la condición de mayor permeabilidad, así como una media menor en la situación de menor captación. **(e)** Protocolo de captación de BrEtD para cultivos.

la fase no digerida con una malla metálica de 80µm. El tejido homogeneizado tamizado se mezcla con 1,7 volúmenes de seroalbúmina bovina 22% preparada en buffer salino de fosfato (PBS) y se centrifuga a 800g (2000 rpm), 10 min. El pellet obtenido se resuspende en un medio de cultivo conteniendo DMEM, 10% suero fetal bovino, 100 IU/ml de penicilina y 100ug/ml de estreptomicina. Los fragmentos de microvasos aislados son sembrados sobre placas de Petri de 35mm o botellas de 25cm² previamente cubiertas con

colágeno I (5 μ g/cm²). Cuando los cultivos alcanzan la confluencia (8-10 días *in vitro*), se decolan las células (tripsina EDTA 0.05%, 5min, 37°C), se centrifugan 400g (1000 rpm), 10 min y se siembran sobre plástico en placas de Petri o botellas de 25cm² en una dilución de 1/2 - 1/3. Luego de alcanzar la confluencia se realiza un segundo pasaje. Para los ensayos de captación de BrEtd, se sembraron 25.000 pericitos en cámaras de cuatro pocillos con fondo de cubreobjetos (C4-1.5H-N, Cellvis). Estas células se mantuvieron durante una semana en estufa a 37°C y 5% CO₂, cambiando el medio de cultivo cada dos días, y se utilizaron para los experimentos de captación de BrEtd. Los cultivos primarios para los experimentos en el marco de este trabajo fueron provistos por la Dra. Eugenia Isasi y realizados en el Dpto. de Histología y Embriología (Facultad de Medicina). En la Figura 9,a se muestran dos cuadros de un cultivo luego del segundo pasaje, tras realizar una tinción por inmunocitoquímica que evidencia marcadores pericitarios.

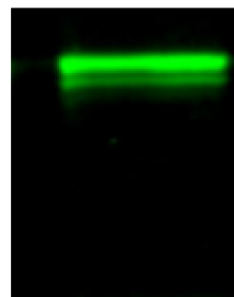
Western Blot para validación de los cultivos de pericitos de cerebro de rata

Para corroborar la identidad de los cultivos celulares, se realiza un Western Blot para los marcadores pericitarios PDGFR- β y Vimentina (Fig. 8 b). Se utiliza el protocolo descrito en Isasi *et al.* (2014). Placas de Petri de 60 mm de diámetro conteniendo pericitos, se lavan con PBS y luego se rastrillan ("scraping") con buffer de lisis (50mM HEPES, 50mM NaCl, 0.5% Tritón X-100, mezcla de inhibidores de proteasas SIGMAFAST™ para obtener una suspensión celular. Posteriormente, las muestras son sonicadas para romper las membranas y liberar el contenido celular. Las proteínas son cuantificadas utilizando el método del ácido bicinonínico según las instrucciones del fabricante. A las muestras enriquecidas en proteínas, se les agrega buffer de carga 5x (15% SDS, 0,3 M Tris (pH 6,8), 25 % glicerol, 1,5 M b-mercaptoetanol, 0,01 % azul de bromofenol), de forma que la concentración final del buffer sea 1X. Las muestras proteicas se desnaturalizan 5 min a 95°C en termobloque. Posteriormente, se procede a realizar una electroforesis SDS-PAGE. Brevemente, se siembran 40 μ g de proteína y el marcador de peso preteñido en un gel de acrilamida-bisacrilamida en condiciones desnaturalizantes durante 3h a 80v. Luego, se realiza una electrotransferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa durante 1,30h a 300 mA. Las proteínas, una vez transferidas, se tiñen con Rojo Ponceau 0.2% como control de carga. Finalmente, las membranas son bloqueadas con BSA 5% en TBS-Tween 0.1% durante 1h e incubadas con los anticuerpos primarios siguientes: ratón α -vimentina (1:4000, Sigma), conejo α -PDGFR β (1:400, Abcam) y ratón α -actina (1:4000) como control de carga -toda la noche a 4°C. Al otro día, se lavan e incuban durante 1h con los anticuerpos secundarios IRDye 680RD/IRDye 800CW-Conjugado a Cabra Anti-Ratón IgG/Cabra Anti-Conejo IgG (1:15000 en PBS, LI-COR Biosciences). Se emplea el sistema Odyssey (LI-COR Biosciences) para detectar las bandas. La cuantificación de las bandas se realiza con el programa Image Studio software version 5.2.5.

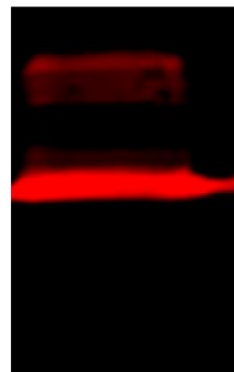
a**b**

Cultivos de
pericitos de
2^{do} pasaje

PDGFR- β
~124 KDa



Vimentina
~58 KDa



β -actina
~42 KDa

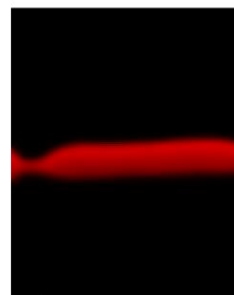


Figura 9 - Validación de los cultivos primarios de pericitos de cerebro de rata. (a) Dos cuadros de Inmunocitoquímica muestran que los cultivos expresan NG2 (Verde, contrastado con DAPI en celeste) y PDGFR- β (Rojo, contrastado con DAPI en azul). Barras de escala 50 μ m. (b) Western Blot de marcadores pericitarios en cultivos de pericitos de cerebro de rata: PDGFR- β (~124 KDa) y Vimentina (~58 KDa), junto con un control de carga, β -actina (~42 KDa).

Estudio de la permeabilidad en pericitos pericapilares (ensayo de captación de Bromuro de Etidio)

Para estudiar la expresión funcional de los panexones pericitarios se emplea la técnica de captación de bromuro de etidio (BrEtd; PM 394Da), un trazador que permea los hemicanales. El BrEtd ingresa por canales no selectivos de gran poro (como los conexones o panexones) abiertos. Una vez intracelular, el Etd⁺ se fija en forma irreversible a los ácidos nucleicos ADN y ARN, emitiendo fluorescencia (máximos de excitación / emisión de 528 nm / 598 nm). El nivel de fluorescencia emitida se cuantificará posteriormente y será directamente proporcional al número de canales abiertos. En este sentido, existirá una correlación entre la señal emitida por la célula de estudio y un mayor número de canales permeables funcionales o abiertos (Fig. 8,b-d explica el proceso de forma esquemática). Dicho de otro modo, el nivel de fluorescencia permite cuantificar el grado de permeabilidad celular mediado por estos canales. La concentración y el tiempo de exposición al BrEtd empleados para la adquisición de imágenes, se mantienen constantes a lo largo de cada experimento independiente y no inducen una saturación del colorante que impidiera evaluar variaciones de la magnitud de fluorescencia en las diferentes condiciones experimentales. Este método descrito en trabajos anteriores (Rouach *et al.*, 2008; Orellana *et al.*, 2011; Giaume *et al.*, 2012; Abudara *et al.*, 2015) es de uso habitual en el Laboratorio de Comunicación Celular, donde se realizaron las actividades experimentales del proyecto.

Para evidenciar el efecto de las sustancias vasoactivas en la permeabilidad de los pericitos mediado por panexones y/o conexones en las rodajas agudas obtenidas, estas fueron tratadas en aCSF equilibrado con carbógeno (95% O₂ + 5% CO₂) conteniendo 10μM de BrEtd y uno de los siguientes agentes vasoconstrictores: AT-II [10nM], ET-1 [10nM], por 30 minutos utilizando el mismo volumen de una misma solución de partida de BrEtd 10μM, garantizando de esta forma que, para cada réplica biológica, los tiempos y la concentración del trazador fueran exactamente iguales. Finalmente, las rodajas se fijaron con PAF 4% (45 min.), para su posterior revelado en microscopio confocal (Fig. 8,a).

En el caso de los cultivos, se realizó una pre-constricción de 15 min con ET-1 10nM o AT-II 10nM en DMEM, seguida de la incubación en BrEtd 10uM en DMEM. Siempre se comenzaron y terminaron las incubaciones en el medio con BrEtd al mismo tiempo para todas las condiciones (20 min.; utilizando el mismo volumen de BrEtd 10uM) garantizando de esta forma que, para cada réplica biológica, los tiempos y la concentración del trazador fueran exactamente iguales. Luego de realizar la captación de BrEtd en cultivos

controles y tratados con agentes vasoactivos, los cultivos celulares fueron fijados en PAF 4% (45 min.; Fig. 8,e) y montados en glicerol con 1 μ g/ml DAPI.

Adquisición y análisis de imágenes

Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 II – Unidad de Microscopía de Facultad de medicina y el análisis de las imágenes se realizó con el software fiji (ImageJ).

Para las rodajas agudas de hipocampo

Para adquirir las imágenes de las rodajas agudas en el microscopio confocal, se utiliza un objetivo 40x de inmersión en aceite. Se estudian los pericitos ubicados entre el *Stratum Radiatum* y el *Stratum Oriens*, a ambos lados de la capa de neuronas piramidales CA1 del hipocampo. Para descartar que la captación de BrEtd en pericitos sea influenciada por daño celular generado por la sección durante la obtención de las rodajas, se toman en cuenta solo los planos que estén a una distancia mayor a 30 μ m de la superficie de las rodajas. A los efectos de minimizar la variabilidad en la captación de BrEtd que podría generar el gradiente de difusión del colorante desde la superficie de la rodaja hacia sus capas más internas, adquirimos y procesamos imágenes ubicadas no más allá de 100 μ m de la superficie de las rodajas. Las imágenes de la situación control y los tratamientos fueron tomadas en el mismo momento, con la misma configuración (Gain, Offset, intensidad de láser, objetivos, etc.) para cada experimento independiente (réplica biológica). Los parámetros empleados para adquirir las imágenes con captación de BrEtd no indujeron una saturación del colorante que impidiera evaluar variaciones de la magnitud de fluorescencia en las diferentes condiciones experimentales. La intensidad de la fluorescencia se evaluó como $F_i - F_0$, donde F_i representa la fluorescencia en el soma pericitario en un campo dado y F_0 representa la fluorescencia de fondo para dicho campo (sin células u otras estructuras marcadas). Para ello, se generaron regiones de interés (ROIs) a nivel de los somas pericitarios a partir del canal correspondiente a la señal de TO-PRO-3, que luego fueron utilizadas en el canal correspondiente a la señal BrEtd para medir la media de la intensidad de fluorescencia (MGV; en unidades arbitrarias: 0-255; F_i). La fluorescencia de fondo F_0 se midió en 4 regiones de cada campo de BrEtd, en zonas que no tuvieran estructuras como núcleos o células, se promediaron (0-255; F_0) y posteriormente se restó la media de la fluorescencia de fondo F_0 a cada uno de los valores F_i obtenidos en los pericitos de dicho campo.

Considerando que aplicaremos agentes vasoconstrictores que podrían modificar el tamaño celular al

contraer el pericito, determinamos que el área de los pericitos al momento de la medición no había sufrido variaciones ante los tratamientos con vasoconstrictores.

La Figura 10 muestra como las áreas correspondientes a las ROI analizadas (sombras pericitarios) no varían en los distintos tratamientos con vasoconstrictores, factor que podría alterar la intensidad media “si se concentrara la señal” por un cambio de morfología o volumen de los cuerpos celulares de los pericitos.

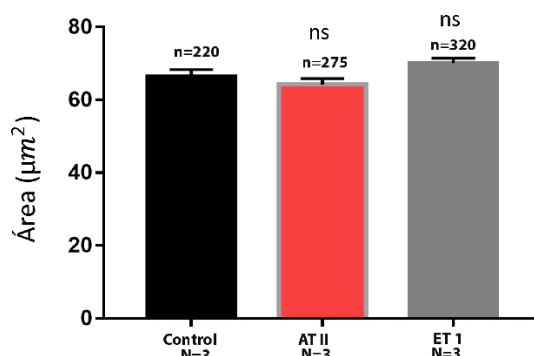


Figura 10 - El área medida de los pericitos no varía en forma significativa a pesar de los tratamientos con agentes vasoactivos. Se muestra un gráfico de barras indicando el área en μm^2 de las ROI (núcleo de los pericitos) en situación control (Negro; $N = 3$ $n = 220$), y tratados con AT-II (Rojo; $N = 3$ $n = 275$) y ET-1 (Gris; $N = 3$, $n = 320$). Los valores no presentan diferencias significativas con relación al control ($p\text{-valor} > 0.05$; test de Kruskal-Wallis para sets de datos no paramétricos) por lo que se interpreta que no hay errores en la medición a causa de variaciones en la topología de los somas y/o sus proyecciones. N = número de experimentos independientes; n = número total de pericitos contados por tratamiento.

Para los cultivos primarios de pericitos cerebrales

Posterior a la fijación de los cultivos, se adquieren imágenes de al menos 5 campos al azar por cada condición en duplicado (réplicas técnicas) por réplica biológica (al menos 3), utilizando un objetivo 20x de aire. Las imágenes de la situación control y los tratamientos son tomados en el mismo momento, con la misma configuración (Gain, Offset, intensidad de láser, objetivos, etc.).

Las imágenes son umbralizadas (bajo los mismos umbrales para todas las condiciones de una misma réplica biológica) de forma que solo se consideren los píxeles correspondientes, mayoritariamente, a cuerpos celulares. De esta imagen, se toma la densidad integrada (esto es, el MGv multiplicado por el área que superó el umbral de la imagen). Una vez hecho esto, se cuantifica la cantidad de núcleos en ese campo con la herramienta “analyze particles” del ImageJ y se divide la densidad integrada por la cantidad de partículas halladas. Para contar los núcleos se recurre al canal con DAPI y se realiza una imagen binaria donde se pueda aplicar el método de “analyze particles” (herramienta que reconoce y asigna un ROI a

toda estructura más o menos circular, que supera un cierto valor de área). Se considera que toda estructura aproximadamente circular de área superior a $70 \mu\text{m}^2$ es un núcleo, y dado que toda célula tiene (necesariamente) un solo núcleo, este es un buen indicativo de cuántas células hay en el campo.

El uso de esta variable fue valioso dado que, en ocasiones, hubo diferencias importantes en el número de células capturadas por campo (no mostrado). En principio, dado que la siembra de células había sido la misma para cada pocillo, dicha diferencia no debería haber sido grande, sin embargo, al comparar los números de células en los primeros experimentos se observaron grandes diferencias entre los grupos. Se consideró la densidad integrada sobre el número de células (IntDenCell) y no la MGV sobre el número de células porque la medida de IntDenCell contempla también el área total que supera el umbral de fluorescencia. Considerando los siguientes dos factores que hacían que aumentara el área cuantificada (es decir, más píxeles de la imagen superaran el umbral), la cantidad de células por campo y la cantidad de señal dada por una célula: uno puede evitar el primer sesgo asumiendo que las células están en una monocapa y dividiendo por el número de células totales en el campo, conservando la diferencia de área generada por una mayor captación en una célula dada. El parámetro MGV no captura esta última diferencia al solo medir el aumento en la media.

Estadística

Para las rodajas.

Se compara la media de captación de las células sometidas a tratamiento con respecto a la media de captación del control, por lo que se presentan como coeficiente medio de captación de BrEtd, donde el control valdrá $1 \pm \text{SEM}$ por definición. Se consideran significativas aquellas diferencias con un p-valor menor a 0.05, con un mínimo de 3 experimentos independientes. Se emplea el test de Kruskal-Wallis (no paramétrico) con post-test de Dunn utilizando el software Graphpad versión 6.0.

Para los cultivos.

Se compara la media de los valores IntDenCell de los cultivos que fueron sometidos a tratamientos con respecto al control, por lo que se presentan como el coeficiente IntDenCell de BrEtd, donde el control valdrá $1 \pm \text{SEM}$ por definición. Se consideran significativas aquellas diferencias que tuvieran un p-Valor menor a 0.05, con un mínimo de 3 experimentos independientes. Se emplea un t-test (paramétrico).

Resultados

La AT-II y la ET-1 aumentan la permeabilidad pericitaria en rodajas agudas de hipocampo (*ex vivo*)

Se cuantificó la captación de BrEtd en pericitos de hipocampo, identificados con TO-PRO-3, en rodajas agudas obtenidas de ratones C57BL/6-J de 20-31 días (Fig. 11). Se encontró que, tanto AT-II (10nM) como ET-1 (10nM), inducen una mayor captación de BrEtd en comparación a la del grupo control: para ambos grupos se ve un aumento del 57% (p-valor < 0.0001, Kruskal-Wallis con post-test de Dunn; Fig. 12). A continuación se presentan campos del *Stratum Radiatum*, en la región de CA1, donde se marcan en verde pericitos que selectivamente captan TO-PRO-3 y en rojo la señal del BrEtd, para las tres condiciones experimentales propuestas (Control, AT-II y ET-1; Fig. 11). Se aprecia que dichas señales colocalizan a nivel de los núcleos de los pericitos, que se adosan a la pared de los capilares sanguíneos. Este resultado pudo deberse al pasaje de la sonda BrEtd por difusión a través de panexones, hemicanales de conexina, de otros canales de poro grande o por mecanismos activos desconocidos.

Para determinar la participación eventual de panexones formados de panexina1 en la respuesta de la permeabilidad pericitaria a BrEtd ante AT-II y ET-1, se utilizaron ratones knockout totales para la panexina1.

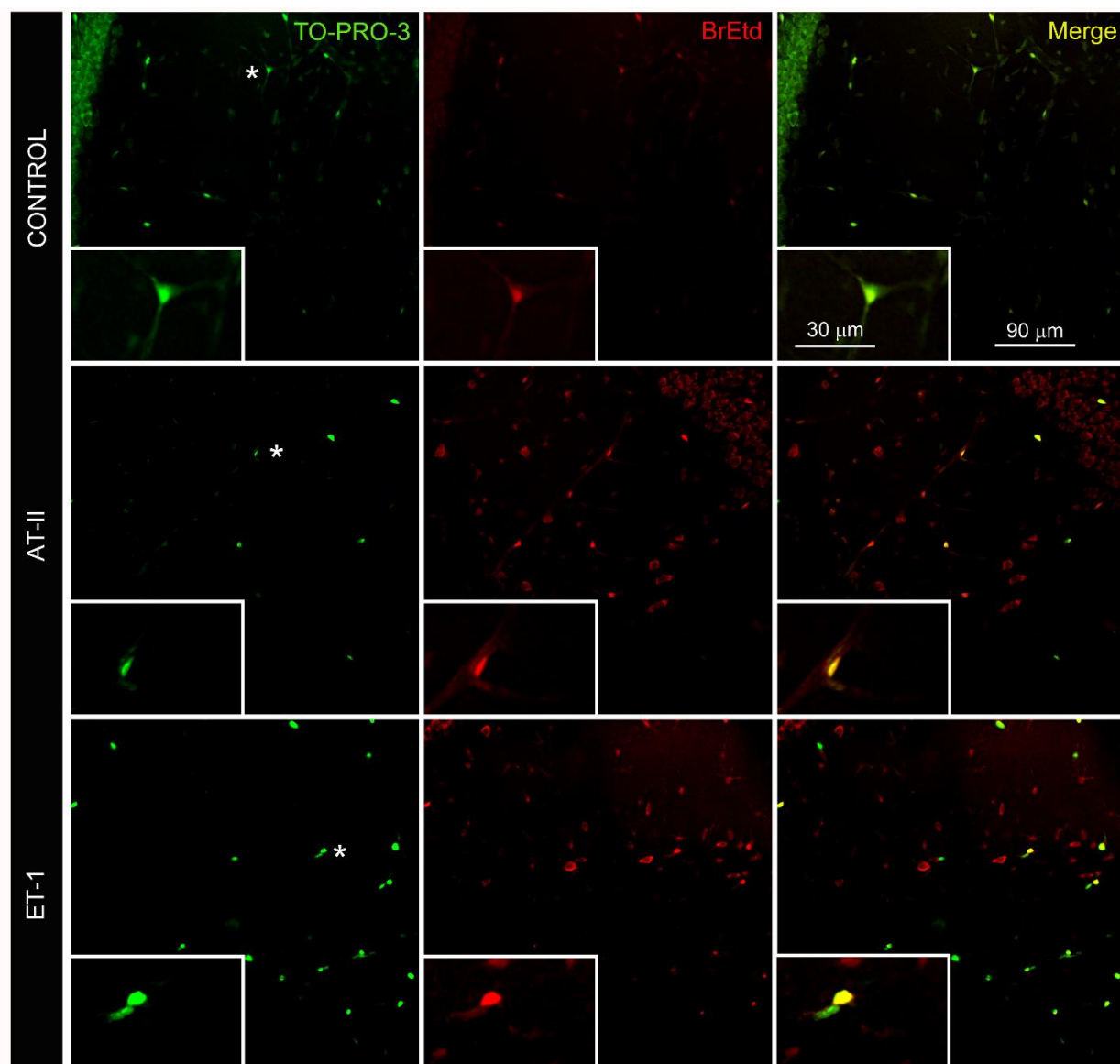


Figura 11 - Pericitos en rodajas agudas de hipocampo derivadas de ratones WT aumentan su captación al BrEtd ante tratamientos con AT-II y ET-1. Pericitos identificados con TO-PRO-3 (Columna 1, Verde), fluorescencia para BrEtd (Columna 2, Rojo) y superposición de 1 y 2 (Columna 3, superposición o "merge"), en condiciones Control (Fila 1), y luego de tratamientos con AT-II (10nM; Fila 2) y ET-1(10nM; Fila 3). Barras de escala (ubicadas en el cuadro control "merge") 90μm y 30μm en el acercamiento.

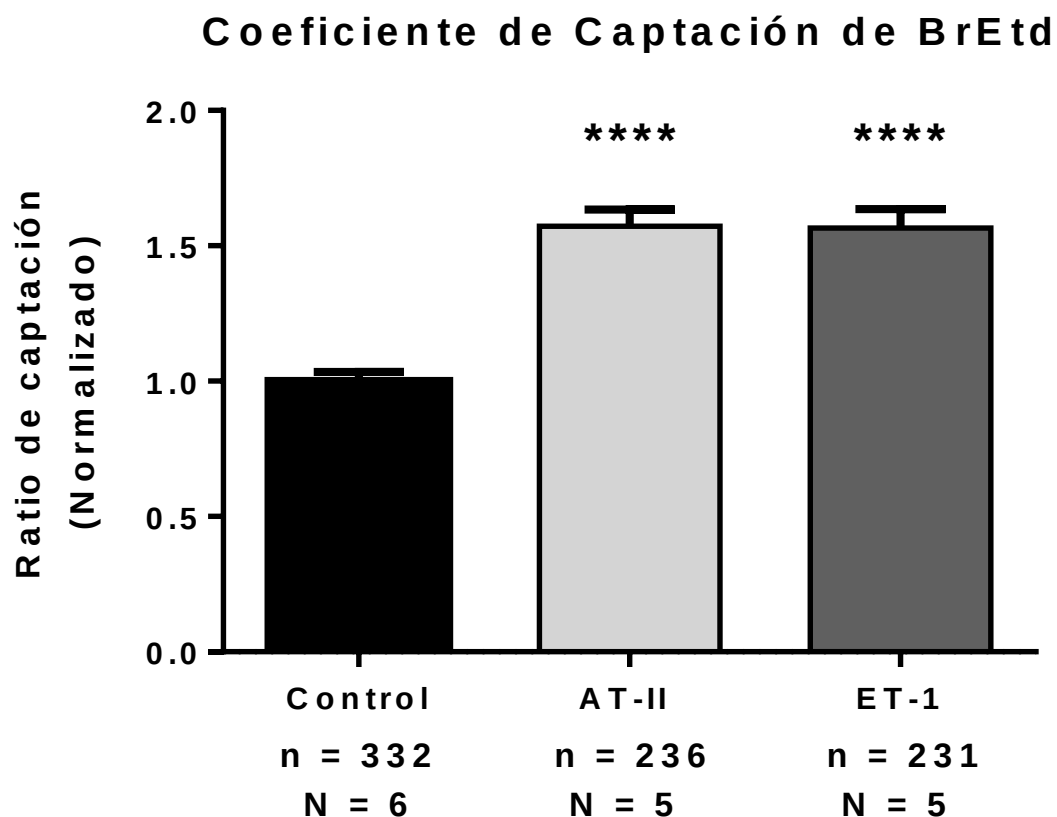


Figura 12 - Efecto de la AT-II y la ET-1 sobre el coeficiente de captación de BrEtd en ratones WT. Se presenta la media $\pm$ SEM. Control = 1 ± 0.035 (N = 6 n = 332), AT-II = 1.57 ± 0.220 (N = 5 n = 236), ET-1 = 1.57 ± 0.215 (N = 4, n = 231). Los grupos tratados son diferentes al control con un p-Valor < 0.0001 (****). Test Kruskal-Wallis, para sets de datos no paramétricos, con post test de Dunn. N = número de experimentos independientes; n = número total de pericitos contados por tratamiento.

En ausencia total de Panexina1, la permeabilidad pericitaria *ex vivo* no varía ante el tratamiento con los agentes vasoactivos AT-II y ET-1

Cuando rodajas de hipocampo de animales KO de Panx1 (Panx1^{-/-}) fueron expuestas a AT-II (10 nM) y ET-1 (10 nM), no se observaron cambios significativos en la permeabilidad de membrana pericitaria en relación al control (p-valor > 0.05, Kruskal Wallis con post-test) (Figuras 13 y 14). Estos resultados sugieren fuertemente que el aumento en la captación de BrEtd encontrada en pericitos de ratones de fenotipo

salvaje, causado por AT-II y ET-1, está mediado mayoritariamente por Panx1 y no por otro tipo de canal de poro grande.

Para evaluar si el aumento de la permeabilidad pericitaria inducido por AT-II y ET-1 y mediado por Panx1 se traduce directamente en los pericitos o requiere de la presencia de otros tipos celulares, se utilizaron cultivos primarios enriquecidos en pericitos cerebrales de rata.

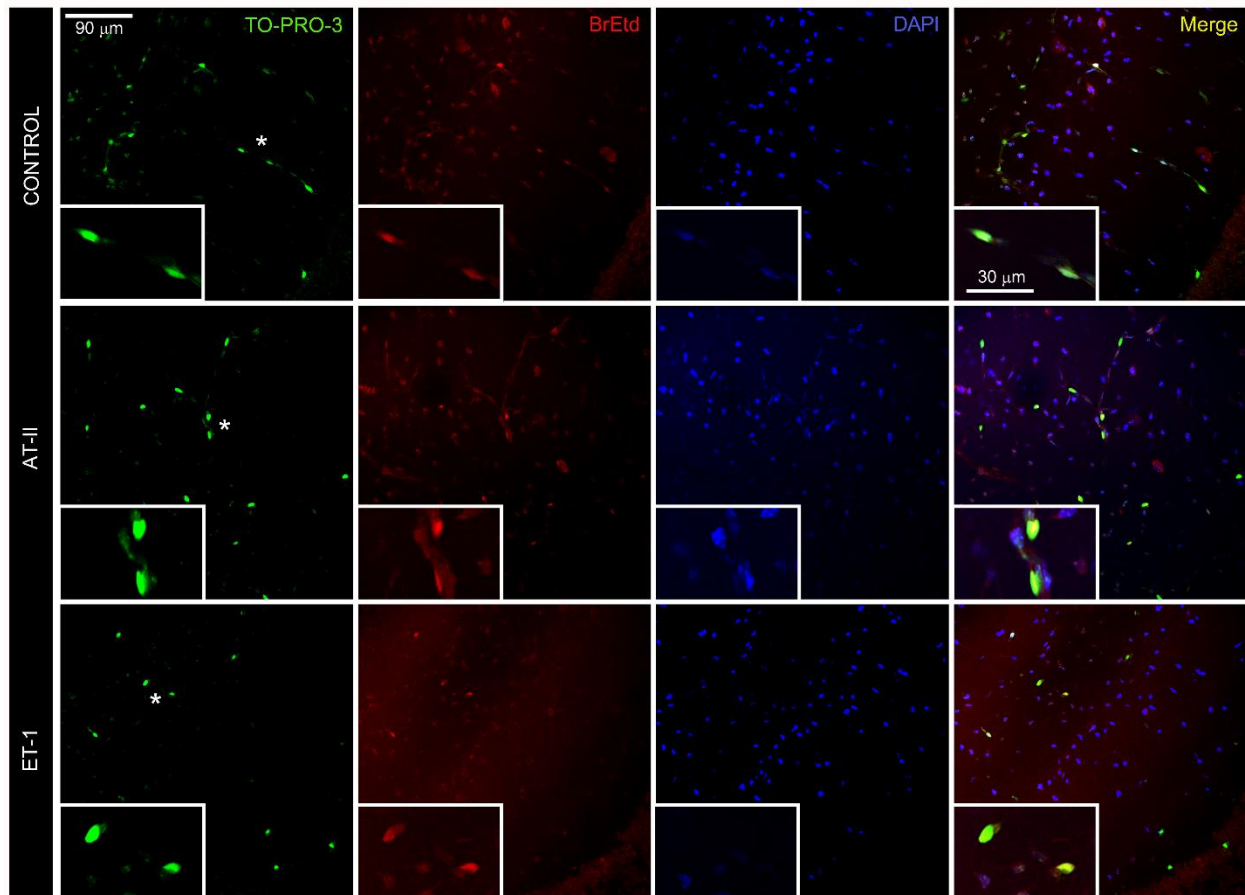


Figura 13 - Captación de BrEtD en ratones de cepa KO-Panx1^{-/-}. En la columna 1 muestra la señal del TO-PRO-3 (canal verde), en la columna 2 se muestra el canal del BrEtD (rojo), en la columna 3 se muestra otro marcador de ácidos nucleicos (DAPI; canal azul) y en la columna 4 se ve la combinación (o el "merge") de los canales antedichos. En las filas 1, 2 y 3 se muestran campos representativos de la situación control y los tratamientos para AT-II (10nM) y ET-1 (10nM), respectivamente. Cada cuadro muestra un aumento 3x de un pericito representativo de la imagen. Barras de escala ubicadas en el cuadro del merge del control: 90 μm y 30 μm en el aumento.

Coeficiente de Captación de BrEtd en ratones KO-Panx1^{-/-}

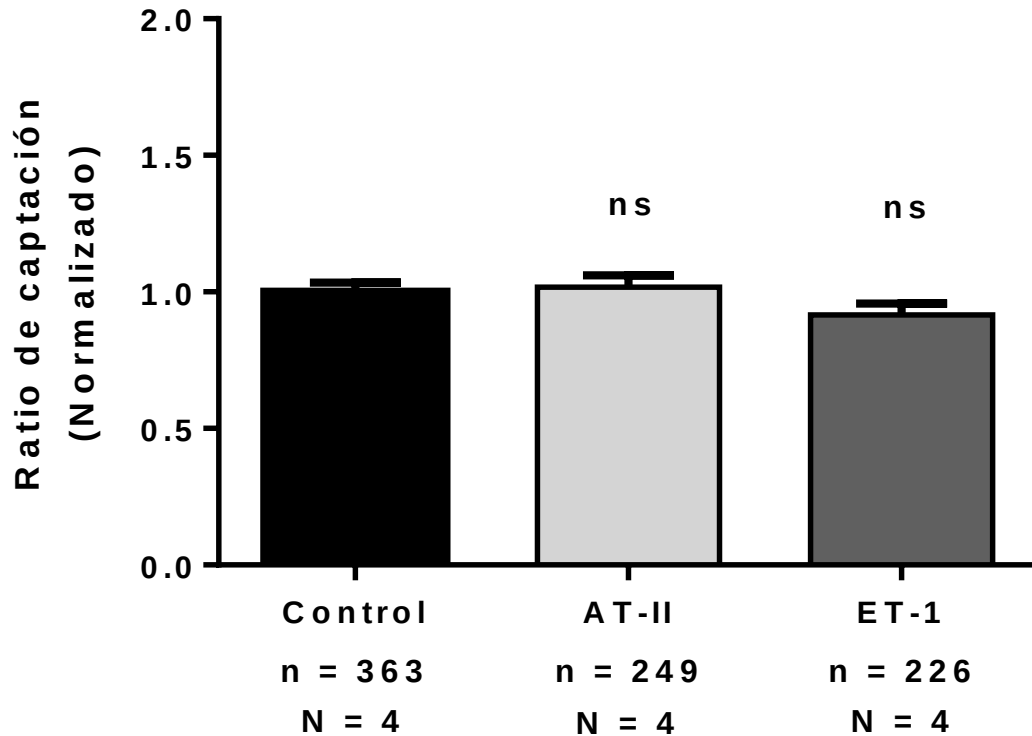


Figura 14 - Efecto de AT-II y ET-1 sobre el coeficiente de captación de BrEtd en ratones KO Panx1^{-/-}. Se presenta la media $\pm$ SEM de los coeficientes de captación hallados para la cepa KO-Panx1^{-/-}. Control = 1 ± 0.035 (N = 4 n = 363), AT-II = 1.02 ± 0.044 (N = 4 n = 249), ET-1 = 0.95 ± 0.042 (N = 4 n = 226), los grupos tratados no presentan diferencias significativas con respecto a la situación control KO-Panx1^{-/-} (Test de Kruskal-Wallis, p-Valor = 0.2627). En suma, con lo hallado para los valores de la cepa WT, este gráfico sugiere que la variación que se genera en el fenotipo salvaje depende de la Panx1 funcional para generar la modulación.

La AT-II aumenta la permeabilidad pericitaria en cultivos de pericitos de cerebro de rata (*in vitro*)

Se realizaron cultivos primarios de pericitos de cerebro de rata WT. En la Figura 9 se observa una imagen de inmunocitoquímica y una de WB, que evidencian la expresión de 3 marcadores típicos de pericitos (NG2, PDGFR- β y Vimentina) en estos cultivos confirmando la identidad de este tipo celular.

Se observó que la AT-II modifica la permeabilidad pericitaria aumentando significativamente la fluorescencia obtenida por el BrEtd en un 46% en relación con los cultivos controles (p-valor < 0.0001; t-

Test) (Figuras 15 y 16). Estos resultados sugieren que el vasoconstrictor AT-II posee un efecto directo en los pericitos, que aumenta la permeabilidad pericitaria a moléculas de gran tamaño y no requiere de otros tipos celulares para generar dicho efecto.

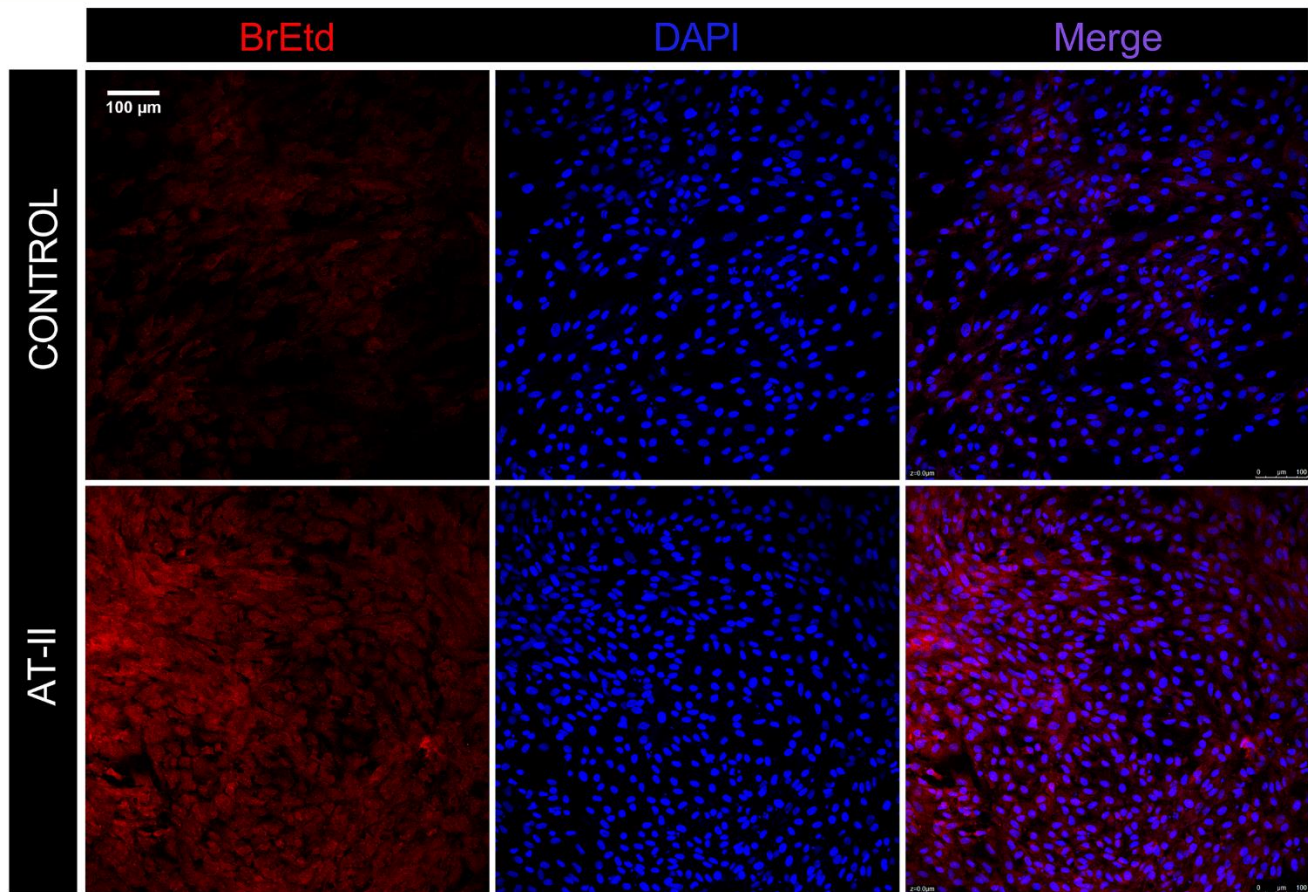


Figura 15 - Captación de BrEtd en cultivos primarios de pericitos de cerebro de rata. En la primera fila se muestra la situación **control**, en la segunda fila los cultivos tratados con **AT-II**. En la columna 1 se muestra el canal de BrEtd (Rojo) en la columna 2 DAPI (Azul) y en la 3 la superposición (o “merge”) de ambos canales. Se aprecia como los pericitos tratados con AT-II tienen mayor señal en el canal del BrEtd.

Coeficiente de captación de BrEtd en cultivos de pericitos (*IntDenCell*)

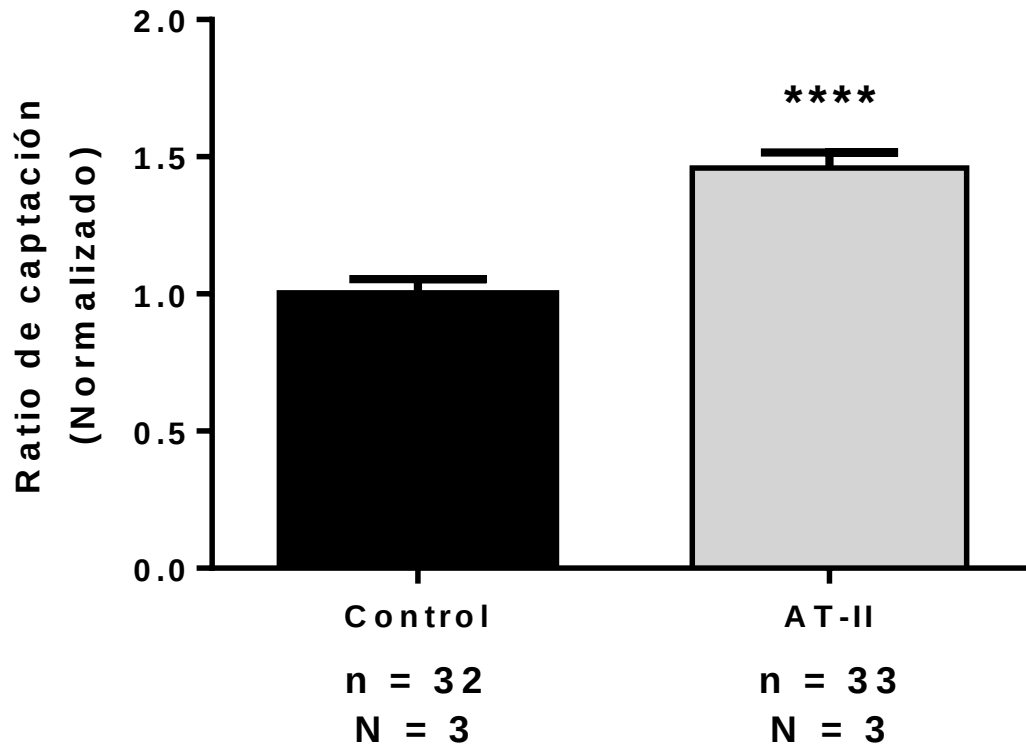


Figura 16 - Efecto de AT-II sobre la captación de BrEtd en cultivos de pericitos de cerebro de rata. Se presenta la media del parámetro *IntDenCell* $\pm$ SEM. Control = 1 ± 0.035 ($N = 3$, $n = 32$), AT-II = 1.46 ± 0.058 ($N = 3$, $n = 33$). El grupo tratado es diferente al control con un p -Valor < 0.0001 (****). T-Test no pareado, para sets de datos paramétricos, p -Valor de dos colas. N = número de experimentos independientes; n = número total de cuadros cuantificados. Número de pericitos por cuadro > 500 .

Discusión

En este trabajo caracterizamos los efectos de los vasoconstrictores AT-II y ET-1 en la permeabilidad pericitaria mediante el empleo de la técnica de captación de bromuro de etidio en preparaciones *ex vivo* e *in vitro* e identificamos posibles determinantes moleculares de dicha regulación, en particular la participación de la panexina1.

En suma, los resultados obtenidos en el marco de esta tesina indican que, (1) los agentes vasoconstrictores AT-II y ET-1 aumentan el intercambio molecular entre el pericito y el medio extracelular, (2) este aumento

en el intercambio parece estar mediado mayoritariamente o en su totalidad por canales formados por Panx1 y (3) la transducción de la señal vasoactiva ocurre a nivel de los pericitos, sin necesidad de otros elementos de la UNV. Estos resultados son coherentes con nuestra hipótesis inicial.

Sin embargo, si bien pudimos determinar la participación de la Panx1 en la respuesta de los pericitos a los agentes vasoactivos, existen limitaciones en el alcance de nuestro diseño experimental que no nos permiten concluir de manera inequívoca la contribución exclusiva de la Panx1 pericitaria en los aumentos de permeabilidad. Si bien los resultados sugieren fuertemente que el aumento de permeabilidad es un proceso que está principalmente mediado por panexones, el ingreso del BrEtd a los pericitos podría estar contribuido por un mecanismo diferente a los panexones. Siguiendo esta línea de pensamiento, la modificación del estado de los panexones podría gatillar la activación de mecanismos activos de transporte o la apertura de otros canales de poro grande los cuales serían los últimos responsables del ingreso del colorante a los pericitos. Por último, nuestro diseño experimental no permite discernir si los cultivos de pericitos cerebrales efectivamente expresan la Panx1, o cuál es la contribución de estos supuestos panexones a la permeabilidad de los cultivos. Habrá que corroborar la expresión de Panx1 en los cultivos mediante un western blot y podría incluso evaluarse la magnitud de su expresión en relación con otros cultivos o frente a distintas situaciones mediante q-RT-PCR. Posteriormente se podrían repetir los procedimientos ya realizados *in vitro* (cultivos primarios), pero bajo el tratamiento con fármacos específicos para el bloqueo de canales de Panx1, o alternativamente trabajar con modelos *in vitro* derivados de animales KO-Panx1^{-/-} para, de esta forma, demostrar la participación de Panx1 en el aumento de permeabilidad inducido por agentes vasoconstrictores.

A pesar de lo antedicho, la evidencia experimental nos sugiere que existe una conexión entre la señal de los agentes vasoconstrictores y la actividad (apertura/ cierre) de los canales de Panx1. Es probable que la estimulación de AT-II se encuentre determinada por receptores de tipo AT₁, que a su vez activen proteínas G pertenecientes a la familia de las Rho GTPasas como ROCK, como fue reportado en Gómez *et al.* (2018). El siguiente esquema ejemplifica posibles vías de señalización celular que podrían contribuir con la apertura de canales de Panx1 en pericitos ante la exposición a AT-II. El esquema fue originalmente planteado en base a información y experimentación con células mesangiales, sin embargo, se proponen vías de activación similares a las que se proponen en este trabajo (Fig. 17) y también está reportado que los pericitos expresan estos receptores (Matsugi *et al.*, 1997; Asashima *et al.*, 2003).

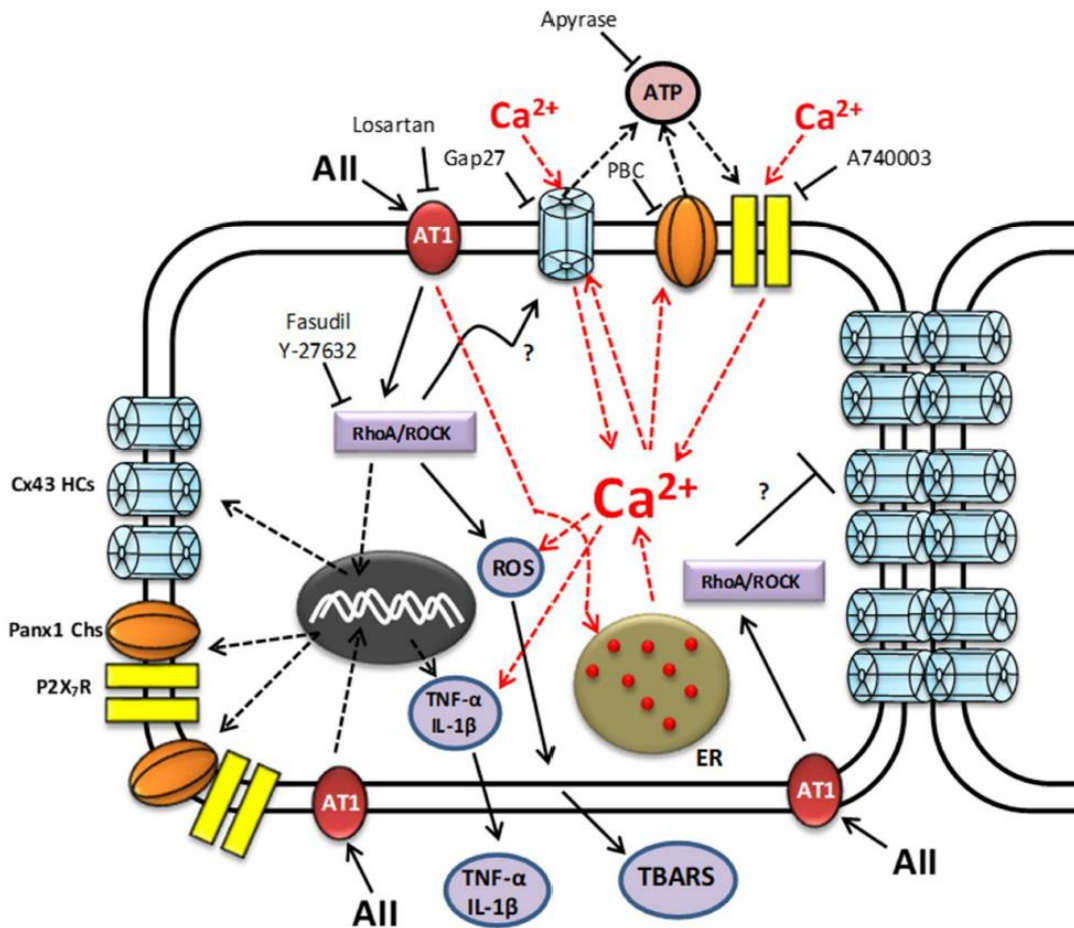


Figura 17 - Esquema que propone posibles vías de señalización desde la estimulación con AT-II. Se presentan varios elementos celulares que podrían participar en la respuesta a la AT-II en células mesangiales. Los pericitos presentarían similitudes como canales de Panx1 asociados a receptores P2X₇. Es posible que a través de la estimulación de receptores AT₁ y la activación de RhoA/ROCK, se inserten más canales a nivel de la membrana plasmática. En el esquema se muestra como distintos factores estimularían el aumento de $[Ca^{2+}]_i$, que inicialmente sería liberado desde el retículo endoplásmico (ER), y que, a su vez, favorecería la apertura de más canales de Panx1. Por otro lado, la liberación de ATP desde los panexones estimularían a los receptores ionotrópicos (como P2X₇; no mostrado en el esquema) y otros metabotrópicos (como P2Y₆). En el esquema se muestra la participación de Cx43, sin embargo, de nuestro trabajo no se desprende que tengan una participación importante en las vías de regulación de la permeabilidad ante la estimulación con AT-II en pericitos cerebrales. (Tomado de Gómez et al., 2018).

La estimulación mediante los vasoconstrictores podría generar un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, que gatillaría la apertura de panexones (Locovei et al., 2006). Al abrirse, los panexones permitirían la posterior liberación de ATP al medio extracelular. Esta liberación de ATP estimularía receptores purinérgicos cercanos, por ejemplo, de tipo ionotrópico P2X₇ y metabotrópico P2Y₆ (Pelegriin & Surprenant, 2006; Locovei et al., 2006; Mai et al., 2016). Estos receptores purinérgicos (como P2X₇/P2Y₆) podrían contribuir directamente al mantenimiento de panexones abiertos, o a la apertura de nuevos panexones y liberación de más ATP al favorecer aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ (Locovei et al., 2006). En suma, se generaría una retroalimentación

positiva de apertura de panexones, liberación de ATP y aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , que tendría por consecuencia aumentar la señalización purinérgica parácrina/autócrina local mediada por ATP y, por otro lado, podría colaborar en una respuesta contráctil, debido al aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En este sentido el calcio pericitario aumentaría como resultado de su ingreso desde el exterior a través de receptores ionotrópicos P2X_7 y/o mediante su ingreso directo por panexones, o desde el interior celular mediante su liberación desde los sitios de almacenamiento intracelular (retículo endoplásmico) por activación de receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y_6 .

Variaciones en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , podrían tener un impacto directo en el tono pericitario (Wynne *et al.*, 2009; Borysova *et al.*, 2013; Burdyga & Borysova, 2014), y de este modo afectarían el calibre de los vasos de la red microvascular (Borysova *et al.*, 2013; Burdyga & Borysova, 2014; Hall *et al.*, 2014). El aumento del calcio intracelular por apertura de panexones, tendría la capacidad de reducir el FSC en las zonas de menor actividad, mientras que la disminución en los niveles intracelulares de calcio por cierre de panexones favorecería la vasodilatación de los capilares y así aumentaría el FSC en las zonas de mayor actividad. A su vez, debe considerarse que el diámetro de un eritrocito es en ocasiones ligeramente más grande que la luz del capilar por la que circula (es decir, debe deformarse o deformar a los capilares para lograr circular por ellos; Grutzendler & Nedergaard, 2019). Si el tono pericitario no afectara el diámetro, pero sí la rigidez del capilar, la apertura de panexones, la liberación de ATP y los aumentos del calcio intrapericitario, ralentizarían el pasaje de eritrocitos por los microvasos, logrando de esta manera también regular el FSC.

Independientemente de su eventual participación en la regulación del tono pericitario, proponemos aquí que la liberación de transmisores como ATP a través de los panexones, podría mediar una comunicación parácrina con otros elementos de la UNV. Así, por ejemplo, los pericitos ubicados en la interface neurovascular podrían sensor la actividad neuronal y enviar una señalización a través del ATP liberado por panexones a otros elementos contráctiles, como MLV a nivel de las arteriolas precapilares (Hall *et al.*, 2014).

Finalmente, alteraciones en los niveles de ET-1 pueden acompañar condiciones patológicas tales como la diabetes, una enfermedad de desregulación metabólica general, o enfermedades de naturaleza neurodegenerativa como el Alzheimer, el Parkinson o la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Jain, A., 2014; Ranno *et al.*, 2014; Nortley *et al.*, 2018). En estas condiciones, aumentos de ET-1 podrían exacerbar la

actividad de la Panx1, el calcio intrapericitario y la comunicación purinérgica, afectando el FSC y el intercambio a través de la BHE por vasoconstricción capilar. Este mecanismo patogénico propuesto podría jugar un rol clave en las enfermedades mencionadas, que se asocian con alteraciones en el funcionamiento de la red microvascular (Uesugi *et al.*, 1996; Zhong *et al.*, 2008; Garbuzova-Davis *et al.*, 2011; Jain, A., 2014; Ranno *et al.*, 2014; Yamadera *et al.*, 2015; Nortley *et al.*, 2018).

Perspectivas

Para continuar en esta línea de trabajo, deberíamos confirmar la expresión de Panx1 en los cultivos primarios de pericitos cerebrales de rata, mediante WB, para luego realizar pruebas farmacológicas con bloqueantes específicos para panexones. Alternativamente, una prueba más robusta que la farmacológica, podría ser la de aislar pericitos mediante un protocolo análogo al que se usó para ratas de fenotipo salvaje, pero en el modelo murino KO-Panx1^{-/-}, y realizar los ensayos de captación de BrEtd en presencia de los vasoconstrictores. Si obtuviésemos un resultado similar a lo observado en las preparaciones *ex vivo* de ratones WT y KO-Panx1^{-/-}, se podría demostrar que el aumento de permeabilidad está regulado por la Panx1 del pericito, aún, cuando este tipo celular está aislado de los otros elementos de la UNV. Por otro lado, aún resta por analizar los efectos de ET-1 en la permeabilidad al BrEtd en cultivos primarios de pericitos cerebrales de rata.

Si bien los resultados obtenidos en este proyecto muestran una relación causal entre la acción de los vasoconstrictores y la apertura de panexones, no comprueban si efectivamente el Ca²⁺ se modifica a nivel del citosol pericitario, ni tampoco -si es que efectivamente este se viera aumentado en respuesta a los agentes vasoconstrictores- si dicho aumento se ve afectado, en alguna medida, por el estado funcional de la Panx1.

Las conclusiones obtenidas y los nuevos experimentos propuestos resultan entonces en una propuesta de trabajo para mis estudios de posgrado, en la que se buscará responder si efectivamente los vasoconstrictores, en particular ET-1, modulan la actividad de los panexones a través de la regulación de los niveles de Ca²⁺ citosólico, ya sea por liberación de Ca²⁺ desde los reservorios intracelulares o desde el exterior celular a través de canales iónicos específicos y no específicos. Además, se intentará determinar si la actividad de Panx1 tiene implicancias en la respuesta vasoconstrictora de ET-1 y si los efectos de ET-

1 sobre la actividad de Panx1 y el calcio intracelular, están alterados en un modelo animal de una enfermedad neurodegenerativa, la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Bibliografía

Abudara, V., Roux, L., Dallérac, G., Matias, I., Dulong, J., Mothet, J. P., ... & Giaume, C. (2015). Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *Glia*, 63(5), 795-811.

Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., ... & Johansson, B. R. (2010). Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature*, 468(7323), 557.

Asashima, T., Iizasa, H., Terasaki, T., & Nakashima, E. (2003). Rat brain pericyte cell lines expressing β 2-adrenergic receptor, angiotensin II receptor type 1A, klotho, and CXCR4 mRNAs despite having endothelial cell markers. *Journal of cellular physiology*, 197(1), 69-76.

Attwell, D., Mishra, A., Hall, C. N., O'Farrell, F. M., & Dalkara, T. (2015). What is a pericyte?. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(2), 451-455.

Begandt, D., Good, M. E., Keller, A. S., DeLalio, L. J., Rowley, C., Isakson, B. E., & Figueroa, X. F. (2017). Pannexin channel and connexin hemichannel expression in vascular function and inflammation. *BMC cell biology*, 18(1), 2.

Billaud, M., Lohman, A. W., Straub, A. C., Looft-Wilson, R., Johnstone, S. R., Araj, C. A., ... & Laird, D. W. (2011). Pannexin1 regulates α 1-adrenergic receptor–mediated vasoconstriction. *Circulation research*, 109(1), 80-85.

Borysova, L., Wray, S., Eisner, D. A., & Burdya, T. (2013). How calcium signals in myocytes and pericytes are integrated across in situ microvascular networks and control microvascular tone. *Cell Calcium*, 54(3), 163-174.

Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., & Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(23), 13644-13649.

Burdya, T., & Borysova, L. (2014). Calcium signalling in pericytes. *Journal of vascular research*, 51(3), 190-199.

Chiu, Y. H., Schappe, M. S., Desai, B. N., & Bayliss, D. A. (2018). Revisiting multimodal activation and channel properties of Pannexin 1. *The Journal of general physiology*, 150(1), 19-39.

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., ... & Norotte, C. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*, 3(3), 301-313.

Damisah, E. C., Hill, R. A., Tong, L., Murray, K. N., & Grutzendler, J. (2017). A fluoro-Nissl dye identifies pericytes as distinct vascular mural cells during in vivo brain imaging. *Nature neuroscience*, 20(7), 1023.

ElAli, A., Thériault, P., & Rivest, S. (2014). The role of pericytes in neurovascular unit remodeling in brain disorders. *International journal of molecular sciences*, 15(4), 6453-6474.

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

Ezan, P., André, P., Cisternino, S., Saubaméa, B., Boulay, A. C., Doutremer, S., ... & Cohen-Salmon, M. (2012). Deletion of astroglial connexins weakens the blood–brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(8), 1457-1467.

Fernández-Klett, F., Offenhauser, N., Dirnagl, U., Priller, J., & Lindauer, U. (2010). Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51), 22290-22295.

Fisher, M. (2009). Pericyte signaling in the neurovascular unit. *Stroke*, 40(3_suppl_1), S13-S15.

Garbuzova-Davis, S., Rodrigues, M. C., Hernandez-Ontiveros, D. G., Louis, M. K., Willing, A. E., Borlongan, C. V., & Sanberg, P. R. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis: a neurovascular disease. *Brain research*, 1398, 113-125.

Garré, J. M., Retamal, M. A., Cassina, P., Barbeito, L., Bukauskas, F. F., Sáez, J. C., ... & Abudara, V. (2010). FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(52), 22659-22664.

Giaume, C., Orellana, J. A., Abudara, V., & Sáez, J. C. (2012). Connexin-based channels in astrocytes: how to study their properties. In *Astrocytes* (pp. 283-303). Humana Press.

Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C., & Sáez, J. C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Frontiers in pharmacology*, 4, 88.

- Gomez, G., Fernández, P., Velarde, V., & Sáez, J. (2018). Angiotensin II-induced mesangial cell damage is preceded by cell membrane permeabilization due to upregulation of non-selective channels. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 957.
- Good, M. E., Begandt, D., DeLalio, L. J., Keller, A. S., Billaud, M., & Isakson, B. E. (2015). Emerging concepts regarding pannexin 1 in the vasculature.
- Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(4), 285.
- Gordon, G. R., Choi, H. B., Rungta, R. L., Ellis-Davies, G. C., & MacVicar, B. A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*, 456(7223), 745.
- Gödecke, S., Roderigo, C., Rose, C. R., Rauch, B. H., Gödecke, A., & Schrader, J. (2011). Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 302(6), C915-C923.
- Grutzendler, J., & Nedergaard, M. (2019). Cellular Control of Brain Capillary Blood Flow: In Vivo Imaging Veritas. *Trends in neurosciences*. Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., ... & Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(7494), 55.
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., ... & Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(7494), 55.
- Hamilton, N. B., Attwell, D., & Hall, C. N. (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Frontiers in neuroenergetics*, 2, 5.
- Hartmann, D. A., Underly, R. G., Grant, R. I., Watson, A. N., Lindner, V., & Shih, A. Y. (2015). Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice. *Neurophotonics*, 2(4), 041402.
- Higuchi, S., Ohtsu, H., Suzuki, H., Shirai, H., Frank, G. D., & Eguchi, S. (2007). Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clinical science*, 112(8), 417-428.

Hill, R. A., Tong, L., Yuan, P., Murikinati, S., Gupta, S., & Grutzendler, J. (2015). Regional blood flow in the normal and ischemic brain is controlled by arteriolar smooth muscle cell contractility and not by capillary pericytes. *Neuron*, 87(1), 95-110.

Huang, Y., Grinspan, J. B., Abrams, C. K., & Scherer, S. S. (2007). Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional gap junctions. *Glia*, 55(1), 46-56.

Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D. C., & Scemes, E. (2009). Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels". *Journal of Neuroscience*, 29(21), 7092-7097.

Isasi, E., Korte, N., Abudara, V., Attwell, D., Olivera-Bravo, S. (2019). Glutamic acid affects pericytes contractility and migration: possible implications for GA-1 Pathogenesis. Accepted manuscript. *Molecular neurobiology*

Jain, A. (2014). Endothelin-1: A potential pathological factor in Parkinson's disease? -From endoplasmic reticulum stress to beyond. *Journal of the neurological sciences*, 344(1), 236-237.

Kawamura, H., Oku, H., Li, Q., Sakagami, K., & Puro, D. G. (2002). Endothelin-induced changes in the physiology of retinal pericytes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(3), 882-888.

Kawamura, H., Sugiyama, T., Wu, D. M., Kobayashi, M., Yamanishi, S., Katsumura, K., & Puro, D. G. (2003). ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *The Journal of physiology*, 551(3), 787-799.

Kety, S. S., & Schmidt, C. F. (1948). The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man: theory, procedure and normal values. *The Journal of clinical investigation*, 27(4), 476-483.

Krueger, M., & Bechmann, I. (2010). CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia*, 58(1), 1-10.

Lacar, B., Herman, P., Platel, J. C., Kubera, C., Hyder, F., & Bordey, A. (2012). Neural progenitor cells regulate capillary blood flow in the postnatal subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, 32(46), 16435-16448.

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

Lohman, A. W., & Isakson, B. E. (2014). Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS letters*, 588(8), 1379-1388.

Lohman, A. W., Weaver, J. L., Billaud, M., Sandilos, J. K., Griffiths, R., Straub, A. C., ... & Isakson, B. E. (2012). S-nitrosylation inhibits pannexin 1 channel function. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39602-39612.

Mai S, Irigoyen J, Isasi E, Olivera-Bravo S, Abudara V. (2016) Plasticity of neuron-pericyte interaction mediated by P2X7 receptors and pannexin1 channels. Federation of Latin American and Caribbean Neuroscience – FALAN (2nd Falan Congress), 17 – 21 Oct, Buenos Aires, Argentina.

Matsugi, T., Chen, Q., & Anderson, D. R. (1997). Contractile responses of cultured bovine retinal pericytes to angiotensin II. *Archives of ophthalmology*, 115(10), 1281-1285.

Metea, M. R., & Newman, E. A. (2006). Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *Journal of Neuroscience*, 26(11), 2862-2870.

Mishra, A., O'farrell, F. M., Reynell, C., Hamilton, N. B., Hall, C. N., & Attwell, D. (2014). Imaging pericytes and capillary diameter in brain slices and isolated retinæ. *Nature protocols*, 9(2), 323.

Mishra, A., Reynolds, J. P., Chen, Y., Gourine, A. V., Rusakov, D. A., & Attwell, D. (2016). Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nature Neuroscience*, 19(12), 1619.

Mulligan, S. J., & MacVicar, B. A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature*, 431(7005), 195.

Nortley, R., Mishra, A., Jaunmuktane, Z., Kyrargyri, V., Madry, C., Gong, H., ... & Attwell, D. (2018). Amyloid beta oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signalling to pericytes. *bioRxiv*, 357095.

Ohtsu, H., Suzuki, H., Nakashima, H., Dhobale, S., Frank, G. D., Motley, E. D., & Eguchi, S. (2006). Angiotensin II signal transduction through small GTP-binding proteins: mechanism and significance in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 48(4), 534-540.

Oishi, K., Kamiyashiki, T., & Ito, Y. (2007). Isometric contraction of microvascular pericytes from mouse brain parenchyma. *Microvascular research*, 73(1), 20-28.

Orellana, J., F Figueroa, X., A Sanchez, H., Contreras-Duarte, S., Velarde, V., & C Saez, J. (2011). Hemichannels in the neurovascular unit and white matter under normal and inflamed conditions. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 10(3), 404-414.

Orellana, J. A., Shoji, K. F., Abudara, V., Ezan, P., Amigou, E., Sáez, P. J., ... & Giaume, C. (2011b). Amyloid β -induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels. *Journal of Neuroscience*, 31(13), 4962-4977.

Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., & Lukyanov, S. (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Current biology*, 10(13), R473-R474.

Pannasch, U., Sibille, J., & Rouach, N. (2012). Dual electrophysiological recordings of synaptically-evoked astroglial and neuronal responses in acute hippocampal slices. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (69), e4418.

Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal*, 25(21), 5071-5082.

Penuela, S., Gehi, R., & Laird, D. W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(1), 15-22.

Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P., & Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443(7112), 700.

Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L. L., Louie, S., Cupp, J. E., ... & Dixit, V. M. (2011). Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *The Journal of Immunology*, 186(11), 6553-6561.

Ranno, E., D'Antoni, S., Spatuzza, M., Berretta, A., Laureanti, F., Bonaccorso, C. M., ... & Aronica, E. (2014). Endothelin-1 is over-expressed in amyotrophic lateral sclerosis and induces motor neuron cell death. *Neurobiology of disease*, 65, 160-171.

Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., & Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *science*, 322(5907), 1551-1555.

Rouget, C. (1874). Note sur le developpement de la tunique contractile des vaisseaux. *Compt Rend Acad Sci*, 59, 559-562.

Roy, C. S., & Sherrington, C. S. (1890). On the regulation of the blood-supply of the brain. *The Journal of physiology*, 11(1-2), 85-158.

Sá-Pereira, I., Brites, D., & Brito, M. A. (2012). Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Molecular neurobiology*, 45(2), 327-347

Sáez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D., & Beyer, E. C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiological reviews*, 83(4), 1359-1400.

Sáez, J. C., Contreras, J. E., Bukauskas, F. F., Retamal, M. A., & Bennett, M. V. (2003b). Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. *Acta physiologica Scandinavica*, 179(1), 9-22.

Sosinsky, G. E., Boassa, D., Dermietzel, R., Duffy, H. S., Laird, D. W., MacVicar, B., ... & Thompson, R. J. (2011). Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels*, 5(3), 193-197.

Squire, L., Berg, D., Bloom, F. E., Du Lac, S., Ghosh, A., & Spitzer, N. C. (3rd Ed.). (2008). *Fundamental neuroscience*. Academic Press.

Suadicani, S. O., Iglesias, R., Wang, J., Dahl, G., Spray, D. C., & Scemes, E. (2012). ATP signaling is deficient in cultured Pannexin1-null mouse astrocytes. *Glia*, 60(7), 1106-1116.

Sweeney, M. D., Ayyadurai, S., & Zlokovic, B. V. (2016). Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nature neuroscience*, 19(6), 771.

Takano, T., Tian, G. F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., & Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature neuroscience*, 9(2), 260.

Thompson, R. J., Jackson, M. F., Olah, M. E., Rungta, R. L., Hines, D. J., Beazely, M. A., ... & MacVicar, B. A. (2008). Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. *Science*, 322(5907), 1555-1559.

Tirapelli, C. R., Casolari, D. A., Yogi, A., Montezano, A. C., Tostes, R. C., Legros, E., ... & De Oliveira, A. M. (2005). Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K⁺ channels in ETB-induced relaxation. *British journal of pharmacology*, 146(6), 903-912.

Touyz, R. M., & Berry, C. (2002). Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(9), 1001-1015.

Uesugi, M., Kasuya, Y., Hama, H., Yamamoto, M., Hayashi, K., Masaki, T., & Goto, K. (1996). Endogenous endothelin-1 initiates astrocytic growth after spinal cord injury. *Brain research*, 728(2), 255-259.

Valdez, N. F. (2013). Endotelina-1: vasoconstrictor intrínseco del endotelio vascular. *Revista Med*, 21(2), 42-56.

Whyte-Fagundes, P., & Zoidl, G. (2018). Mechanisms of pannexin1 channel gating and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1860(1), 65-71.

Wynne, B. M., Chiao, C. W., & Webb, R. C. (2009). Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. *Journal of the American Society of Hypertension*, 3(2), 84-95.

Yamadera, M., Fujimura, H., Inoue, K., Toyooka, K., Mori, C., Hirano, H., & Sakoda, S. (2015). Microvascular disturbance with decreased pericyte coverage is prominent in the ventral horn of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 16(5-6), 393-401.

Yemisci, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Vural, A., Can, A., Topalkara, K., & Dalkara, T. (2009). Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nature medicine*, 15(9), 1031

Zhong, Z., Deane, R., Ali, Z., Parisi, M., Shapovalov, Y., O'Banion, M. K., ... & Zlokovic, B. V. (2008). ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nature neuroscience*, 11(4), 420.