



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



**Tesis de grado para la
Licenciatura en Ciencias
Biológicas
Opción
Neurociencias
2019**

**Rol de los canales de
Panexina-1 en la Plasticidad
Sináptica Homeostática**

Marina Tizzoni Duarte

Orientadora:
Nathalia Vitoreira

Laboratorio de ejecución:
Laboratorio de Comunicación Sináptica, Departamento
de Fisiología, Facultad de Medicina

Agradecimientos

A Nathalia, por que más que ser una tutora fue mi segunda madre.

A Beto y Andrea, que me enseñaron y me ayudaron siempre en todo lo que pudieron, compartiendo siempre sus mejores versiones y dando lo mejor de sí mismos.

A Marcela, por toda la buena onda, apoyo y consejos que me brindó en este tiempo.

A Daniel, Natalia y el grupo de Genética de “la isla”, cuya buena onda acompañada de anécdotas mejora los almuerzos.

A la gente de URBE de Facultad de Medicina, por el trabajo que hacen con los animales.

Al Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, que muy amablemente nos permiten utilizar su sala de cultivos.

A Sandra Mai, por la ayuda con los animales Px1 KO.

A Hugo Peluffo por colaborar con materiales de cultivo.

A Marcela Díaz, que siempre está a la orden para ayudar con el Microscopio Confocal del Institut Pasteur de Montevideo.

A mis amigos, con los que tuve la suerte de compartir esta hermosa carrera, y especialmente con los que no, que de todas formas me escucharon hablar mil veces sobre este trabajo y la Facultad.

A mi hermano, por siempre apoyarme en todo y creer en mí (hasta el punto que piensa algún día puedo ganar un premio Nobel!).

A mis padres, por su constante apoyo, por enseñarme que el esfuerzo siempre deja sus frutos e impulsarme a siempre hacer lo que me gusta, sin importar lo que sea.

Índice

Abreviaturas	5
Resumen	7
Introducción.....	8
Sinapsis	8
Sinapsis química	10
<i>Terminal presináptica</i>	11
<i>Hendidura sináptica</i>	11
<i>Terminal postsináptica</i>	12
Sinapsis tripartita y multipartita	13
Fuerza sináptica	14
Plasticidad sináptica	14
Plasticidad de Hebb	15
Plasticidad sináptica homeostática	16
<i>Plasticidad sináptica homeostática postsináptica</i>	18
<i>Plasticidad sináptica homeostática presináptica</i>	19
Canales de panexina	20
Antecedentes específicos	24
Hipótesis	25
Objetivos	25
Objetivo experimental 1	25
Objetivo experimental 2	25
Materiales y Métodos	26
1. <i>Preparación de placas de cultivo</i>	26
2. <i>Obtención de células de hipocampo</i>	26
3. <i>Preparación de monocapas gliales</i>	27
4. <i>Cultivos neuronales</i>	27

4.1 <i>Combinación de co-cultivos</i>	27
5. <i>Tratamientos</i>	27
6. <i>Fijación de células e inmunocitoquímica</i>	28
7. <i>Análisis de la abundancia de vGlut-1 sináptico</i>	28
8. <i>Análisis de la densidad de contactos sinápticos</i>	29
9. <i>Análisis estadístico</i>	30
Resultados	30
Neuronas y astrocitos expresan canales formados por Px1 en cultivos disociados de hipocampo murino	31
Px1 es esencial en el ajuste homeostático de la fuerza sináptica	32
Discusión	39
Px1 se expresa en neuronas y astrocitos en co-cultivos de hipocampo de ratas neonatas	39
Rol de Px1 en la formación y/o mantenimiento de las sinapsis	39
Rol de Px1 en la función presináptica	41
Conclusiones	45
Perspectivas a futuro	46
Anexo	47
Bibliografía	48

Abreviaturas

AMPA: Receptor de α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AraC: Antimitótico citosina- β -D arabinofuranósido

AU: Unidades arbitrarias

Cxs: Canales de conexina

DIV: Días *in vitro*

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

GJ: *Gap junctions* (uniones en hendidura, uniones GAP)

HCS: Hemicanales

ICC: Inmunocitoquímica

KO: *Knock out*

LTD: *Long term depression* (Depresión a largo plazo)

LTP: *Long term potentiation* (Potenciación a largo plazo)

MAP-2: Proteína asociada a microtúbulos 2

NMDAR: Receptor de N-metil-D-aspartato

P0-P1: Día post-natal 0 – día post-natal 1

PA: Potencial de acción

PBS: *Buffer* fosfato salino

PFA: Paraformaldehído

pr: Probabilidad de liberación de neurotransmisores

PSD: Densidad postsináptica

PSH: Plasticidad sináptica homeostática

Px1: Panexina 1

Pxs: Panexinas

P2X₇R: Receptor purinérgico tipo P2X₇

RRP: *Ready releasable pool*

SNC: Sistema nervioso central

TNF- α : *Tumor necrosis factor-alpha*

TTX: Tetrodotoxina

vGlut-1: Transportador vesicular de glutamato 1

VS: Vesículas sinápticas

WT: *Wild type*

Resumen

El Sistema Nervioso tiene la capacidad de cambiar en el tiempo en respuesta a estímulos en el ambiente, a la adaptación sensorial o a procesos de aprendizaje y memoria, entre otros. Estos cambios se traducen como alteraciones en las propiedades intrínsecas de las neuronas involucradas y en el número y fuerza de las conexiones sinápticas, de forma dependiente de la actividad neuronal, permitiendo refinar las propiedades del circuito con la experiencia. Sin embargo, los circuitos neuronales deben ser capaces de equilibrar sus necesidades de cambio con las de estabilidad, ya que estas últimas mantienen la excitabilidad del circuito dentro de un rango fisiológico. Esto puede ser logrado mediante un tipo de plasticidad sináptica conocida como “Plasticidad Sináptica Homeostática” (PSH), la cual a través de mecanismos pre y postsinápticos, tiene la capacidad de cambiar dinámicamente la eficacia de la transmisión sináptica, utilizando mecanismos de retroalimentación negativa. De esta forma, la PSH previene que las neuronas se saturen, alcanzando niveles extremos de daño excitotóxico o un estado comatoso.

Proteínas formadoras de canales transmembrana como la familia de las conexinas (Cxs) y panexinas (Pxs), son componentes principales de la membrana plasmática que determinan tanto la excitabilidad neuronal homeostática, así como en la plasticidad sináptica. Esto se debe a que ambas proteínas se encuentran altamente expresadas tanto por neuronas como glía, donde permiten el pasaje de metabolitos de gran tamaño como el ATP y glutamato. El rol de las Cxs en la PSH, así como en la plasticidad de Hebb ha sido ampliamente estudiado y caracterizado en los últimos años. Estudios recientes revelan la importancia de los panexones en la modulación de la plasticidad de Hebb en el hipocampo murino, sin embargo, el rol de estas proteínas en la PSH continúa siendo una incógnita.

En el presente trabajo, se analizó el rol de los canales formados por Px1 en la PSH presináptica, mediante la utilización de co-cultivos disociados de ratones transgénicos deficientes en la Px1 y ratas como control, herramientas farmacológicas y de detección inmune. De esta forma, podemos comenzar a entender el papel que desempeñan los panexones en la PSH, observando que éstos son imprescindibles para el ajuste homeostático de la densidad sináptica tanto en neuronas como en glía, mientras que para el ajuste de la función presináptica son imprescindibles los panexones neuronales. Asimismo, se plantea la existencia de mecanismos de compensación por parte de las otras isoformas (Px2, Px3), dado que cuando la proteína se encuentra totalmente ausente en el co-cultivo, frente al bloqueo crónico de la actividad del circuito las neuronas son capaces de realizar una compensación homeostática de la función presináptica, pero no así de la densidad de contactos sinápticos.

Introducción

Sinapsis

Las funciones normales del organismo requieren de un eslabón coordinador entre los estímulos recibidos del ambiente externo y la generación de respuestas integradas. Existen dos sistemas coordinadores, el sistema endocrino y el sistema nervioso.

Las células del sistema nervioso pueden dividirse en: nerviosas o gliales, encontrándose estas en proporciones similares. Se estima que el encéfalo humano contiene por lo menos 10^{11} neuronas, cada una con la capacidad de influir en muchas otras células (Azevedo *et al.*, 2009). De esta forma, se requieren mecanismos complejos y altamente eficientes para hacer posible la comunicación entre estos elementos. Esta comunicación se logra a través de las *sinapsis*, término acuñado por Sherrington para definir los contactos funcionales entre neuronas, o bien entre una neurona presináptica y otra célula excitable postsináptica (Foster & Sherrington, 1897). Estas uniones median la comunicación entre ambas células permitiendo que las señales se propaguen con gran precisión espacial y temporal, lo cual es fundamental para diversos procesos cognitivos, entre ellos, el aprendizaje y la memoria (Südhof, 2012).

En función del mecanismo utilizado en la transferencia de información, las sinapsis se clasifican en dos grandes grupos: *eléctricas*, modelo propuesto por Furshpan y Potter (Furshpan & Potter, 1958), donde la corriente eléctrica se transmite directamente; y *químicas*, modelo propuesto por Loewi (Loewi & Navratil, 1924), donde la transmisión de información se da a través de un mensajero químico (Figura 1, Tabla 1). Ambas modalidades coexisten en la mayoría de las estructuras nerviosas.

La transmisión eléctrica entre dos neuronas está mediada por uniones en hendidura (UH) o uniones GAP (*gap junctions*, GJ) que consisten en canales intercelulares que comunican directamente el citoplasma de dos células adyacentes, posibilitando el pasaje bidireccional de corrientes eléctricas y pequeñas moléculas, como el Ca^{2+} , AMP_c e IP3 (Figura 1B, Tabla 1). Las uniones GAP constituyen el sustrato morfológico de las sinapsis eléctricas, y se forman por el ensamblaje de dos hemicanales hexaméricos de conexina denominados conexones, cada uno de ellos aportado por una de las células adyacentes. La familia génica de las conexinas posee al menos 20 genes en mamíferos, siendo la Cx36 la conexina predominantemente expresada en neuronas de mamíferos (Pereda, 2014).

A diferencia de lo que ocurre en la transmisión eléctrica, en las sinapsis químicas no existe continuidad citoplasmática entre las neuronas pre y post-sinápticas, sino que

éstas se encuentran separadas por la hendidura sináptica con una distancia de entre 20–40nm (Figura 1A, Tabla 1). La comunicación entre ambas células ocurre ante la llegada de un potencial de acción (PA) a la célula presináptica, la cual en respuesta a un influjo de Ca^{2+} a la terminal presináptica desencadena la liberación de un agente químico denominado neurotransmisor a la hendidura sináptica. Éste agente actúa sobre receptores específicos anclados a la membrana postsináptica generando así cambios en el potencial de membrana postsináptico; estos cambios pueden desencadenar la generación de un PA postsináptico. En este trabajo nos enfocaremos en este tipo de neurotransmisión mediada por mensajeros químicos.

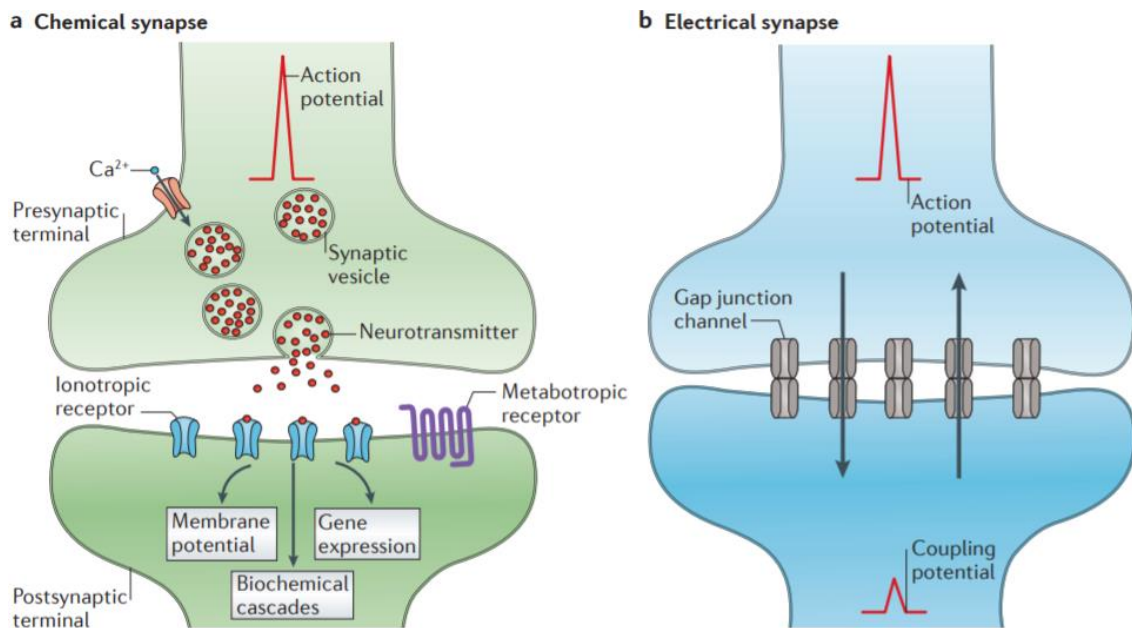


Figura 1. Las dos modalidades principales de transmisión sináptica. (A) La transmisión química requiere de una maquinaria molecular presináptica sofisticada que regule la liberación de neurotransmisores de forma probabilística frente a la despolarización de la terminal presináptica (en este caso, frente a la llegada de un potencial de acción), lo cual produce la activación de canales de Ca^{2+} operados por voltaje. Se requiere, además, una maquinaria molecular postsináptica de similar complejidad. Esto incluye tanto la presencia de receptores ionotrópicos como metabotrópicos específicos para el neurotransmisor capaces de detectar y traducir el mensaje presináptico en una diversidad de eventos postsinápticos que amplifican la señal presináptica. **(B)** La transmisión eléctrica es mediada por un clúster de canales intercelulares denominados uniones GAP, los cuales conectan el interior de dos células adyacentes, permitiendo el pasaje bidireccional de corrientes eléctricas producidas por iones (flechas) como también por mensajeros intracelulares y pequeños metabolitos (no ilustrados). Tomado de Pereda, 2014.

Tabla 1. Distinguiendo las propiedades de las sinapsis químicas y eléctricas. Obtenido de Kandel *et al.*, 2013.

SINAPSIS	QUÍMICA	ELÉCTRICA
DISTANCIA ENTRE LAS MEMBRANAS PRE Y POSTSINÁPTICAS	20 – 40 nm	4 nm
EXISTE CONTINUIDAD CITOPASMÁTICA ENTRE LA CÉLULA PRE Y POSTSINÁPTICA?	No	Si
COMPONENTES ULTRA-ESTRUCTURALES	Vesículas presinápticas, zonas activas, receptores postsinápticos	Canales de unión en hendidura (<i>gap junctions</i>)
AGENTE DE TRANSMISIÓN	Transmisores químicos	Corriente iónica
LATENCIA SINÁPTICA	Al menos 0,3ms, usualmente 1 – 5 ms o más	Virtualmente ausente
DIRECCIONALIDAD DE LA TRANSMISIÓN DE INFORMACIÓN	Unidireccional	Usualmente bidireccional

Sinapsis química

La transmisión química requiere una maquinaria molecular presináptica sofisticada que regule la liberación de neurotransmisores de forma probabilística cuando un PA invade la terminal sináptica. Esta transmisión también necesita una maquinaria molecular postsináptica de similar complejidad, dentro de las cuales se incluyen receptores operados por ligando del tipo a) ionotrópicos, que median acciones sinápticas rápidas ya que ellos mismos son un canal iónico y b) metabotrópicos, cuya activación influye indirectamente, mediante mensajeros secundarios, sobre la apertura o cierre de canales iónicos (Figura 1A). Estos canales median respuestas más lentas o bien actúan como moduladores de respuestas ya puestas en marcha. Esta diversidad de receptores permite que las sinapsis químicas se adapten a diversos requerimientos funcionales (Pereda, 2014).

La neurotransmisión en las sinapsis químicas se basa en una elaborada secuencia de eventos que se describen a continuación tomando como referencia una neurona piramidal glutamatérgica de hipocampo. El proceso se inicia cuando un PA

invade la terminal presináptica de la neurona, despolarizándola. El cambio que se produce en el potencial de membrana provoca la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes enriquecidos en la membrana presináptica. Debido a que existe un gradiente de Ca^{2+} a ambos lados de la membrana presináptica, la apertura de estos canales genera un rápido incremento de la concentración intracelular para este ion provocando que las VS se fusionen con la membrana presináptica y liberando el neurotransmisor a la hendidura sináptica (Llinás, 1982; Llinás *et al.*, 1981).

A continuación, reconoceremos en detalle la fisiología de la sinapsis química: la presinapsis, la hendidura sináptica y la postsinapsis.

Terminal presináptica

Se trata de una región especializada del axón presente en la neurona presináptica desde donde ocurre la liberación del neurotransmisor a partir de vesículas sinápticas (VS), conteniendo típicamente cada terminal entre 100 y 200 VS, donde a su vez, cada una de éstas, almacena miles de moléculas neurotransmisoras (Figura 1A) (Kandel *et al.*, 2013). En ella es posible distinguir una región denominada zona activa, la cual se define como un área especializada de la membrana plasmática presináptica donde las vesículas sinápticas que contienen el neurotransmisor se encuentran ancladas y listas para ser liberadas (Harris & Weinberg, 2012). A este conjunto de VS se las denomina "*ready releasable pool*" (RRP). Asimismo, existen otros dos grupos de VS distribuidas en la terminal presináptica, estas componen el "*pool* de reciclaje" y el "*pool* de reserva" (Harris & Weinberg, 2012). Estos *pools* presentan capacidades diferentes de exocitosis, donde el RRP es liberado inmediatamente dado que se encuentra pronto para la liberación, el *pool* de reciclaje es el encargado de reponer el RRP durante la estimulación fisiológica, mientras que el *pool* de reserva se libera únicamente durante la estimulación intensa (Harris & Weinberg, 2012; Rizzoli & Betz, 2005).

La fusión de las VS produce la adición de nueva porción de membrana a la membrana de la terminal presináptica, pero ésta no es permanente. Así, luego de la exocitosis, las VS sufren endocitosis y se reciclan, siendo nuevamente cargadas con el neurotransmisor específico y formando parte de un nuevo ciclo de liberación.

Hendidura sináptica

Se trata del espacio estructuralmente organizado que separa las neuronas pre y post-sinápticas, cuyo ancho se encuentra entre los 20 - 40nm, donde es liberado el

neurotransmisor (Figura 1A). Este espacio se encuentra altamente enriquecido en moléculas de adhesión asociadas a las membranas pre y post-sinápticas, encargadas de guiar la sinaptogénesis y modular la maduración sináptica, así como la neurotransmisión (Biederer *et al.*, 2017). En la hendidura sináptica también se encuentran componentes de la matriz extracelular, que interactúan con moléculas de adhesión, receptores y canales iónicos, y participan en el desarrollo y regeneración del SNC, así como en procesos de plasticidad sináptica (Dityatev & Schachner, 2003; Perez de Arce *et al.*, 2015).

Terminal postsináptica

El neurotransmisor liberado a la hendidura sináptica, se une a receptores anclados en la membrana plasmática postsináptica regulando directa o indirectamente la apertura de canales iónicos. Se denomina densidad postsináptica (PSD) al complejo macromolecular de señalización anclado en la membrana postsináptica contrapuesta a la zona activa. La PSD es particularmente prominente en sinapsis glutamatérgicas excitadoras, y es fácilmente detectable por microscopía electrónica como una zona de material electrodensito debido al alto contenido de proteínas (Holderith *et al.*, 2012). En este tipo de contacto sináptico, el contenido de macromoléculas de la PSD incluye receptores del tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazol propiónico (AMPA), moléculas de andamiaje (PSD-95, proteína asociada a sinapsis 97, Shank y Homer) (Chen *et al.*, 2005; Dani *et al.*, 2010), protein kinasas, fosfatasas y componentes del citoesqueleto. Los receptores son altamente dinámicos y continuamente ciclan hacia adentro y afuera de la sinapsis, a través de mecanismos regulados de difusión lateral rápida a lo largo de la membrana, intercambios entre los sitios extra e intrasinápticos, y el tráfico mediado por ciclos de endocitosis-exocitosis entre los *pools* intracelular y la superficie de membrana (Choquet & Triller, 2013).

Como consecuencia de la unión del neurotransmisor al receptor, se originará una excitación o una inhibición lo cual dependerá del receptor activado. Así, la activación de receptores específicos desencadenará una despolarización de la membrana postsináptica generando un potencial postsináptico excitador (PPSE) o una hiperpolarización, alejando a la célula de su umbral de disparo y generando un potencial postsináptico inhibitorio (PPSI). De esta forma, generalmente los PPSE resultan de la apertura de canales de Na^+ químicamente excitables, donde la entrada de Na^+ conduce a una disminución en la polaridad de la membrana. Por otro lado, habitualmente los PPSI resultan de la actividad de ciertos neurotransmisores sobre canales de Cl^- o de K^+ , cuyos potenciales de equilibrio son aún más negativos que el potencial de membrana

en reposo, y por lo tanto, la apertura de estos canales hiperpolariza la membrana (Kandel *et al.*, 2013; Purves *et al.*, 2004).

En general existe una latencia sináptica de aproximadamente 0,6 ms (Lisman *et al.*, 2007). Pese a la lentitud que tienen en comparación con las sinapsis eléctricas, las sinapsis químicas poseen la propiedad de amplificación. Dado que apenas un reducido número de moléculas de neurotransmisor son capaces de activar a un receptor, la descarga de una única vesícula sináptica puede desencadenar la apertura de miles de canales iónicos, que son capaces de despolarizar a una célula postsináptica grande (Kandel *et al.*, 2013; Purves *et al.*, 2004).

Sinapsis tripartita y multipartita

Cabe destacar que en los últimos años se produjo un cambio de paradigma en torno al rol que desempeñan las células gliales en el SNC. Estas eran vistas como simples células de soporte y nutrición neuronal, sin embargo, actualmente se plantea que las mismas contribuyen al desarrollo del sistema nervioso, la sinaptogénesis, la modulación de la eficiencia de las conexiones sinápticas excitadoras en el hipocampo, en particular, en la plasticidad de Hebb, sugiriendo que estas células participan activamente en el procesamiento y almacenamiento de la información sináptica (Letellier *et al.*, 2016; Perea & Araque, 2007; Stan *et al.*, 2010). Según este nuevo paradigma, los astrocitos surgen como socios activos de las neuronas presinápticas y postsinápticas durante la transmisión de la información, dando lugar al concepto actual de sinapsis tripartita (Pascual *et al.*, 2005; Perea & Araque, 2010). Este concepto se basa en la habilidad de los astrocitos de responder a la liberación de neurotransmisores durante la actividad neuronal, liberando sustancias neuroactivas denominadas gliotransmisores que influyen la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica. Estudios recientes realizados en cultivos disociados de corteza cerebral sugieren la importancia de factores liberados por astrocitos para la inducción de plasticidad neuronal (Steinmetz & Turrigiano, 2010; Stellwagen & Malenka, 2006).

En los últimos años, la matriz extracelular presente en la hendidura sináptica y la microglía cercana a la zona sináptica se han incluido dentro de los componentes sinápticos, por lo cual, el concepto de sinapsis tripartita ha evolucionado hacia una visión más amplia que incluye un conjunto sináptico de múltiples partes, donde existen relaciones multidireccionales complejas entre todos los componentes: las terminales pre y postsinápticas, el proceso perisináptico del astrocito, la microglía y la matriz extracelular (Nimmerjahn *et al.*, 2005; Verkhratsky & Nedergaard, 2014; Wu *et al.*, 2015).

Fuerza sináptica

La eficacia de la transmisión sináptica, es decir, la fuerza sináptica, puede definirse como la cantidad promedio de corriente o la amplitud del cambio de voltaje producido en la neurona postsináptica por un PA en la neurona presináptica (Murthy, 1998). De manera simplificada, la fuerza sináptica entre dos neuronas depende fundamentalmente del producto de tres factores: el número de contactos sinápticos o de sitios activos de liberación (n), la probabilidad de liberación del neurotransmisor en cada sinapsis (pr) y el tamaño de la respuesta postsináptica causada por la liberación de neurotransmisor desde una única VS (denominado tamaño quantal, q) (Branco & Staras, 2009; Burrone & Murthy, 2003; Del Castillo & Katz, 1954).

De esta forma, $F_{\text{sináptica}} = pr \cdot n \cdot q$

La pr es una consecuencia de la naturaleza estocástica inherente de los procesos que llevan a la exocitosis de las VS (Südhof, 2004). Para cada PA, hay una cierta probabilidad de que ocurra la liberación de neurotransmisor, que define la confiabilidad de una sinapsis en transmitir la señal y determina la fuerza sináptica promedio (Del Castillo & Katz, 1954). En las sinapsis del SNC, a diferencia de la unión neuromuscular (NMJ), la pr es relativamente baja, por ejemplo, en el hipocampo es de 0,3 en promedio, si bien existe gran variabilidad entre los botones sinápticos (Dobrunz & Stevens, 1997; Murthy *et al.*, 1997).

Por tanto, la transmisión sináptica es más eficaz si n , pr o q aumentan. Generalmente, un aumento de n o pr indica un mecanismo presináptico, mientras que un aumento de q se vincula a un mecanismo postsináptico, como un incremento en el número y/o sensibilidad de los receptores postsinápticos (Bekkers & Stevens, 1990).

En el presente trabajo, estimaremos cambios en la fuerza sináptica centrándonos en mecanismos presinápticos que modifican tanto la pr como n (ver Materiales & métodos, *Procesamiento de imágenes*).

Plasticidad sináptica

La eficacia de la transmisión sináptica puede ser modificada por períodos cortos o largos, una propiedad denominada plasticidad sináptica. Dicha modificación funcional puede ser efectuada por señales intrínsecas o extrínsecas. Un ejemplo de señal intrínseca es una alta tasa de disparo, mientras que las señales extrínsecas incluyen las entradas sinápticas directas desde otras neuronas.

Para lograr el complejo procesamiento de la información que deben realizar los circuitos neuronales es esencial que las sinapsis puedan ser modificadas tanto a nivel estructural como funcional. Se pueden evidenciar dos grandes formas de plasticidad en función del tiempo de duración de los cambios en la eficiencia sináptica:

1. Plasticidad a corto plazo, la cual ocurre durante milisegundos a minutos y permite a las sinapsis realizar funciones computacionales críticas en los circuitos neuronales. Ejemplos clásicos de este tipo de plasticidad son la facilitación, incremento, potenciación post-tetánica, depresión, entre otros (Colino *et al.*, 2002).

2. Plasticidad a largo plazo, la cual involucra cambios que duran horas hasta varios días. Dentro de ésta se encuentra la plasticidad de Hebb y la Plasticidad Sináptica Homeostática (PSH), que se diferencian en el tiempo que lleva la inducción y la expresión de los cambios, siendo rápidos en la primera (minutos, horas) y lentos en la segunda (horas, días).

En este trabajo, nos enfocaremos en los cambios plásticos que ocurren a largo plazo centrándonos principalmente en la PSH.

Plasticidad de Hebb

Hebb propuso un mecanismo basado en la plasticidad sináptica como sustrato para la memoria, estableciendo un sistema compuesto por dos células que se encuentran conectadas por sinapsis excitadoras, donde la activación de una célula lleva a la activación de una segunda célula, provocando que la conexión entre ambos componentes se refuerce (Hebb, 1949; Hugarir & Nicoll, 2013; Luscher & Malenka, 2012; Malenka & Bear, 2004). Incluye procesos de potenciación a largo plazo (LTP), así como de depresión a largo plazo (LTD). Es la forma de plasticidad a largo plazo dependiente de actividad más estudiada, y se conocen los mecanismos moleculares necesarios para provocar el cambio (inducción), seguido de mecanismos para la expresión (durante horas) y el mantenimiento (días) (Lüscher & Malenka, 2012).

Debido a que estas características distintivas facilitan el reforzamiento de ciertas conexiones sinápticas, siendo esto fundamental para el correcto almacenamiento de la información en el cerebro, se cree que estos mecanismos Hebbianos permiten que las propiedades de un circuito dado se refinan con la experiencia, siendo la base de procesos de memoria y aprendizaje. Sin embargo, el requerimiento de actividad correlativa entre una pre-sinapsis y una post-sinapsis para reforzar la conexión provoca mecanismos de *feedback* positivos dependientes de la actividad (Figura 2A). A medida

que la actividad correlativa de la pre y post-sinapsis refuerza conexiones sinápticas específicas, la neurona post-sináptica tendrá una fuerza sináptica mayor, de forma que los inputs pre-sinápticos que estaban poco correlacionados con el disparo de dicha post-sinapsis, podrán ahora desencadenar la activación de la post-sinapsis más fácilmente (Figura 2B) (Turrigiano, 2008). Por lo tanto, la generación de mecanismos de *feedback* positivos sin restricción conllevan a que eventualmente la actividad alcance un estado propenso a la hiperexcitabilidad (Cooper & Bear, 2012; Turrigiano, 2008; Turrigiano & Nelson, 2000; Vituriera & Goda, 2013).

Asimismo, luego de inducida la LTD, aquellas sinapsis deprimidas podrán someterse más fácilmente a mayor LTD, lo cual, ocurriendo sin restricciones, podría provocar un silenciamiento patológico de las sinapsis o incluso su eliminación (Collingridge *et al.* 2010; Cooper & Bear, 2012; Vituriera & Goda, 2013).

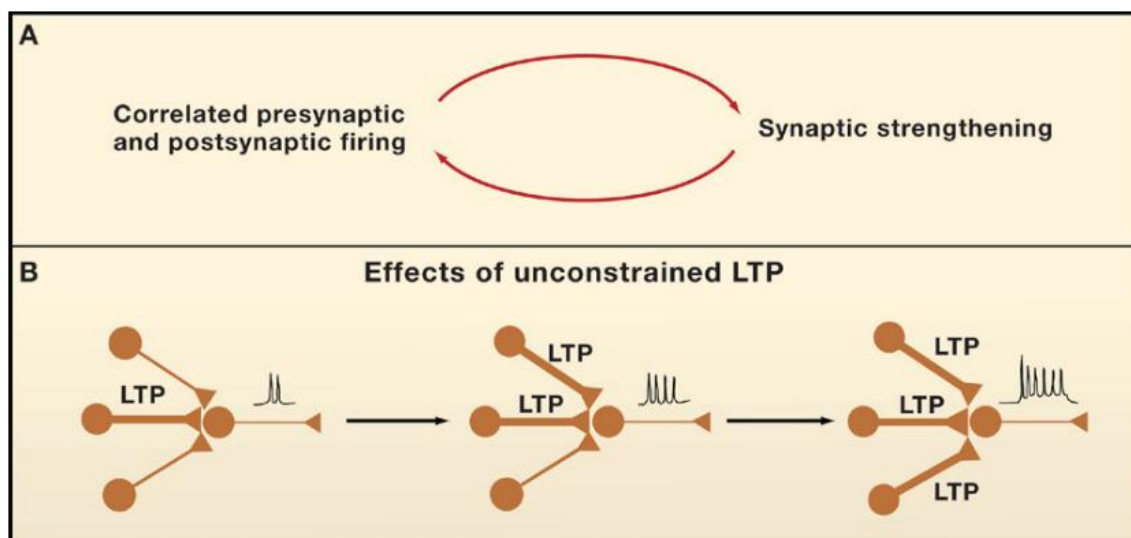


Figura 2. Ciertos mecanismos de potenciación sináptica son potencialmente desestabilizadores. (A) El disparo pre y post-sináptico correlativo induce potenciación a largo plazo (LTP), lo que permite que la neurona pre-sináptica impulse a la neurona post-sináptica con mayor fuerza. Esto aumenta la correlación entre la activación pre y post-sináptica, lo cual produce mayor LTP, generando un ciclo de *feedback* positivo. **(B)** La generación de LTP sin restricciones provoca la pérdida de especificidad sináptica, ya que la inducción del LTP impulsa a la neurona post-sináptica con mayor fuerza, volviendo así más fácil que otros inputs logren que la neurona post-sináptica dispare, de forma que éstos comienzan a desarrollar LTP. Imagen recuperada de Turrigiano, 2008.

Plasticidad sináptica homeostática

Con el fin de prevenir el componente desestabilizador de la plasticidad de Hebb en la función de los circuitos neuronales, las neuronas deben ser capaces de percibir su propia excitabilidad, pudiendo desencadenar mecanismos homeostáticos que compensen las perturbaciones de la actividad sináptica manteniéndolas dentro de un

rango fisiológico dinámico. Recientemente se ha identificado un tipo de plasticidad sináptica denominada “Plasticidad Sináptica Homeostática” (PSH), la cual estabiliza la actividad de una neurona o de un circuito neuronal para enfrentar cambios en la densidad sináptica y/o en la intensidad de la respuesta sináptica que puedan alterar la excitabilidad del circuito. La PSH incluye mecanismos pre y post-sinápticos (Figura 3). Por ejemplo, la eficacia de la neurotransmisión puede ajustarse mediante mecanismos presinápticos que incluye tanto modificaciones en la probabilidad de liberación de neurotransmisores (pr), así como el número de contactos sinápticos (n), en una dirección compensatoria a los cambios en la actividad del circuito. Por otra parte, el ajuste de la función postsináptica dependiente de actividad, requiere de cambios en la abundancia de receptores del tipo AMPA en la superficie sináptica (Vitureira & Goda, 2013).

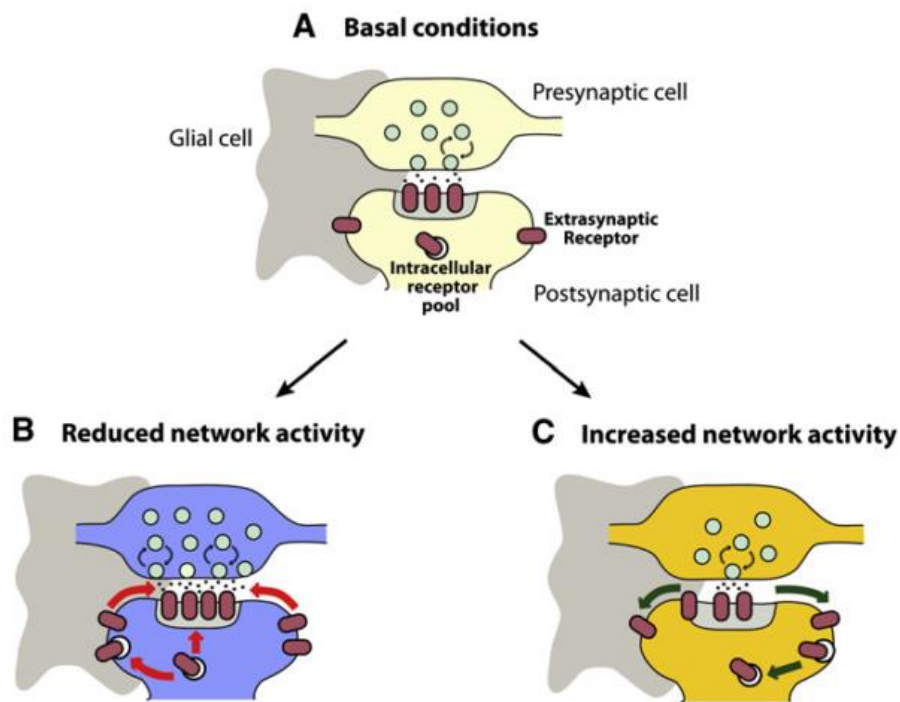


Figura 3. Esquema básico de la plasticidad sináptica homeostática en una sinapsis excitadora. (A) Condiciones basales. La transmisión sináptica está mediada a través de la liberación de neurotransmisores desde la terminal presináptica con una subsecuente activación de los receptores en la célula postsináptica. La fuerza sináptica está determinada por la eficacia tanto de la liberación de los neurotransmisores en la presinapsis, como la abundancia de sus receptores específicos en la postsinapsis. **(B)** La actividad neuronal presinápticamente reducida (mediante el bloqueo crónico con TTX), es compensada mediante un incremento en el reciclaje de vesículas, el número de vesículas ancladas en la terminal y la probabilidad de liberación de neurotransmisores. Postsinápticamente, se incorporan receptores de neurotransmisores adicionales mediante mecanismos de difusión lateral y exocitosis intracelular. **(C)** O, por el contrario, para compensar un aumento en la actividad neuronal, las neuronas presinápticas disminuyen la probabilidad de liberación de neurotransmisores, mientras que la célula postsináptica reduce el número de receptores mediante mecanismos de endocitosis o

difusión lateral. Imagen recuperada de Pozo & Goda, 2010.

Diversas formas de regulación homeostática mantienen controlada la eficiencia de las conexiones, entre otras, la variación en el número de contactos sinápticos establecidos (Pozo & Goda, 2010); la regulación de la fuerza sináptica excitadora y/o inhibitoria (Turrigiano & Nelson, 2004); así como la alteración de las conexiones sinápticas entre neuronas, o el ajuste de las propiedades eléctricas intrínsecas dadas por las conductancias voltaje dependientes tanto entrantes como salientes (Desai, 2004; Marder & Goaillard, 2006). La PSH debe ser capaz de sensar algún aspecto común de la actividad sináptica, indistintamente del método de regulación que se implemente. Debe además, poder integrar esta información en un lapso de tiempo largo (minutos a horas) en comparación con el tiempo que requiere la transferencia de información (milisegundos a minutos), manteniéndose cercano a un valor de referencia mediante el ajuste de las propiedades sinápticas (Turrigiano, 2008).

Una actividad neuronal estable y flexible es fundamental para la función apropiada del cerebro, formando una interfaz dinámica entre mecanismos de PSH y plasticidad de Hebb (Vitureira & Goda, 2013). A pesar que ambas formas de plasticidad son estudiadas de forma independiente, es probable que compartan parcialmente los mecanismos moleculares que regulan efectores comunes sinápticos (Arendt *et al.* 2013; Cooper & Bear, 2012; Pozo & Goda, 2010; Thiagarajan *et al.* 2007; Vitureira & Goda, 2013).

La PSH está mediada por el ajuste compensatorio de la función tanto pre como postsináptica; la contribución de cada uno de estos componentes depende de varios factores, como la edad del cultivo, el tipo celular o tejido estudiado.

Plasticidad sináptica homeostática postsináptica

La forma más estudiada de PSH en las sinapsis excitadoras del SNC se denomina *synaptic scaling*, y ocurre a través de la activación de mecanismos postsinápticos que involucran el ajuste compensatorio de la abundancia de AMPAR. Las primeras evidencias del *synaptic scaling* fueron obtenidas *in vitro* en cultivos de neuronas corticales, hipocámpales y de médula espinal, a través de manipulaciones farmacológicas que modificaban la actividad neuronal de forma crónica (Lissin *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 1998; Turrigiano *et al.*, 1998). En particular, el bloqueo prolongado de la descarga neuronal (aplicando tetrodotoxina – TTX bloqueante específico de canales de Na⁺ voltaje-dependientes) o la inhibición de los receptores de glutamato (CNQX, antagonista de los AMPAR), o el aumento de la actividad, inducida por el bloqueo de la transmisión inhibitoria (mediante bicuculina, antagonista de receptores

GABA_A), produce un aumento o una disminución compensatoria de las corrientes mediadas por AMPAR, respectivamente (Figura 4). Otros mecanismos de PSH postsináptica incluyen proteínas de la PSD, la liberación de factores solubles tanto por neuronas como por células gliales adyacentes, proteínas de adhesión sinápticas, entre otras (Fernandes & Carvalho, 2016).

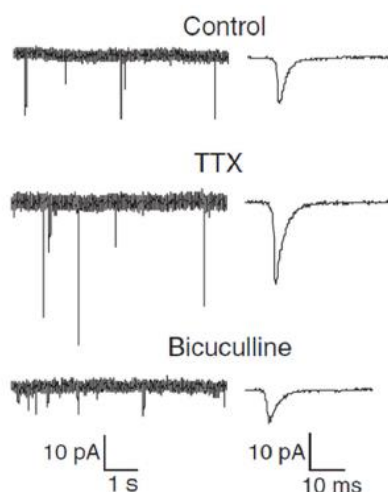


Figura 4. La amplitud de los mEPSC aumenta en presencia de TTX, mientras que disminuye frente a la aplicación de bicuculina. Se muestran registros representativos de los mEPSC de cultivos control y de cultivos en presencia de TTX y bicuculina por 48hs. A la izquierda los datos sin procesar; a la derecha, la forma de la onda del promedio de mEPSC de la neurona de la izquierda. Tomado de Turrigiano *et al.*, 1998.

Por otro lado, en experimentos realizados en cultivos hipocámpales y de la corteza visual jóvenes (≤ 14 DIV), la PSH inducida por inactividad crónica es exclusivamente postsináptica, y a medida que el circuito madura emerge la expresión presináptica de PSH (Wierenga *et al.*, 2006).

Plasticidad sináptica homeostática presináptica

La PSH presináptica se refiere al ajuste homeostático de la liberación del neurotransmisor. Se trata de un fenómeno robusto y altamente conservado, sin embargo, los mecanismos moleculares están comenzando a emerger recientemente. Las evidencias provienen principalmente de estudios realizados en la unión neuromuscular (*neuromuscular junction*) de *Drosophila* y en cultivos disociados de mamíferos. Distintas evidencias sugieren que la modulación homeostática de la liberación presináptica implica un aumento en la entrada de Ca²⁺ presináptica a través de los canales Cav2.1 (el único canal responsable de la transmisión sináptica en la NMJ de *Drosophila*) (Müller & Davis, 2012), así como un aumento del número de VS en el RRP (Muller *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2011).

Asimismo, se evidenció que la expresión del transportador vesicular de glutamato 1 (vGlut-1) en la terminal presináptica está incrementada frente al bloqueo crónico de la actividad, lo que ha sugerido la posibilidad que, además del aumento en los receptores postsinápticos, las neuronas también podrían cargar con más neurotransmisor cada VS y ambos procesos podrían colaborar en el aumento de la amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura (mEPSCs) (De Gois *et al.*, 2005; Erickson *et al.*, 2006; Turrigiano, 2012; Vituriera *et al.*, 2012).

Proteínas formadoras de canales transmembrana como la familia de las conexinas (Cxs) y panexinas (Pxs), son componentes principales que determinan tanto la excitabilidad neuronal homeostática, así como en la plasticidad sináptica. Esto se debe a que ambas proteínas se encuentran altamente expresadas tanto por neuronas como glía, facilitando la propagación lenta de las ondas de Ca^{2+} astrocitarias y permitiendo el pasaje de grandes metabolitos como el ATP y glutamato (Dahl, 2015; Giaume *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2008).

El rol de las Cxs en la PSH ha sido ampliamente estudiado y caracterizado en los últimos años, sin embargo, el rol de las Pxs continúa siendo una incógnita.

Canales de panexina

Neuronas y células gliales del SNC expresan canales formados por subunidades proteicas de panexinas, las cuales poseen cuatro dominios transmembrana con dominios citoplasmáticos N- y C-terminales y grupos cisteína en los dos bucles extracelulares (Figura 5) (Shestopalov & Panchin, 2008).

En mamíferos, las Pxs operan fundamentalmente como canales de membrana (panexones), ya que sus residuos glicosilados impiden el ensamblaje de dos panexones para formar una GJ (Bruzzone *et al.*, 2003), razón por la que actualmente se abandonó el término de hemicanales para los canales de panexina. La única evidencia de GJ formados por Pxs fueron estudios realizados en sistemas de sobre-expresión en líneas celulares, los cuales arrojaron propiedades distintas de las GJ formadas por Cxs (Bruzzone *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2007; Sahu *et al.*, 2014).

Los vertebrados expresan las panexinas 1–3 (Figura 6); la Px1 forma panexones en neuronas piramidales del hipocampo y astrocitos, los cuales se abren a potenciales de membrana negativos y a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} (Barbe *et al.*, 2006; Orellana *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2008). Los canales de Px1 expresados a nivel de la membrana postsináptica neuronal, pueden activarse además por los receptores de

tipo NMDA (Huang & Trussel, 2008; Thompson, 2006). La Px2 se expresa en el cerebro, y junto con Px1 son particularmente abundantes en la corteza, hipocampo, tálamo reticular, neuronas motoras del tallo cerebral y mesencéfalo, el núcleo supraóptico y supraquiasmático del hipotálamo y el cerebelo. En el hipocampo, se encuentran altamente expresadas tanto en neuronas piramidales e interneuronas (Barbe *et al.*, 2006). Por otro lado, la Px3 está fundamentalmente expresada en hueso, cartílago, músculo esquelético, y piel, no detectándose su expresión en el hipocampo murino (Bruzzone *et al.*, 2003; Penuela *et al.*, 2013).

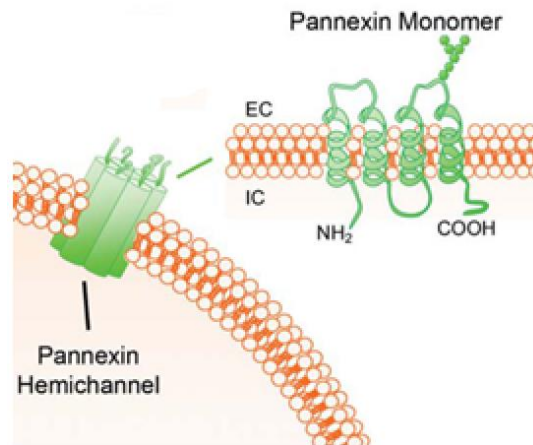


Figura 5. Organización estructural de panexinas. Cada subunidad posee cuatro dominios transmembrana conectados entre sí a través de un dominio intracelular y dos *loops* extracelulares. Tanto el extremo carboxilo como el amino se extienden hacia el citoplasma. La cola carboxi-terminal es el sitio de modificaciones regulatorias y fosforilación. La N-glicosilación del segundo *loop* extracelular impide el ensamblaje de uniones de hendidura funcionales. Imagen recuperada y modificada de Lapato & Tiwari-Woodruff, 2017.

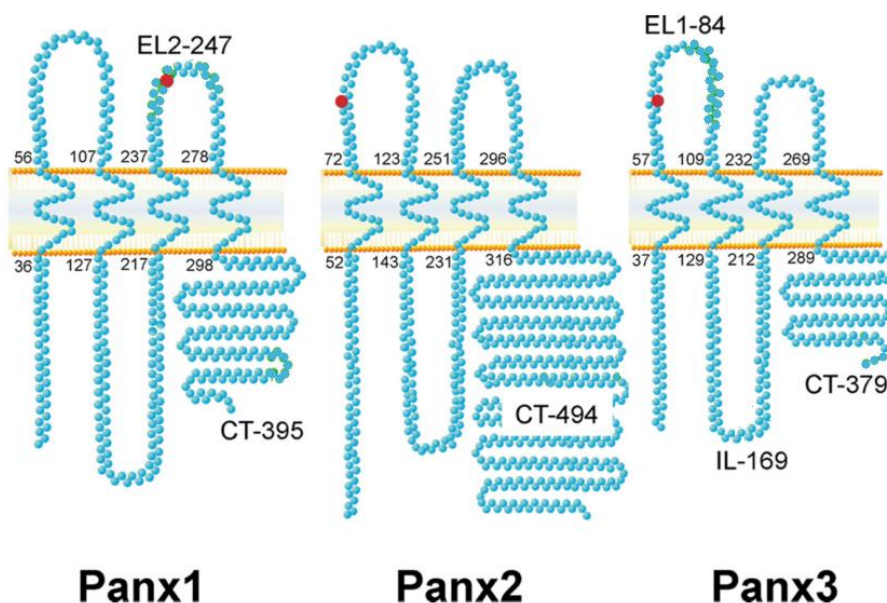


Figura 6. Estructura transmembrana de la familia de panexinas murinas. Los números indican la posición aminoacídica de los cuatro dominios transmembrana. Los sitios consenso de N-glicosilación se encuentran señalados en rojo. CT, extremo carboxi-terminal; EL,

loop extracelular; IL *loop* intracelular. Imagen recuperada de Penuela *et al.*, 2009.

Por otra parte, la expresión de panexinas es edad dependiente, siendo Px1 más abundante durante el desarrollo neuronal temprano, mientras que Px2 es más abundante en etapas más adultas (Ardiles *et al.*, 2014; Bond & Naus, 2014).

Las propiedades estructurales y biofísicas de esta familia aún permanecen elusivas y controversiales, mayoritariamente debido al descubrimiento reciente de estos canales. Sin embargo, se ha reportado que la conductancia unitaria de los canales de Px1 se encuentra en un intervalo de 70-550 pS (Cheung *et al.*, 2014); los residuos 3-7, 10 y 12 del extremo amino, 58-62 del primer segmento transmembrana y 414-426 del extremo carboxilo constituyen el revestimiento del poro (Wang & Dahl, 2010), siendo su diámetro externo de aproximadamente 17-21Å (29.5-30.5Å para Px2) (Ambrosi *et al.*, 2010). El extremo carboxi-terminal bloquea el canal de Px1 a través de un mecanismo de “bola y cadena” (Chiu *et al.*, 2014).

En ensayos de Western blot las Pxs se presentan en tres bandas, las cuales representan tres formas distintas de las proteínas de acuerdo a su grado de glicosilación: Gly-0 representa el estado sin glicosilar (las tres isoformas de la proteína pueden encontrarse en este estado), Gly-1 es el estado de alta manosa (presente en Px1, estado predominante para Px2) y Gly-2, que representa el complejo de especies glicosiladas (estado predominante para Px1 y Px3). Px1 puede viajar hasta la membrana plasmática en cualquiera de sus tres estados, sin embargo, el estado Gly-2 es el predominante entre las tres especies, mientras que Gly-1 refiere mayoritariamente a proteínas asociadas al retículo endoplasmático (Penuela *et al.*, 2014). Los oligómeros de Pxs se trasladan desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi. Este transporte es llevado a cabo por la proteína COPII y se piensa que también es la encargada de mediar el transporte de Px1 hacia la superficie celular, siendo su vida media inferior a 4 horas (Penuela *et al.*, 2014).

La apertura de los canales de Pxs ha sido considerada deletérea, teniendo lugar bajo condiciones patológicas como isquemia, produciendo muerte celular excitotóxica. Sin embargo, recientemente se ha visto que la apertura de estos canales podría estar vinculada a actividades fisiológicas, incluyendo la señalización parácrina, a través de la activación de conexones y/o panexones seguido de la liberación de moléculas de ATP al espacio extracelular (Bennett & Zukin, 2004). A su vez, el ATP liberado puede actuar sobre receptores presentes tanto en neuronas como glia, pudiendo activar en esta última receptores purinérgicos del tipo P2Y o P2X, provocando una liberación de Ca²⁺ desde las reservas endoplasmáticas. El aumento intracelular de Ca²⁺ astrogliar conlleva a una

liberación aún mayor de ATP, provocando así una propagación de la señal a células vecinas (Barbe *et al.*, 2006). Con relación a esto y de especial interés, es el hecho que la Px1 forma parte del complejo del receptor P2X₇ siendo necesaria para la liberación de ATP (Locovei *et al.*, 2006; Locovei *et al.*, 2007; Pelegrin & Surprenant, 2006).

Por otro lado, la liberación de ATP por parte de eritrocitos a través de Px1 produce cambios en el flujo sanguíneo frente a condiciones de estrés, iniciando una ola de propagación de Ca²⁺ a través de la estimulación de receptores purinérgicos expresados por células endoteliales (Locovei *et al.*, 2006).

Asimismo, se propuso que Px1 forma el poro asociado a al complejo apoptótico de P2X₇ (Locovei *et al.*, 2007), donde la liberación de nucleótidos tales como el ATP y el UTP actúan como señales de reclutamiento que atraen fagocitos (Chekeni *et al.*, 2010).

En cuanto a su rol en la plasticidad, la Px1 ha sido estudiada en la plasticidad de Hebb, observándose que en animales Px1 KO existe una alteración en el estado de plasticidad, donde se potencia la LTP, mientras que no se puede inducir LTD en adultos. Estas alteraciones *in vitro* se acompañan de alteraciones *in vivo* en el comportamiento, relacionadas al deterioro de la memoria espacial y de la flexibilidad de los aprendizajes (Ardiles *et al.*, 2014; Gajardo *et al.*, 2018; Prochnow *et al.*, 2012). Sin embargo, el rol de esta proteína en la inducción y/o mantenimiento de la PSH aún no ha sido estudiado.

Antecedentes específicos

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio utilizando antagonistas específicos de la Px1 sugieren un papel esencial de esta proteína en la inducción y/o mantenimiento de la PSH. En estos estudios, co-cultivos de hipocampo de rata neonata fueron tratados a los 14-15DIV durante 15 min previos y durante el tratamiento con TTX (1 μ M, 24hs) con **a)** Probenecid (500 μ M) y **b)** péptido bloqueante ¹⁰Panx1 (400 μ m). Cultivos no tratados fueron utilizados como control de la función sináptica basal. Posteriormente, estas células fueron fijadas, realizando ensayos de inmunocitoquímica a través de un triple marcaje: contra el transportador vesicular de glutamato 1 (vGlut-1), el marcador post sináptico Homer-1, y el marcador del citoesqueleto específico neuronal MAP-2 (ver Materiales y Métodos, *ensayos de inmunocitoquímica*). El vGlut-1 juega un papel esencial en la transmisión sináptica facilitando la incorporación de glutamato en las vesículas sinápticas. Estudios recientes proponen que la abundancia de vGlut-1 sináptico, se correlaciona directamente con la *pr* y el tamaño quantal y se ajusta bidireccionalmente con cambios en la actividad sináptica (Mutch *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2005). Este marcador resulta entonces una herramienta fiable para detectar cambios en la función presináptica.

Al analizar el efecto de estos antagonistas específicos de la Px1 ante el bloqueo crónico de la actividad con TTX (1 μ m, 24hs), se observó que el tratamiento con ¹⁰Panx1 y Probenecid previene el ajuste homeostático del v-Glut-1 sináptico, sugiriendo que los canales de Px1 modulan la función presináptica dependiente de actividad (Anexo, Figura 1). Cabe destacar que estos antagonistas bloquean todos los canales de Px1, no pudiendo diferenciar la acción de los canales neuronales y gliales.

Hipótesis

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente mencionados, proponemos un rol protagónico de los canales formados por Px1 en la modulación de la fuerza sináptica dependiente de actividad. Postulamos que el bloqueo crónico de la actividad sináptica promueve la liberación de factores solubles a través de canales de Px1 neuronales y/o gliales, modulando así la función presináptica. Esto podría ir acompañado de un aumento en la densidad de contactos sinápticos, promoviendo una mayor potenciación de la fuerza sináptica del circuito.

Objetivos

Objetivo experimental 1: Evidenciar la presencia de canales de Px1 en nuestro modelo experimental.

Objetivo experimental 2: Determinar la relevancia relativa de los canales de Px1 neuronales y/o gliales en el ajuste homeostático de la fuerza sináptica.

Materiales y Métodos

Para analizar la importancia de los canales formados por Px1 en el ajuste homeostático de la fuerza sináptica y diferenciar el rol de los canales neuronales y gliales, se utilizaron co-cultivos disociados de hipocampo de rata Wistar (día posnatal 0-1) y ratones transgénicos Px1- *knock out* globales (Px1 KO, Genetic Engineering Tech, Inc.; USA; día posnatal 0-1) de la cepa C57Bl6. Los animales fueron sacrificados mediante decapitación, realizando todos los esfuerzos para minimizar tanto el número de individuos empleados como su sufrimiento. Los procedimientos experimentales se cumplieron de acuerdo a las normativas éticas vigentes a nivel internacional, 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>.

1. Preparación de placas de cultivo. Las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio (12mm, espesor N°0), los cuales fueron tratados previamente de la siguiente manera: sumergidos en ácido nítrico *overnight*, lavados 20 veces con agua deionizada y 15 veces con etanol al 95-99%. Luego fueron almacenados en etanol al 99% hasta ser utilizados.

Los cubres tratados se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos y fueron tratados con una solución de ácido acético (3mM), colágeno de cola de rata (23%), poli-D-lisina (20µg/ml, Sigma) en agua. Posteriormente, reciben luz UV durante 25 minutos para su esterilización.

2. Obtención de células de hipocampo. Una vez sacrificados los animales neonatos por decapitación, en un cámara de flujo laminar se extrajo el cerebro y se colocó en medio de disección compuesto por HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Gibco) + HEPES (10mM, Sigma) a 4°C. Se procedió a realizar la disección para extraer los hipocampos siendo éstos seccionados en 4-6 pequeños fragmentos e introducidos en 3ml de una solución enzimática incluyendo: papaína (20 unidades, Sigma), EDTA (0.5mM), CaCl₂ (1.5mM), L-cisteína (0.2mg/ml) y DNAsa (0.1mg/µl). Se incubó durante 18 minutos a 37°C y luego se realizaron dos lavados con medio de glía BME (Basal Medium Eagle, Gibco), suplementado con glucosa (16mM, Sigma), suero bovino fetal (FBS, 10%, Gibco), piruvato (1mM, Gibco), HEPES (0.01M, Sigma), penicilina/estreptomicina (100U/ml; 100µg/ml, Gibco). El tejido fue disgregado mecánicamente en 1ml de medio de neurona NB (Neurobasal, Gibco), suplementado con glucosa (34mM), B27 (2.5%, Gibco), glutamax (2mM, Gibco) y penicilina/estreptomicina (100U/ml; 100µg/ml, Gibco). El volumen fue llevado a 5ml para

luego centrifugar durante 5 minutos a 112 RCF (Relative Centrifugal Force).

3. Preparación de monocapas gliales. El pellet obtenido en 2) se incubó en medio de glía en una botella (25cm²) a 37°C y 5% CO₂ durante 7-14 días hasta la formación de una monocapa. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS e incubadas durante 1 minuto en 2ml de tripsina (Trypsin-EDTA 0.05%, Gibco), lavadas con 3ml de medio de glia y transferidas a un falcon alcanzando un volumen de 5ml. Luego son disgregadas mecánicamente y centrifugadas durante 5 minutos a 112 RCF, resuspendidas en 2ml de medio de glia y contadas en la cámara de Neubauer. Se plantaron entre 4 – 6 x10³ células gliales por pocillo, las cuales fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂.

4. Cultivos neuronales. Cuando la glia sembrada en los cubreobjetos alcanzó un estado de confluencia (aproximadamente del 70%) se procedió a sembrar neuronas sobre ésta. En este caso, el pellet obtenido según 2) se resuspende en 2ml de medio de neurona. Siguiendo el protocolo previamente descrito, las células fueron contadas utilizando la cámara de Neubauer y azul de tripán (5%) para identificar las células muertas. Se plantaron 3.5 – 4.5 x10⁴ células por pocillo y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 14-15 días en estufa de CO₂.

4.1. Combinación de co-cultivos. **a)** co- cultivos Px1KO, donde la monocapa de células gliales y la población neuronal derivaron del hipocampo de ratones neonatos knock-out para la Px1, **b)** co-cultivos glía Px1KO/neuWT, donde la monocapa glial derivó de ratones neonatos knock-out para la Px1 y la población neuronal sembrada posteriormente provino del hipocampo de animales control , **c)** glia WT/neu Px1KO, co-cultivos donde la monocapa glial derivó del hipocampo de animales no manipulados genéticamente y la población neuronal sembrada a posteriori derivó del hipocampo de ratones neonatos knock-out para la Px1, y **d)** co-cultivos WT, derivados de animales no manipulados genéticamente que serán utilizados como control.

Pasadas 24 horas desde la siembra de las neuronas, los co-cultivos fueron tratados con el antimitótico citosina-β-D arabinofuranósido (AraC, 4μM) para evitar el crecimiento excesivo de células gliales.

5. Tratamientos. Transcurridos 14-15 DIV los cultivos fueron tratados con TTX (tetrodotoxina, 1μm), bloqueante específico de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, durante 24-48 horas para inducir la PSH (Murthy *et al.*, 2001; Thiagarajan *et al.*, 2005; Vitureira *et al.*, 2012), y cultivos no tratados fueron utilizados como control de

la función sináptica basal.

6. Fijación de células e inmunocitoquímica. Los cultivos fueron fijados utilizando una solución conteniendo 4% de paraformaldehído (PFA) en PBS, luego de transcurridas entre 24-48 horas del tratamiento con TTX. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y una vez con PBS-0.1% tritón. Se incubaron durante 30 minutos en una solución conteniendo 10% FBS y glicina (0.2M) en PBS-0.1% tritón a temperatura ambiente. Luego se realizó un lavado con PBS-0.1% tritón y se incubó durante 2 horas en una solución con 5% de suero bovino fetal, 0.1% PBS tritón y los siguientes anticuerpos primarios: anti MAP-2, reconoce específicamente los microtúbulos de neuronas; anti vGlut-1, reconoce al transportador vesicular de glutamato 1 (vGlut-1) presente en las terminales presinápticas excitadoras, anti Homer-1, marcador postsináptico y anti-Px1, el cual reconoce los canales formados por Px1 (Tabla 1). A continuación, se lavó 3 veces con PBS-0.1% tritón durante 5 minutos y se incubó durante una hora con anticuerpos secundarios conjugados a diferentes fluorocromos (Tabla 1). Además, se utilizó el anticuerpo primario anti-GFAP conjugado al fluorocromo Cy3, el cual marca los filamentos intermedios de los astrocitos (Tabla 1). Posteriormente, se volvió a lavar con PBS-0.1% tritón durante 5 minutos y por último se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos. Los cubreobjetos fueron montados a portaobjetos utilizando Fluoromount™ (Sigma). Se obtuvieron imágenes de alta resolución utilizando el Microscopio Confocal Zeiss modelo Axio Observer Z1 LSM 800 de la Unidad de Microscopía del Instituto Pasteur Montevideo.

La principal ventaja de la microscopía confocal es que permite obtener imágenes de mayor resolución y contraste en comparación con la técnica de microscopía óptica convencional. Esto se debe a que utiliza técnicas de filtrado espacial que eliminan la luz proveniente de planos fuera de foco, lo cual permite no sólo controlar la profundidad de campo, sino también obtener series de imágenes del espécimen de estudio cambiando el plano de foco, pudiendo realizar un estudio tridimensional.

En este caso, se adquirieron *stacks* de imágenes confocales consecutivas a intervalos de 1µm, realizando proyecciones Z de la intensidad máxima para el análisis posterior, empleando softwares detallados a continuación.

7. Análisis de la abundancia de vGlut-1 sináptico. Para la cuantificación de la fluorescencia asociada al marcador presináptico vGlut-1, se utilizó el software libre FIJI (Fiji Is Just ImageJ) (Schindelin *et al.*, 2012). Se identificaron las sinapsis individuales teniendo en cuenta dos criterios (Figura 7):

1. Presencia de co-localización parcial o total de los marcadores pre y post-sinápticos (vGlut-1 y Homer-1, respectivamente).
2. La colocalización de estos marcadores pre y post-sinápticos debe situarse en una dendrita perteneciente a la neurona a analizar (identificada con MAP-2).

Se midió la intensidad de fluorescencia media asociada a vGlut-1 sináptico, seleccionando manualmente entre 30-170 sinapsis por neurona con la herramienta ROI (Region Of Interest) y realizando promedios por neurona. Se analizaron un mínimo de 8 neuronas por condición en cada experimento y se sustrajo la señal de fondo en cada imagen promediando la intensidad de fluorescencia de regiones sin marcaje para vGlut-1. Se realizaron 3-4 experimentos independientes para cada configuración de co-cultivo.

Tabla 1. Detalle de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de inmunocitoquímica.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Descripción
<i>anti vGlut-1</i>	Conejo	1:7000	Synaptic Systems #135303	Transportador vesicular de glutamato 1; marcador presináptico
<i>anti Homer-1</i>	Ratón	1:500	Synaptic Systems #160011	Proteína Homer-1; marcador post-sináptico
<i>anti MAP-2</i>	Pollo	1:1000	Abcam #ab5392	Proteína asociada a los microtúbulos 2; marcador de dendritas y soma neuronal
<i>anti Px1</i>	Conejo	1:200	Alomone #ACC-234	Proteína panexina 1
<i>anti GFAP-Cy3</i>	Ratón	1:1000	Sigma #C9205	Proteína glial fibrilar ácida, conjugado al fluorocromo Cy3
<i>DyLight 649</i>	Pollo	1:300	Jackson #103-495-155	Anticuerpo secundario anti-pollo conjugado a DyLight 648
<i>Alexa Fluor 488</i>	Conejo	1:500	Invitrogen #A-11070	Anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 488
<i>Alexa Fluor 568</i>	Ratón	1:500	Invitrogen #A10037	Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 568

8. Análisis de la densidad de contactos sinápticos. Para cuantificar la densidad de sinapsis (n), se cuantificó el número de contactos sinápticos presentes en el segmento proximal de las dendritas de neuronas individuales siguiendo el criterio previamente mencionado para la identificación de contactos sinápticos y, normalizando los datos obtenidos a una distancia de 30 μ m (Figura 7).

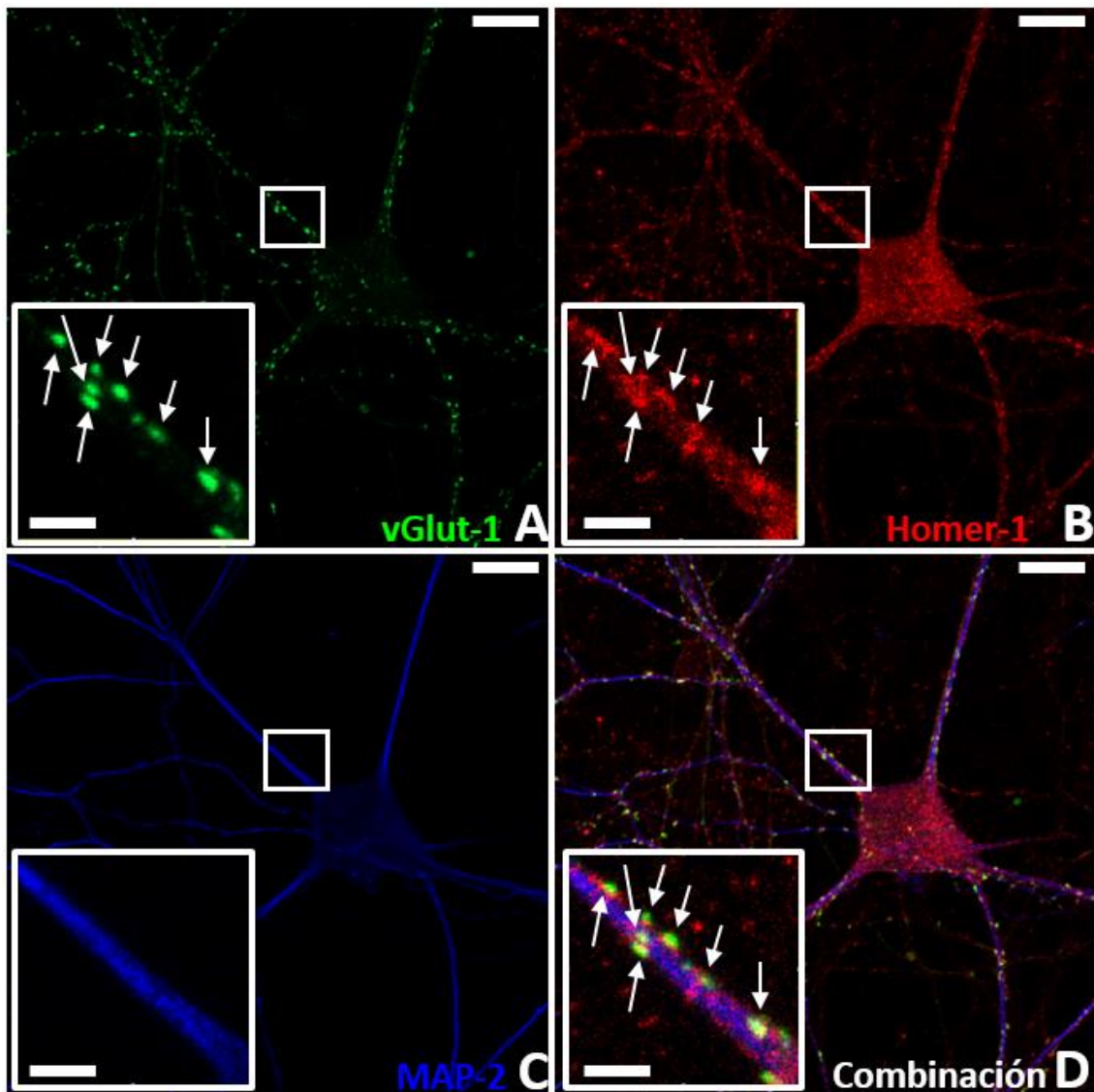


Figura 7. Identificación de sinapsis individuales. Imágenes representativas de un co-cultivo control (A-D). Se realizó un triple marcaje contra el transportador vesicular de glutamato vGlut-1 (verde, A), el marcador post sináptico Homer-1 (rojo, B), y un marcador del citoesqueleto neuronal MAP-2 (azul, C). (D) Combinación de las imágenes A-C. Escala: 24 μ m. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un rectángulo debajo de cada imagen. Escala: 4 μ m. Las flechas señalizan botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total entre vGlut-1 y Homer-1.

9. Análisis estadístico. Se realizó el t-test no apareado debido a que se trata de muestras pequeñas de una población que se ajusta a una distribución normal y contamos con dos grupos de muestras aleatorias e independientes. Para esto, se utilizó el software GraphPad Prism 5. Los resultados son expresados como la media \pm el error estándar de la media.

Resultados

Neuronas y astrocitos expresan canales formados por Px1 en cultivos disociados de hipocampo murino

Para la realización del objetivo específico 1, se realizaron ensayos de ICC en co-cultivos control de 14 DIV, utilizando los anticuerpos primarios contra la Px1, GFAP y MAP-2 (Tabla 1). Posteriormente, se obtuvieron imágenes de microscopía confocal las cuales revelaron la presencia de Px1 tanto en células neuronales como en astrocitos (Figuras 8 y 9). Las neuronas expresan dicha proteína tanto en el cuerpo celular como a lo largo de su árbol dendrítico, siendo este marcaje más intenso con respecto al observado en los astrocitos (Figuras 8 y 9), en concordancia con lo reportado en otros estudios (Vogt *et al.*, 2005; Zoidl *et al.*, 2007).

Cabe destacar que las monocapas gliales utilizadas en este trabajo, presentan tanto astrocitos, microglía y oligodendrocitos (Anexo, Figura 2). Dado que fue utilizado únicamente un marcador glial astrocitario, no se descarta la expresión de Px1 en los otros tipos gliales, lo cual también ha sido descrito en la bibliografía.

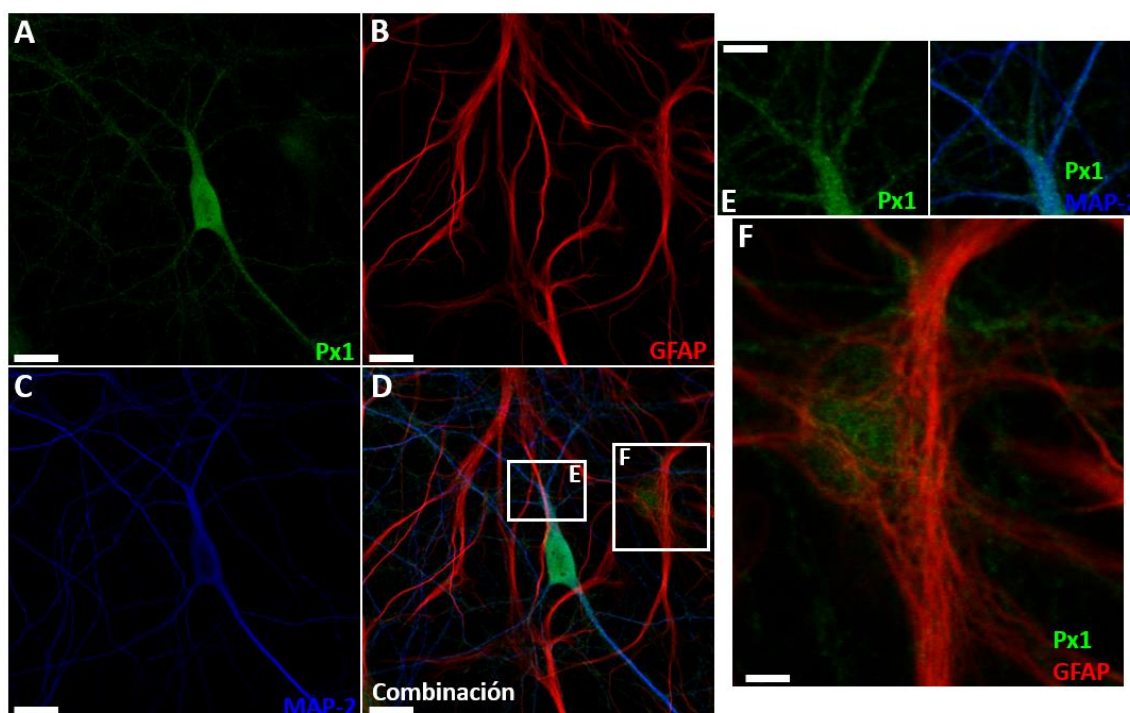


Figura 8. Px1 se expresa tanto en neuronas como astrocitos. Inmunocitoquímicas donde se evidencia la expresión de Px1 en neuronas y astrocitos en co-cultivos de hipocampo de ratas neonatas (A-F). Se realizó un triple marcaje contra panexina 1 (verde, A), GFAP (rojo, B), MAP-2 (azul, C). (D) Combinación de las imágenes A–C, evidenciando la presencia de canales de Px1 en neuronas (A) y astrocitos (B). Escala: 24µm. (E, F) Magnificación de los recuadros señalados en D, donde se muestra la expresión de Px1 en dendritas (E) y astrocitos (F). Escala: 8µm.

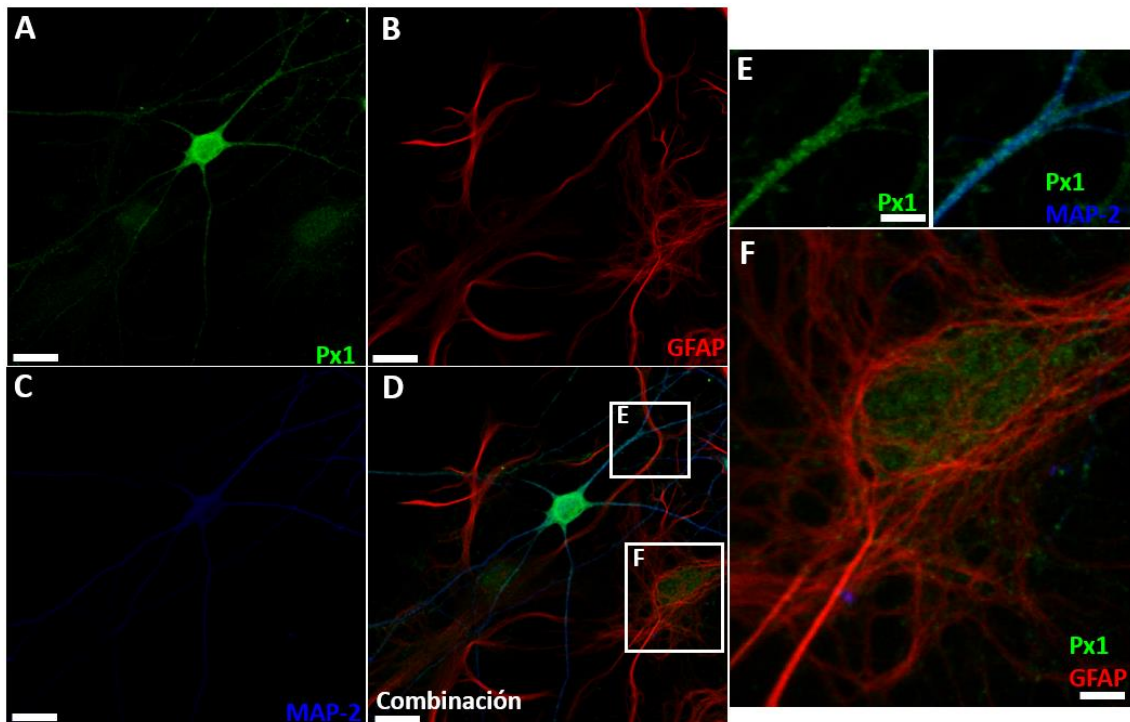


Figura 9. Px1 se expresa tanto en neuronas como astrocitos. Inmunocitoquímica donde se evidencia la expresión de Px1 en neuronas y astrocitos en co-cultivos de hipocampo de ratas neonatas (**A-F**). Se realizó un triple marcaje contra panexina 1 (verde, A), GFAP (rojo, B), MAP-2 (azul, C). (**D**) Combinación de las imágenes A–C, evidenciando la presencia de canales de Px1 en neuronas (A) y astrocitos (B). Escala: 24 μ m. (**E, F**) Magnificación de los recuadros señalados en D, donde se muestra la expresión de Px1 en dendritas (E) y astrocitos (F). Escala: 8 μ m.

Px1 es esencial en el ajuste homeostático de la fuerza sináptica

Con el fin de determinar la relevancia relativa de los canales de Px1 neuronales y gliales en el ajuste homeostático de la fuerza sináptica, se analizaron dos parámetros que la determinan, por un lado, estimamos cambios en la función presináptica mediante el análisis de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico; por otro, analizamos cambios en la densidad de contactos del circuito (n). Cambios en cualquiera de estos parámetros modifican en última instancia la fuerza de las conexiones.

Para poder evidenciar el papel diferencial de la Px1 neuronal y glial utilizamos diferentes combinaciones de co-cultivos en este estudio. En primer lugar, utilizamos co-cultivos control (WT) donde tanto células neuronales como gliales expresan Px1. En coincidencia con Wilson *et al.*, 2005 y estudios previos realizados en el laboratorio, detectamos un aumento significativo en los niveles de fluorescencia asociados a vGlut-1 sináptico en co-cultivos tratados con TTX (Figura 10E), en comparación con co-cultivos control no tratados (Figura 10A) (co-cultivos tratados: 1.42 ± 0.07 , co-cultivos control: 1.00 ± 0.03 , $p < 0.0001$, datos normalizados al control sin tratamiento) (Figura 10I). De igual forma, ante el bloqueo crónico de la actividad neuronal, se observa un

aumento significativo en la densidad de sinapsis (n) (Figura 10J) en co-cultivos tratados con TTX en comparación con co-cultivos control (co-cultivos tratados: 8.04 ± 0.75 , co-cultivos control: 6.46 ± 0.37 , $p < 0.001$). En conjunto, estos resultados sugieren que el bloqueo crónico de la actividad sináptica, promueve un aumento compensatorio de la función presináptica y de la densidad de sinapsis excitadoras por neurona (n), lo cual, en conjunto, podrían traducirse a un incremento de la fuerza sináptica del circuito.

Para analizar la importancia de los canales formados por la Px1 en el ajuste homeostático de la fuerza sináptica, realizamos co-cultivos derivados de animales deficientes en Px1 (Px1 KO) y analizamos la abundancia de vGlut-1 sináptico y la densidad de contactos sinápticos luego del bloqueo crónico de la actividad sináptica. Sorprendentemente, se detectó un aumento significativo en los niveles de fluorescencia asociados al marcador vGlut-1 sináptico en co-cultivos Px1 KO tratados con TTX (Figura 11D) en comparación con co-cultivos no tratados (Figura 11A) (co-cultivos tratados: 1.40 ± 0.07 , co-cultivos control: 1.00 ± 0.03 , $p < 0.0001$, datos normalizados al control sin tratamiento) (Figura 11I), siendo este cambio similar al observado en cocultivos WT. Estos resultados sugieren que la Px1 es dispensable para el ajuste homeostático de la función presináptica. Por otro lado, en los cultivos Px1 KO no se observó un incremento compensatorio en la densidad de sinapsis (n) en cultivos tratados con TTX con respecto a cultivos no tratados (Figura 11J) (co-cultivos tratados: 6.41 ± 0.55 , co-cultivos control: 6.75 ± 0.47 , ns : $p > 0.05$). En conjunto, estos resultados sugieren que la Px1 es esencial para el ajuste homeostático de la densidad de contactos sinápticos y no así para el ajuste de la función presináptica.

Teniendo en cuenta los resultados farmacológicos obtenidos previamente en el laboratorio que sugerían un rol esencial de la Px1 en el ajuste de la fuerza sináptica, decidimos analizar la importancia diferencial de la Px1 glial y neuronal en la PSH. Para ello realizamos **a)** co-cultivos con glia derivada de animales Px1 KO y neuronas derivadas de animales WT (glia Px1 KO/ neu WT) y **b)** co-cultivos con glía derivada de animales WT y neuronas derivadas de animales Px1 KO (glia WT/ neu Px1 KO). En ausencia de Px1 glial, se detectó un aumento compensatorio significativo en los niveles de fluorescencia asociados al marcador vGlut-1 sináptico en los co-cultivos tratados con TTX (Figura 12D), en comparación con co-cultivos no tratados (Figura 12A) (co-cultivos tratados: 1.24 ± 0.05 , co-cultivos control: 1.00 ± 0.03 , $p < 0.0001$, datos normalizados al control sin tratamiento) (Figura 12I). Por otro lado, la ausencia de la Px1 glial fue suficiente para prevenir el ajuste compensatorio de la densidad de contactos sinápticos vGlut-1 – positivos, no observándose diferencias en n en ausencia de la Px1 glial (Figura 12J) (co-cultivos tratados: 7.00 ± 0.56 , co-cultivos control: 7.76 ± 0.51 , ns :

estadísticamente no significativo). En conjunto, estos resultados sugieren un papel relevante de la Px1 de origen glial en el ajuste homeostático de la densidad sináptica, siendo dispensable para el ajuste de la función presináptica. Por último, se analizó la importancia de la Px1 neuronal en el ajuste compensatorio de la fuerza sináptica. Así, se observó que en co-cultivos derivados de glia WT/ neu Px1 KO, se previno el aumento compensatorio de vGlut-1 sináptico en co-cultivos tratados con TTX (Figura 13D) en comparación con los co-cultivos no tratados (Figura 13A) (co-cultivos tratados: 0.96 ± 0.04 , co-cultivos control: 1.00 ± 0.04 , $p=0.50$, datos normalizados al control sin tratamiento) (Figura 13I). Asimismo, en ausencia de la Px1 neuronal, no se evidenciaron cambios significativos en la densidad de contactos sinápticos en co-cultivos control y tratados con TTX (Figura 13J) (co-cultivos tratados: 5.60 ± 0.47 , co-cultivos control: 5.16 ± 0.34 , ns: estadísticamente no significativo). En conjunto estos resultados sugieren un rol esencial de la Px1 neuronal tanto en el ajuste homeostático de la función presináptica como de la densidad de contactos sinápticos excitadores.

Los resultados obtenidos deben compararse con co-cultivos control (Px1 WT) de ratones neonatos, con el fin de comprobar que no existen diferencias entre los complejos sinápticos, el ajuste en la densidad de contactos sinápticos y en la función presináptica frente al bloqueo crónico de la actividad del circuito de dichos cultivos y los utilizados como control en el presente trabajo, los cuales provienen de ratas neonatas WT. Asimismo, se debe comprobar que la expresión de Px1 en ratones es igual a la evidenciada en ratas (Figura 8, 9).

Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos.

	Intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 (con TTX)	Densidad de sinapsis (n) con TTX
Maniobras farmacológicas	↑	No se analizó
Co-cultivos WT	↑	↑
Co-cultivos KO	↑	=
Co-cultivos glíaPx1KO/NeuWT	↑	=
Co-cultivos glíaWT/NeuKO Px1	=	=

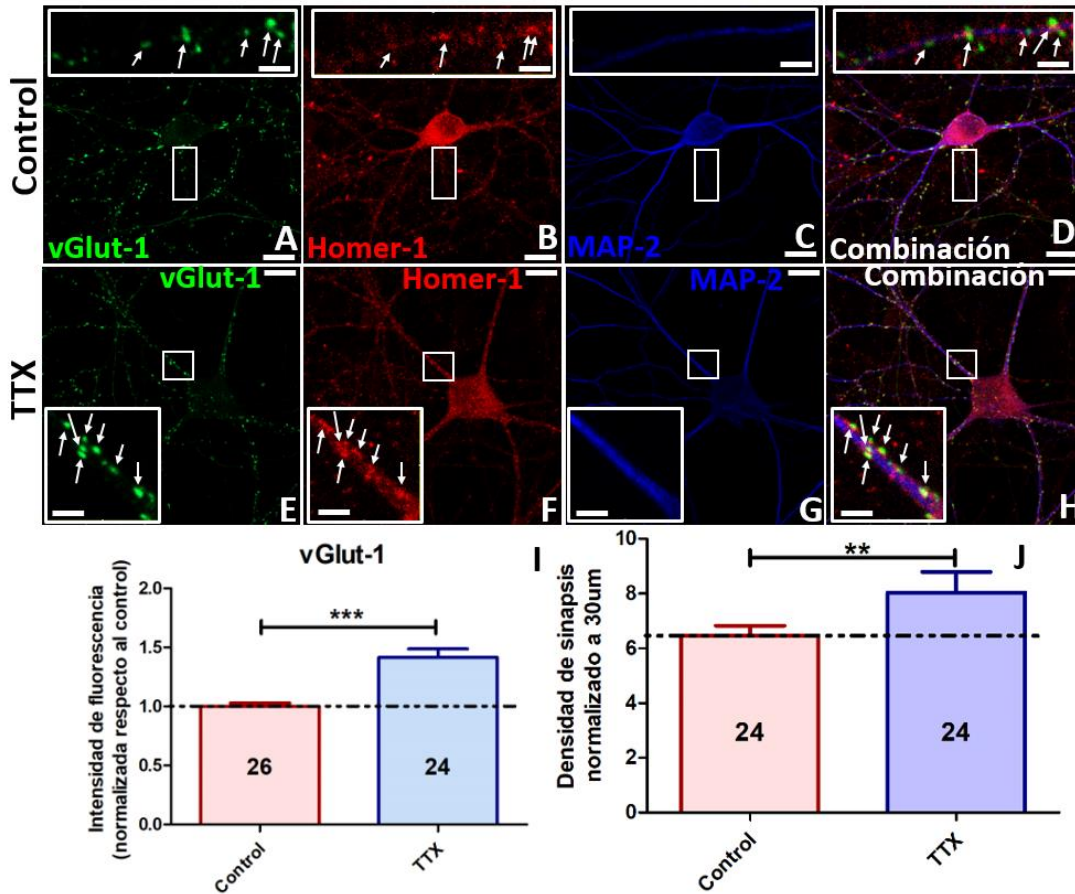


Figura 10. Inmunocitoquímica de un co-cultivo WT. Imágenes representativas de co-cultivos WT control (**A-D**) y tratados con TTX (1µM, 24-48hs) (**E-H**). Se realizó un triple marcaje contra vGlut-1 (verde, **A, E**), Homer-1 (rojo, **B, F**), y MAP-2 (azul, **C, G**). (**D, H**) Combinación de las imágenes A-C y E-G, respectivamente. Escala: 24µm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un rectángulo en la parte superior de cada imagen. (**I**) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 en co-cultivos tratados con TTX y control, datos normalizados al control. (**J**) Cuantificación de la densidad de sinapsis normalizada a 30µm en condiciones control y con tratamiento con TTX. La línea punteada representa la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 o la densidad de sinapsis normalizada a 30µm en cultivos control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición. Escala: 4µm. Las flechas señalizan botones sinápticos donde existe colocación parcial o total entre vGlut-1 y Homer-1. *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$. Two-tailed Student's t-test.

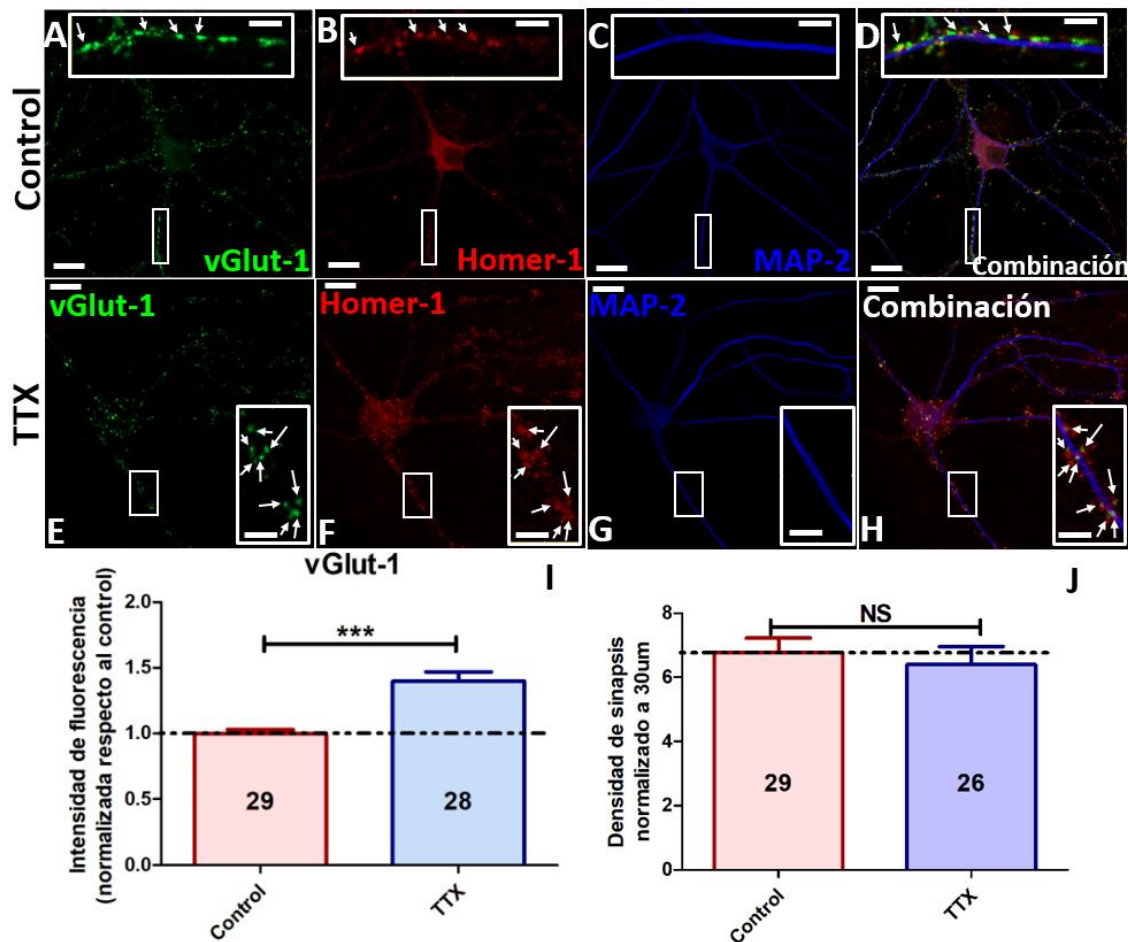


Figura 11. Inmunocitoquímica de un co-cultivo KO para Px1. Imágenes representativas de co-cultivos KO para Px1 control (A-D) y tratados con TTX (1µM, 24-48hs) (E-H). Se realizó un triple marcaje contra vGlut-1 (verde, A, E), Homer-1 (rojo, B, F), y MAP-2 (azul, C, G). (D, H) Combinación de las imágenes A-C y E-G, respectivamente. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 en co-cultivos tratados con TTX y control, datos normalizados al control. (J) Cuantificación de la densidad de sinapsis normalizada a 30µm en condiciones control y con tratamiento con TTX. La línea punteada representa la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 o la densidad de sinapsis normalizada a 30µm en cultivos control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición. Escala: 24µm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un rectángulo en la parte superior de cada imagen. Escala: 4µm. Las flechas señalizan botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total entre vGlut-1 y Homer-1. *** $p < 0.0001$. NS, estadísticamente no significativo. Two-tailed Student's t-test.

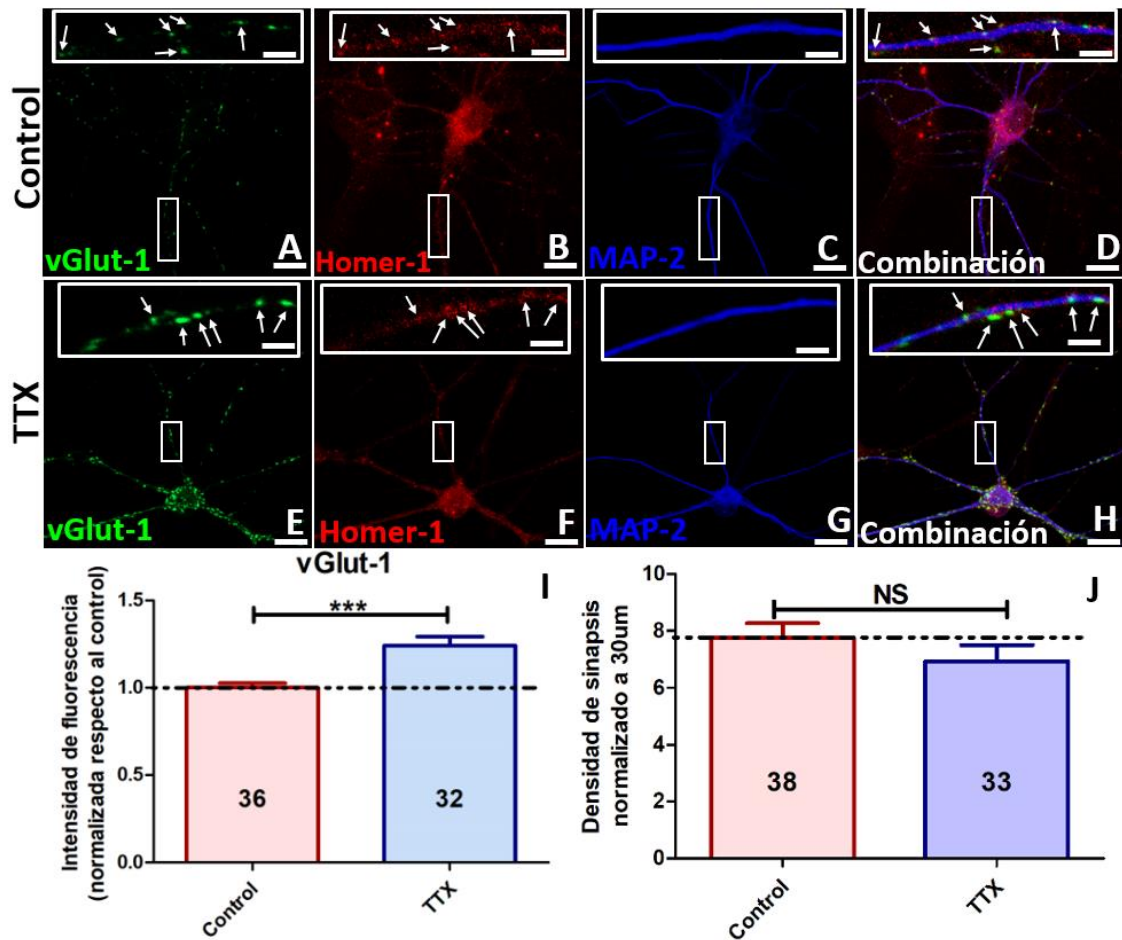


Figura 12. Inmunocitoquímica de un co-cultivo glia KO/neuWT. Imágenes representativas de co-cultivos glia KO/neuWT control (**A-D**) y tratados con TTX (1µM, 24-48hs) (**E-H**). Se realizó un triple marcaje contra vGlut-1 (verde, **A, E**), Homer-1 (rojo, **B, F**), y MAP-2 (azul, **C, G**). (**D, H**) Combinación de las imágenes A-C y E-G respectivamente. (**I**) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 en co-cultivos tratados con TTX y control, datos normalizados al control. (**J**) Cuantificación de la densidad de sinapsis normalizada a 30µm en condiciones control y con tratamiento con TTX. La línea punteada representa la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 o la densidad de sinapsis normalizada a 30µm en cultivos control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición. Escala: 24µm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un rectángulo en la parte superior de cada imagen. Escala: 4µm. Las flechas señalizan botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total entre vGlut-1 y Homer-1. *** $p < 0.0001$. NS, estadísticamente no significativo. Two-tailed Student's t-test.

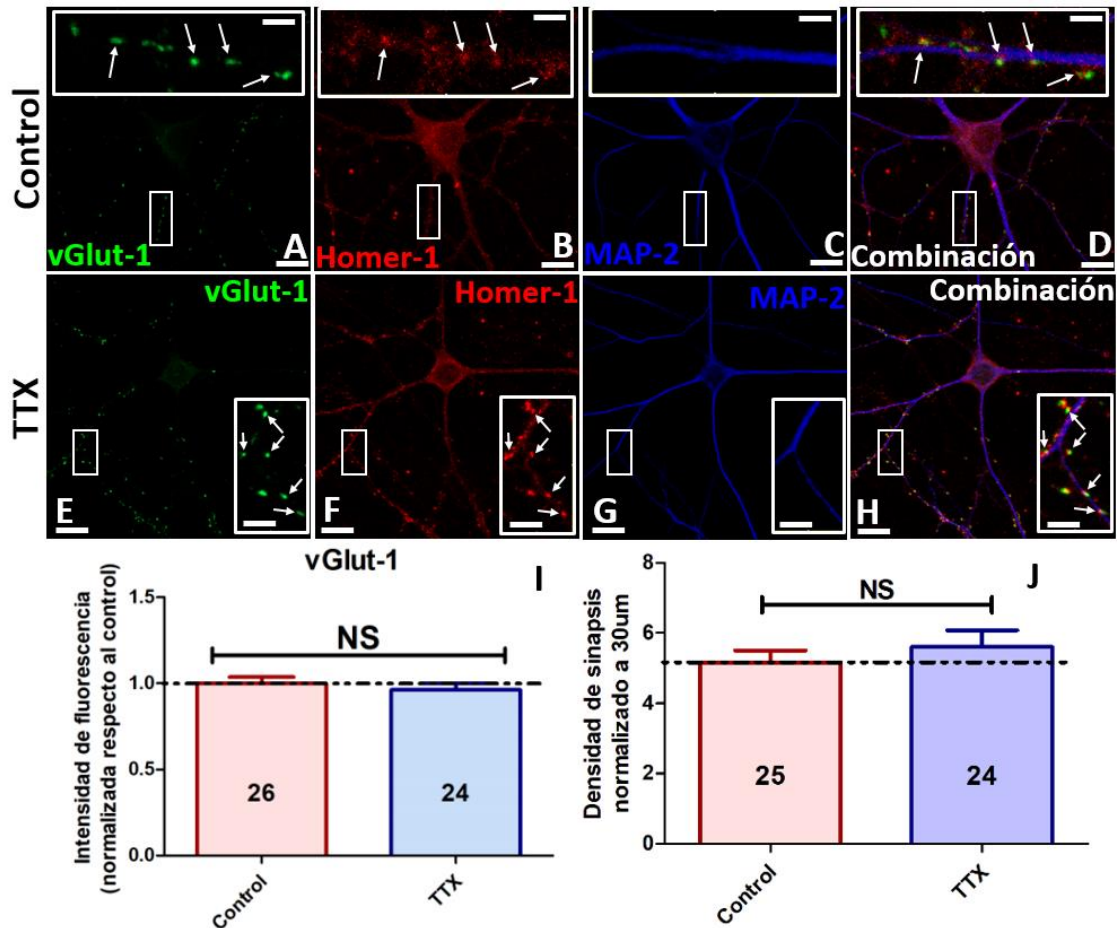


Figura 13. Inmunocitoquímica de un co-cultivo glia WT/neuKO. Imágenes representativas de co-cultivos glia WT/neuKO control (**A-D**) y tratados con TTX (1µM, 24-48hs) (**E-H**). Se realizó un triple marcaje contra vGlut-1 (verde, **A, E**), Homer-1 (rojo, **B, F**), y MAP-2 (azul, **C, G**). (**D, H**) Combinación de las imágenes A-C y E-G respectivamente. (**I**) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 en co-cultivos tratados con TTX y control, datos normalizados al control. (**J**) Cuantificación de la densidad de sinapsis normalizada a 30µm en condiciones control y con tratamiento con TTX. La línea punteada representa la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 o la densidad de sinapsis normalizada a 30µm en cultivos control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición. Escala: 24µm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un rectángulo en la parte superior de cada imagen. Escala: 4µm. Las flechas señalizan botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total entre vGlut-1 y Homer-1. NS, estadísticamente no significativo. Two-tailed Student's t-test.

Discusión

Px1 se expresa en neuronas y astrocitos en co-cultivos de hipocampo de ratas neonatas

Este trabajo tiene como objetivo principal analizar el rol de los canales de Px1 en el ajuste homeostático de la fuerza sináptica, de forma que el primer abordaje realizado consistió en determinar si la Px1 se expresa en nuestro modelo experimental. Utilizando co-cultivos neurona-glia de hipocampo murino derivado de animales neonatos (P0-P1), se realizaron ensayos de inmunocitoquímica, los cuales a través de un triple marcaje revelaron la expresión de Px1 tanto por células neuronales (MAP-2 positivas), como por astrocitos (GFAP positivas) (Figura 8, 9). Las neuronas expresan dicha proteína tanto en el cuerpo celular como a lo largo de su árbol dendrítico, siendo este marcaje más intenso con respecto al observado en los astrocitos, en concordancia con lo reportado en otros estudios (Vogt *et al.*, 2005; Zoidl *et al.*, 2007). Zoidl y cols. demostraron, además, que ésta proteína se acumula en sitios postsinápticos en sinapsis hipocámpales y de corteza (Zoidl *et al.*, 2007). Asimismo, cabe destacar que análisis inmunohistoquímicos de la expresión de Px1 han mostrado que diferentes anticuerpos anti-Px1 fabricados por distintas empresas presentan marcaje en diferentes sitios subcelulares neuronales, lo que podría explicarse por diferentes conformaciones o asociaciones a otras proteínas en los cuerpos celulares y dendritas (Cone *et al.*, 2013; Dahl, 2015). También es posible que los anticuerpos anti-Px1 reconozcan otras isoformas de la proteína (Px2, Px3), lo cual creemos que sucedió al realizar ensayos de ICC en co-cultivos Px1 KO, evidenciando marcaje Px1 positivo (resultados no publicados).

Cabe destacar que las monocapas gliales utilizadas en este trabajo, presentan tanto astrocitos, microglía y oligodendrocitos (Anexo, Figura 2). Dado que fue utilizado únicamente un marcador glial astrocitario, no se descarta la expresión de Px1 en los otros tipos gliales, lo cual también ha sido descrito en la bibliografía (Decrock *et al.*, 2015; Lapato & Tiwari-Woodruff, 2017).

Rol de Px1 en la formación y/o mantenimiento de las sinapsis

Los diversos co-cultivos realizados presentaron células neuronales saludables y de morfología normal, siendo éstas lo suficientemente abundantes como para cuantificar 30-170 sinapsis por neurona, de forma de poder analizar tanto la densidad de sinapsis

por neurona, como la intensidad de fluorescencia asociada al marcador presináptico vGlut-1.

En cuanto a los co-cultivos Px1 KO, observamos que estos son incapaces de incrementar la densidad de contactos sinápticos vGlut-1 positivos frente al bloqueo crónico de la actividad sináptica en comparación a los co-cultivos no tratados (Figuras 10-11H, J) (Tabla 2). Esto podría indicar que la presencia de Px1 en ambos tipos celulares es necesaria para realizar el ajuste homeostático de la densidad sináptica, o bien, podría ser sólo necesaria la Px1 neuronal o la glial. Con el fin de analizar el posible rol diferencial de la Px1 neuronal o glial en el ajuste homeostático compensatorio de la densidad de sinapsis excitadoras, realizamos diferentes configuraciones de co-cultivos. Para el caso de los co-cultivos glia Px1KO/ neuWT, en ausencia de Px1 glial no se observó un aumento compensatorio en la densidad de sinapsis frente al bloqueo crónico de la actividad con TTX (Figura 12H, J), en comparación con esta misma configuración de co-cultivos no tratados (Figura 10H, J) (Tabla 2). Por último, en los co-cultivos Px1 gliaWT/ neuPx1KO, frente la ausencia de Px1 neuronal, los cultivos tratados con TTX no fueron capaces de incrementar la densidad de contactos sinápticos en comparación con cultivos control (Figura 13H, J) (Tabla 2). En conjunto, estos resultados sugieren que los canales de Px1 son esenciales para realizar un ajuste homeostático de la densidad de contactos sinápticos n , requiriendo su presencia tanto en neuronas como en glia. Esto podría sugerir un posible rol de los canales de Px1 en la formación y/o estabilización de los complejos sinápticos. Estas observaciones están en concordancia con evidencias aportadas por estudios realizados en otros laboratorios, los cuales destacan la importancia del extremo C-terminal de la Px1 para formar sitios de anclaje para complejos multiproteicos (Decrock *et al.*, 2015; Wicki-Stordeur & Swayne, 2014). Este extremo carboxilo terminal resulta de gran interés, ya que presenta gran variabilidad entre las distintas isoformas de estas proteínas. Además, contiene múltiples sitios de interacción para diversas proteínas del citoesqueleto (Bhalla-Gehi *et al.*, 2010; Wicki-Stordeur & Swayne, 2013), receptores y canales iónicos (Silverman *et al.*, 2009; Zoidl *et al.*, 2009), entre otros (Decrock *et al.*, 2015; Wicki-Stordeur & Swayne, 2014), pudiendo facilitar el reconocimiento de las terminales, formación y/o estabilización de los contactos sinápticos. De esta forma, Px1 está involucrada en diversos procesos de señalización intracelular, como la señalización a través de receptores (*receptor signaling*) o la transcripción génica (Vinken *et al.*, 2012; Wicki-Stordeur & Swayne, 2014). Actualmente, el papel funcional de estas proteínas se centra no sólo por su capacidad de formar hemicanales, sino también por su interacción con diversos sistemas de señalización que regulan la función celular.

Por otro lado, utilizando un modelo *in vitro* de células Neuro-2a (N2a) (línea celular derivada del neuroblastoma murino), se demostró que la Px1 juega un papel fundamental en la migración celular y el crecimiento neurítico, estableciendo interacciones adicionales con elementos del citoesqueleto, como el complejo nucleador de actina Arp2/3 (Wicki-Stordeur *et al.*, 2012). Este complejo regula los filamentos de actina presentes en las neuritas, donde la depleción del complejo reduce significativamente la formación de filopodios tanto en neuronas primarias como en neuroblastomas (Korobova & Svitkina, 2008). Asimismo, se ha comprobado que Px1 modula la extensión, ramificación y densidad axonal en nervios periféricos (Horton *et al.*, 2017).

Así, resumiendo, la incapacidad de ajustar homeostáticamente la densidad de contactos sinápticos frente al tratamiento con TTX podría deberse a un papel de la Px1 directamente en la formación y/o mantenimiento de las sinapsis o, en otro escenario, la Px1 podría ser esencial durante la neuritogénesis de las neuronas. La ausencia de la Px1 tanto en neurona como en glia podría comprometer este proceso y como consecuencia podría llevar a una reducción en la formación de contactos sinápticos.

Rol de Px1 en la función presináptica

Con el fin de dilucidar el rol de la Px1 en la función presináptica, comenzamos realizando co-cultivos WT tratados crónicamente con TTX, y co-cultivos WT control sin tratamiento. Evaluamos la función presináptica cuantificando la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico en ambas condiciones, observando un incremento compensatorio de la intensidad de fluorescencia para dicho marcador frente al bloqueo crónico de la actividad del circuito, lo cual sugiere un aumento de la función presináptica (Wilson *et al.*, 2005) (Figura 10A, D, E, H, I) (Tabla 2). Al repetir estas maniobras experimentales utilizando co-cultivos Px1 KO, observamos que se produce un incremento compensatorio en los niveles de fluorescencia asociados a vGlut-1 sináptico frente al tratamiento con TTX (Figura 11A, D, E, H, I) (Tabla 2). Este resultado se encuentra en oposición a lo observado en experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio, donde se utilizaron antagonistas específicos de la Px1: el péptido mimético denominado ¹⁰Panx1 y el antagonista farmacológico Probenecid, los cuales bloquean tanto los canales de Px1 neuronales como los gliales. Estos co-cultivos fueron tratados a los 14-15DIV durante 15 minutos previos y durante el tratamiento con TTX (1µM, 24-48hs) con Probenecid (500µM) ó el péptido bloqueante ¹⁰Panx1(400µM), impidiendo el aumento compensatorio de la abundancia de vGlut-1 sináptico, sugiriendo que los canales de Px1 están implicados en la inducción y/o mantenimiento de la PSH

presináptica (Anexo, Figura 1) (Tabla 2). El rol de la Px1 ha sido previamente evidenciado en otros tipos de plasticidad sináptica, observándose que en animales KO para Px1 hay una alteración en el estado de plasticidad, se potencia la LTP, mientras que no se puede inducir LTD en adultos. Estas alteraciones *in vitro* se acompañan de alteraciones *in vivo* en el comportamiento, relacionadas al deterioro de la memoria espacial y de la flexibilidad de los aprendizajes (Ardiles *et al.*, 2014; Gajardo *et al.*, 2018; Prochnow *et al.*, 2012).

Una posible explicación para los resultados obtenidos en condiciones Px1 KO, podría ser la existencia de mecanismos de compensación por parte de alguna de las otras dos isoformas de Pxs: Px2 y/o Px3. La existencia de mecanismos de compensación en animales completamente KO para cierta proteína de interés, es reportada con frecuencia (El-Brolosy & Stainier, 2017; Kreiner, 2015; Rossi *et al.*, 2015). Para el caso particular de la Px1, creemos que la completa ausencia de esta proteína en el co-cultivo podría desencadenar mecanismos de compensación, especialmente por parte la Px2, la cual se expresa de forma abundante en el cerebro (Boassa *et al.*, 2015). De esta forma, al igual que otros autores, planteamos una hipótesis de compensación donde la Px2 presente en compartimientos subcelulares y frente a la ausencia de Px1 en el cultivo, se inserte en la membrana y forme panexones funcionales, recuperando la actividad perdida (Bargiotas *et al.*, 2011; Chiu *et al.*, 2014). A su vez, recientemente se ha sugerido un mecanismo de compensación por parte de Px3 en el órgano vomeronasal en animales Px1 KO, siendo estos capaces de liberar ATP (Whyte-Fagundes *et al.*, 2018). Asimismo, cabe destacar que tanto Px1 como Px3 se encuentran bajo el estado de glicosilación Gly-2, el cual representa el complejo de especies glicosiladas, siendo este estado el predominante entre las especies de Px1 que se encuentran insertadas en la membrana plasmática neuronal (Penuela *et al.*, 2009, 2014). Por otro lado, se ha reportado un aumento en el índice de acoplamiento astrocitario en células provenientes de animales KO para Px1, en comparación con células provenientes de animales control (Suadicaní *et al.*, 2012). Particularmente, se observa un aumento de 1.6 veces en los niveles de expresión de Cx43, de forma que ésta proteína podría estar compensando la función de Px1 glial y, por ende, no observamos alteraciones en la inducción y/o mantenimiento de la PSH al utilizar a) cocultivos KO o b) la combinación Px1 glia KO/neuWT.

Dada la amplia consistencia de los resultados obtenidos utilizando maniobras farmacológicas, decidimos analizar si existe un rol diferencial de la Px1 glial y neuronal en la función presináptica. Para esto, realizamos en primera instancia co-cultivos Px1 glia KO/neuWT, donde las neuronas son capaces de aumentar de forma significativa la

abundancia de vGlut-1 sináptico frente al tratamiento crónico con TTX (Figura 12A-D, I) (Tabla 2) en comparación con co-cultivos no tratados (Figura 11E-I). Esto sugiere que los canales Px1 gliales no son esenciales para la inducción y/o mantenimiento de la PSH presináptica. Sin embargo, en los co-cultivos Px1 glia WT/neuKO, no se produce un aumento compensatorio en la abundancia de vGlut-1 sináptico frente al bloqueo crónico de la actividad neuronal (Figura 13A-D, I) (Tabla 2), en comparación con co-cultivos control no tratados (Figura 13E-I). Estos resultados sugieren que los canales de Px1 neuronales son esenciales para inducir el aumento compensatorio de la función presináptica frente a la supresión crónica de la actividad del circuito. En el contexto del laboratorio y de acuerdo a resultados obtenidos¹, una de las posibles explicaciones es que esto podría deberse a la relación existente entre Px1 y la señalización purinérgica (Alberto *et al.*, 2013; Chiu *et al.*, 2017; Whyte-Fagundes & Zoidl, 2018). Estudios realizados en nuestro laboratorio han comenzado a investigar el rol del ATP en la PSH, a través de la manipulación de los niveles extracelulares de ATP en co-cultivos neurona/glía WT¹, sugiriendo que un incremento en la concentración de ATP extracelular es esencial para la inducción y/o mantenimiento de la función presináptica frente al tratamiento con TTX. Es importante señalar que la liberación del ATP al medio podría también involucrar la exocitosis dependiente de Ca²⁺, así como a través de conexiones, panexones, y el canal P2X₇R.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, y en conjunto con otros experimentos realizados en el laboratorio, se plantea un posible escenario representado en la *Figura 14*. En éste, frente a la inactividad crónica inducida con TTX en el circuito (1), las células gliales serían capaces de sensor la disminución en la actividad neuronal y/o su propia excitabilidad, por una vía de señalización dependiente de las variaciones del Na⁺ y Ca²⁺ intracelular (2). Como consecuencia, se produciría la liberación de gliotransmisores como el ATP (3), activando receptores P2X₇ presinápticos (4), y produciendo la apertura de canales de Px1 neuronales que contribuirían a la liberación de más ATP (5). Asimismo, la activación de los P2X₇R presinápticos podrían mediar aumentos del Ca²⁺ intracelular y la consecuente modulación de la función presináptica (6).

¹ Datos no publicados provenientes de la Tesis de Doctorado que está realizando Alberto Rafael.

Conclusiones

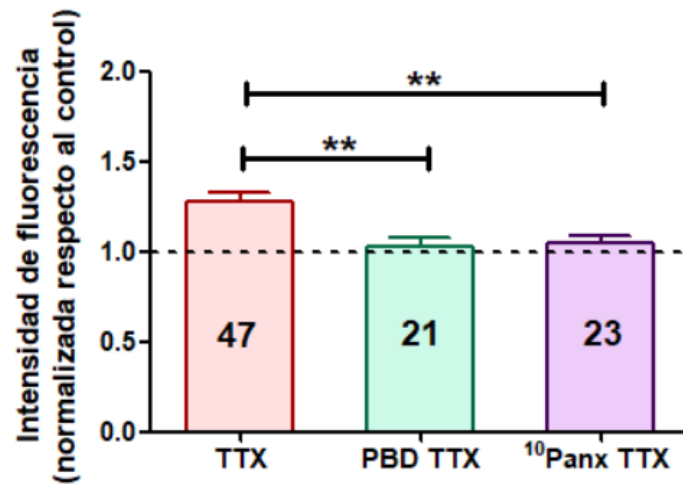
De acuerdo con los resultados obtenidos, en el presente trabajo podemos concluir que:

1. La Px1 se expresa en neuronas y astrocitos en co-cultivos de hipocampo de ratas neonatas.
2. Los canales de Px1, tanto neuronales como gliales, cumplen un rol esencial en el ajuste homeostático de la densidad de sinapsis excitadoras del hipocampo en respuesta al bloqueo crónico de la actividad del circuito.
3. Lo canale de Px1 neuronales, pero no gliales, modulan el ajuste compensatorio de la función presináptica excitadora producido en respuesta a un período de inactividad prolongada en el hipocampo.

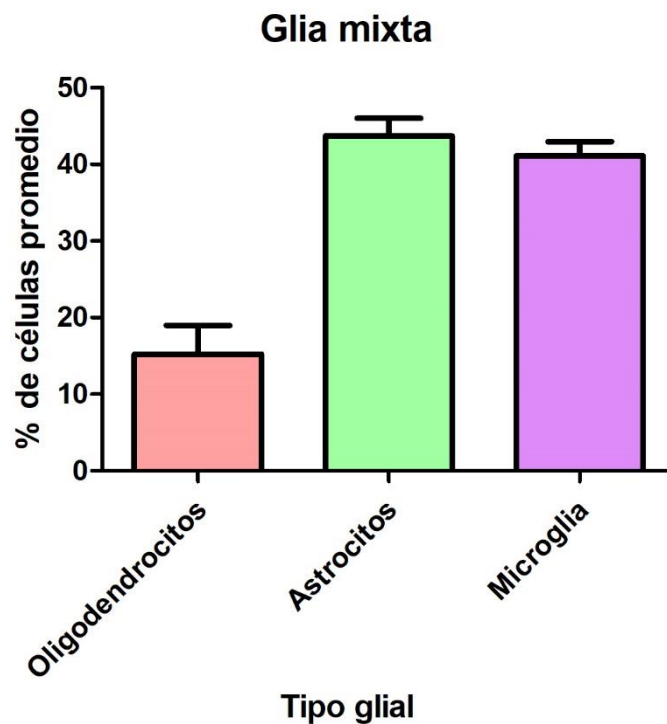
Perspectivas a futuro

1. Nos interesa analizar más en detalle la posible compensación producida por otras isoformas de la Px1 o la Cx43 en animales KO. Para ello, realizaremos estudios de inmunocitoquímica y Western blot para analizar variaciones en la expresión de la Px2, Px3 y Cx43.
2. Teniendo en cuenta que nuestros cultivos están constituidos por una monocapa que contiene los diferentes tipos de células gliales, analizaremos el rol diferencial de los tipos gliales directamente implicados en la regulación de transmisión sináptica (microglía y astrocitos) en el ajuste homeostático de la fuerza sináptica. Para ello realizaremos cocultivos donde la monocapa glial este enriquecida en astrocitos o microglía y evaluaremos la respuesta frente al bloqueo crónico de la actividad sináptica.

Anexo



Anexo, Figura 1. Bloqueo de canales de Px1 utilizando los agonistas específicos. Se realizaron tratamientos con ¹⁰Panx1 (400µM) y Probenecid (500µM) en co-cultivos y tratados con TTX (1µM, 24-36hs). ** p<0.001 Two-tailed Student's t-test.



Anexo, Figura 2. Proporciones de células gliales presentes en las monocapas gliales utilizadas en los co-cultivos neurona-glia. Resultados preliminares producto de un único experimento. Siguiendo el mismo protocolo de disección descrito en "Materiales y métodos", las monocapas gliales presentan un 15% de oligodendrocitos (anti-APC), 44% de astrocitos (anti-GFAP) y un 41% de microglía (anti-Iba1). Resultados obtenidos en el marco del PAIE 2019 (en curso), Marina Tizzoni.

Bibliografía

- Alberto, A. V. P., Faria, R. X., Couto, C. G. C., Ferreira, L. G. B., Souza, C. A. M., Teixeira, P. C. N., Alves, L. A. (2013). Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 386(9), 775–787. <https://doi.org/10.1007/s00210-013-0868-x>
- Ambrosi, C., Gassmann, O., Pranskevich, J. N., Boassa, D., Smock, A., Wang, J., Sosinsky, G. E. (2010). Pannexin1 and pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24420–24431. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.115444>
- Ardiles, A. O., Flores-Muñoz, C., Toro-Ayala, G., Cárdenas, A. M., Palacios, A. G., Muñoz, P., Martínez, A. D. (2014). Pannexin 1 regulates bidirectional hippocampal synaptic plasticity in adult mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(October), 326. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00326>
- Arendt, K. L., Sarti, F., & Chen, L. (2013). Chronic Inactivation of a Neural Circuit Enhances LTP by Inducing Silent Synapse Formation. *Journal of Neuroscience*, 33(5), 2087–2096. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3880-12.2013>
- Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, 513(5), 532–541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>
- Barbe, M. T., Monyer, H., & Bruzzone, R. (2006). Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21, 103–114. <https://doi.org/10.1152/physiol.00048.2005>
- Bargiotas, P., Krenz, A., Hormuzdi, S. G., Ridder, D. A., Herb, A., Barakat, W., Schwaninger, M. (2011). Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), 20772–20777. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018262108>
- Bekkers, J. M., & Stevens, C. F. (1990). Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Letters To Nature*, 346, 818–822. <https://doi.org/10.1038/346183a0>

- Bennett, M. V. L., & Zukin, R. S. (2004). Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron*, *41*(4), 495–511. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14980200>
- Bhalla-Gehi, R., Penuela, S., Churko, J. M., Shao, Q., & Laird, D. W. (2010). Pannexin1 and pannexin3 delivery, cell surface dynamics, and cytoskeletal interactions. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(12), 9147–9160. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082008>
- Biederer, T., Kaeser, P. S., & Blanpied, T. A. (2017). Transcellular Nanoalignment of Synaptic Function. *Neuron*, *96*(3), 680–696. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.006>
- Boassa, D., Nguyen, P., Hu, J., Ellisman, M. H., & Sosinsky, G. E. (2015). Pannexin2 oligomers localize in the membranes of endosomal vesicles in mammalian cells while Pannexin1 channels traffic to the plasma membrane. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00468>
- Bond, S. R., & Naus, C. C. (2014). The pannexins: Past and present. *Frontiers in Physiology*, *5 FEB*(February), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00058>
- Branco, T., & Staras, K. (2009). The probability of neurotransmitter release: Variability and feedback control at single synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(5), 373–383. <https://doi.org/10.1038/nrn2634>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.2233464100>
- Burrone, J., & Murthy, V. N. (2003). Synaptic gain control and homeostasis. *Current Opinion in Neurobiology*, *13*(5), 560–567. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.09.007>
- Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski, E. R., Ravichandran, K. S. (2010). Pannexin 1 channels mediate “find-me” signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, *467*(7317), 863–867. <https://doi.org/10.1038/nature09413>
- Chen, X., Vinade, L., Leapman, R. D., Petersen, J. D., Nakagawa, T., Phillips, T. M.,

- Reese, T. S. (2005). Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(32), 11551–11556. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505359102>
- Cheung, G., Chever, O., & Rouach, N. (2014). Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(November), 348. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00348>
- Chiu, Y.-H., Schappe, M. S., Desai, B. N., & Bayliss, D. A. (2017). Revisiting multimodal activation and channel properties of Pannexin 1. *The Journal of General Physiology*, *150*(1), 19–39. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711888>
- Chiu, Y. H., Ravichandran, K. S., & Bayliss, D. A. (2014). Intrinsic properties and regulation of Pannexin 1 channel. *Channels*, *8*(2), 103–109. <https://doi.org/10.4161/chan.27545>
- Choquet, D., & Triller, A. (2013). The dynamic synapse. *Neuron*, *80*(3), 691–703. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.013>
- Colino, A., Muñoz, J., & Vara, H. (2002). Plasticidad sináptica a corto plazo, *34*(6), 593–599.
- Collingridge, G. L., Peineau, S., Howland, J. G., & Wang, Y. T. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(7), 459–473. <https://doi.org/10.1038/nrn2867>
- Cone, A. C., Ambrosi, C., Scemes, E., Martone, M. E., & Sosinsky, G. E. (2013). A comparative antibody analysis of pannexin1 expression in four rat brain regions reveals varying subcellular localizations. *Frontiers in Pharmacology*, *4* FEB(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00006>
- Cooper, L. N., & Bear, M. F. (2012). The BCM theory of synapse modification at 30: Interaction of theory with experiment. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(11), 798–810. <https://doi.org/10.1038/nrn3353>
- Dahl, G. (2015). ATP release through pannexon channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1672), 20140191. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0191>
- Dani, A., Huang, B., Bergan, J., Dulac, C., & Zhuang, X. (2010). Superresolution Imaging

- of Chemical Synapses in the Brain. *Neuron*, 68(5), 843–856.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.021>
- De Gois, S., Schäfer, M. K.-H., Defamie, N., Chen, C., Ricci, A., Weihe, E., Erickson, J. D. (2005). Homeostatic Scaling of Vesicular Glutamate and GABA Transporter Expression in Rat Neocortical Circuits. *Journal of Neuroscience*, 25(31), 7121–7133. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5221-04.2005>
- Decrock, E., De Bock, M., Wang, N., Bultynck, G., Giaume, C., Naus, C. C., Leybaert, L. (2015). Connexin and pannexin signaling pathways, an architectural blueprint for CNS physiology and pathology? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(15), 2823–2851. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1962-7>
- Del Castillo, J., & Katz, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential, 1–14. Retrieved from papers://c9158030-783e-452e-bf32-463544279105/Paper/p14
- Desai, N. S. (2004). Homeostatic plasticity in the CNS: Synaptic and intrinsic forms. *Journal of Physiology Paris*, 97(4–6), 391–402. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2004.01.005>
- Dityatev, A., & Schachner, M. (2003). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(6), 456–468. <https://doi.org/10.1038/nrn1115>
- Dobrunz, L. E., & Stevens, C. F. (1997). Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron*, 18(6), 995–1008. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80338-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80338-4)
- El-Brolsy, M. A., & Stainier, D. Y. R. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genetics*, 13(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006780>
- Erickson, J. D., De Gois, S., Varoqui, H., Schafer, M. K. H., & Weihe, E. (2006). Activity-dependent regulation of vesicular glutamate and GABA transporters: A means to scale quantal size. *Neurochemistry International*, 48(6–7), 643–649. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.12.029>
- Fernandes, D., & Carvalho, A. L. (2016). Mechanisms of homeostatic plasticity in the excitatory synapse. *Journal of Neurochemistry*, 139(6), 973–996. <https://doi.org/10.1111/jnc.13687>

- Foster, M., and Sherrinton, C. S. (1897). A Textbook of Physiology, Part Three: The Central Nervous System.
- Furshpan, B. Y. E. J., & Potter, D. D. (1958). Transmission at the giant motor synapses. *Health (San Francisco)*, 145, 289–325.
- Gajardo, I., Muñoz, P., Ardiles, Á. O., Flores-Muñoz, C., Lopez-Espíndola, D., Elgueta, C., Martínez, A. D. (2018). Lack of Pannexin 1 Alters Synaptic GluN2 Subunit Composition and Spatial Reversal Learning in Mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(April), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00114>
- Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C. C., & Sáez, J. C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: Properties, pharmacology, and roles. *Frontiers in Pharmacology*, 4 JUL(July), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00088>
- Harris, K. M., & Weinberg, R. J. (2012). Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain Ultrastructure of Synapses in the. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005587>
- Hebb, D. O. (1949). The Organization of Behavior; A Neuropsychological Theory. *The American Journal of Psychology*, 63(4), 633–642. <https://doi.org/10.2307/1418888>
- Holderith, N., Lorincz, A., Katona, G., Rózsa, B., Kulik, A., Watanabe, M., & Nusser, Z. (2012). Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nature Neuroscience*, 15(7), 988–997. <https://doi.org/10.1038/nn.3137>
- Horton, S. M., Luna Lopez, C., Blevins, E., Howarth, H., Weisberg, J., Shestopalov, V. I., Shah, S. B. (2017). Pannexin 1 Modulates Axonal Growth in Mouse Peripheral Nerves. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(November), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00365>
- Huang, H., & Trussel, L. O. (2008). Control of presynaptic function by a persistent Na⁺ current. *Neuron*, 60(9), 975–979. <https://doi.org/10.1109/TMI.2012.2196707>. Separate
- Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron*, 80(3), 704–717. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.025>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J.

- (2013). *Principles of Neural Science* (Fifth edit).
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., & Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(18), 4702–4711. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008>
- Korobova, F., & Svitkina, T. (2008). Arp2/3 Complex Is Important for Filopodia Formation, Growth Cone Motility, and Neuritegenesis in Neuronal Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 19(1), 308–317. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>
- Kreiner, G. (2015). Compensatory mechanisms in genetic models of neurodegeneration: are the mice better than humans? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(March), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00056>
- Lai, C. P. K., Bechberger, J. F., Thompson, R. J., MacVicar, B. A., Bruzzone, R., & Naus, C. C. (2007). Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells. *Cancer Research*, 67(4), 1545–1554. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1396>
- Lapato, A. S., & Tiwari-Woodruff, S. K. (2017). Connexins and pannexins: At the junction of neuro-glial homeostasis & disease. *Journal of Neuroscience Research*, 96(1), 31–44. <https://doi.org/10.1002/jnr.24088>
- Letellier, M., Park, Y. K., Chater, T. E., Chipman, P. H., Gautam, S. G., Oshima-Takago, T., & Goda, Y. (2016). Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(19), E2685-2694. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523717113>
- Lisman, J. E., Raghavachari, S., & Tsien, R. W. (2007). The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(8), 597–609. <https://doi.org/10.1038/nrn2191>
- Lissin, D. V., Gomperts, S. N., Carroll, R. C., Christine, C. W., Kalman, D., Kitamura, M., von Zastrow, M. (1998). Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 7097–7102. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7097>
- Llinás, R. (1982). Calcium in Synaptic Transmission.

- Llinás, R., Steinberg, I. Z., & Walton, K. (1981). Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophysical Journal*, 33(3), 323–351. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(81\)84899-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(81)84899-0)
- Locovei, S., Bao, L., & Dahl, G. (2006). Pannexin 1 in erythrocytes: Function without a gap. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(20), 7655–7659. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601037103>
- Locovei, Silviu, Scemes, E., Qiu, F., Spray, D. C., & Dahl, G. (2007). Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X7 receptor death complex. *FEBS Letters*, 581(3), 483–488. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.12.056>
- Loewi, O., & Navratil, E. (1924). Über humorale Übertragbarkeit der Herznerve Wirkung - VII. Mitteilung. *Pflügers Archiv Für Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere*, 206(1), 135–140. <https://doi.org/10.1007/BF01722758>
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1), 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>
- Marder, E., & Goaillard, J.-M. (2006). Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nature Reviews*, 7(July), 563–574. <https://doi.org/10.1038/nrn1949>
- Müller, M., & Davis, G. W. (2012). Transsynaptic control of presynaptic Ca²⁺ influx achieves homeostatic potentiation of neurotransmitter release. *Current Biology*, 22(12), 1102–1108. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.018>
- Muller, M., Liu, K. S. Y., Sigrist, S. J., & Davis, G. W. (2012). RIM Controls Homeostatic Plasticity through Modulation of the Readily-Releasable Vesicle Pool. *Journal of Neuroscience*, 32(47), 16574–16585. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0981-12.2012>
- Müller, M., Pym, E. C. G., Tong, A., & Davis, G. W. (2011). Rab3-GAP Controls the Progression of Synaptic Homeostasis at a Late Stage of Vesicle Release. *Neuron*, 69(4), 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.025>

- Murthy, V. N. (1998). Synaptic plasticity : Step-wise strengthening, 650–653.
- Murthy, V. N., Schikorski, T., Stevens, C. F., Zhu, Y., & Jolla, L. (2001). Inactivity produces increases in Neurotransmitter Release and Synapse Size. *Neuron*, 32, 673–682.
- Murthy, V. N., Sejnowski, T. J., & Stevens, C. F. (1997). Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron*, 18(4), 599–612. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80301-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80301-3)
- Mutch, S. M., Chiu, D. T., Lorenz, R. M., Schiro, P. G., Fujimoto, B. S., Mutch, S. A., Kuyper, C. L. (2011). Protein Quantification at the Single Vesicle Level Reveals That a Subset of Synaptic Vesicle Proteins Are Trafficked with High Precision. *Journal of Neuroscience*, 31(4), 1461–1470. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3805-10.2011>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo — Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo — Supporting Online Material, 308(May), 1314–1319. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- O'Brien, R. J., Kamboj, S., Ehlers, M. D., Rosen, K. R., Fischbach, G. D., & Huganir, R. L. (1998). Activity-Dependent Modulation of Synaptic AMPA Receptor Accumulation death due to the induction of local circuit epileptiform activity. We have previously reported that blockade of excit. *Neuron*, 21(1989), 1067–1078.
- Orellana, J. A., Sáez, P. J., Shoji, K. F., Schalper, K. A., Palacios-Prado, N., Velarde, V., Sáez, J. C. (2009). Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(2), 369–399. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2130>
- Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Haydon, P. G. (2005). Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science*, 310(5745), 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.1116916>
- Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO Journal*, 25(21), 5071–5082. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>
- Penuela, S., Gehi, R., & Laird, D. W. (2013). The biochemistry and function of pannexin

- channels. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.017>
- Penuela, S., Harland, L., Simek, J., & Laird, D. W. (2014). Pannexin channels and their links to human disease. *Biochemical Journal*, 461(3), 371–381. <https://doi.org/10.1042/BJ20140447>
- Penuela, S., Lohman, A. W., Lai, W., Gyenis, L., Litchfield, D. W., Isakson, B. E., & Laird, D. W. (2014). Diverse post-translational modifications of the pannexin family of channel-forming proteins. *Channels*, 8(2), 124–130. <https://doi.org/10.4161/chan.27422>
- Penuela, S., Bhalla, R., Nag, K., and Laird D. W. (2009). Glycosylation Regulates Pannexin Intermixing and Cellular Localization. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 4313–4323. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
- Perea, G., & Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5841), 1083–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1144640>
- Perea, G., & Araque, A. (2010). GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.10.005>
- Pereda, A. E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(4), 250–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3708>
- Perez de Arce, K., Schrod, N., Metzbower, S. W. R., Allgeyer, E., Kong, G. K. W., Tang, A. H., Biederer, T. (2015). Topographic Mapping of the Synaptic Cleft into Adhesive Nanodomains. *Neuron*, 88(6), 1165–1172. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.011>
- Pozo, K., & Goda, Y. (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, 66(3), 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.028>
- Prochnow, N., Abdulazim, A., Kurtenbach, S., Wildf??rster, V., Dvorianchikova, G., Hanske, J., Zoidl, G. (2012). Pannexin1 Stabilizes Synaptic Plasticity and Is Needed for Learning. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051767>
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.

- O., & Williams, S. M. (2004). *Neuroscience* (Third edit). <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000154473.43364.47>
- Rizzoli, S. O., & Betz, W. J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(1), 57–69. <https://doi.org/10.1038/nrn1583>
- Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., & Stainier, D. Y. R. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*, 524(7564), 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature14580>
- Sahu, G., Sukumaran, S., & Bera, A. K. (2014). Pannexins form gap junctions with electrophysiological and pharmacological properties distinct from connexins. *Scientific Reports*, 4, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep04955>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Shestopalov, V. I., & Panchin, Y. (2008). Pannexins and gap junction protein diversity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(3), 376–394. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7200-1>
- Silverman, W. R., Juan Pablo de Rivero Vaccari, Silviu Locovei, Feng Qiu, S. K. C., Scemes, E., Keane, R. W., & Dahl, G. (2009). The Pannexin 1 Channel Activates the Inflammasome in Neurons and Astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 18143–18151. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.004804>
- Stan, A., Pielarski, K. N., Brigadski, T., Wittenmayer, N., Fedorchenko, O., Gohla, A., Gottmann, K. (2010). Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 11116–11121. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914233107>
- Steinmetz, C. C., & Turrigiano, G. G. (2010). TNF α signaling maintained the ability of cortical synapses to express synaptic scaling. *Journal of Neuroscience*, 30(44), 14685–14690. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2210-10.2010.TNF>
- Stellwagen, D., & Malenka, R. C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, 440(7087), 1054–1059. <https://doi.org/10.1038/nature04671>

- 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. <https://doi.org/10.1002/glia.22338>
- Südhof, T. C. (2004). The Synaptic Vesicle Cycle. *Annu. Rev. Neurosci*, *27*, 509–547. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
- Südhof, T. C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron*, *75*(1), 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>
- Thiagarajan, T. C., Lindskog, M., Malgaroli, A., & Tsien, R. W. (2007). LTP and adaptation to inactivity: Overlapping mechanisms and implications for metaplasticity. *Neuropharmacology*, *52*(1), 156–175. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.030>
- Thiagarajan, T. C., Lindskog, M., & Tsien, R. W. (2005). Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron*, *47*(5), 725–737. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.037>
- Thompson, R. J. (2006). Ischemia Opens Neuronal Gap Junction Hemichannels. *Science*, *312*(5775), 924–927. <https://doi.org/10.1126/science.1126241>
- Thompson, Roger 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 (New York, N.Y.)*, *322*(5907), 1555–1559. <https://doi.org/10.1126/science.1165209>
- Turrigiano, G. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: Local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005736>
- Turrigiano, G.G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C., & Nelson, S. B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, *391*(February), 1–5. Retrieved from papers2://publication/uuid/B4EA1ABC-3324-45B4-A534-0CA0445BBD25
- Turrigiano, G G, & Nelson, S. B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat.Rev.Neurosci*, *5*(2), 97–107. <https://doi.org/10.1038/nrn1327>
- Turrigiano, Gina G. (2008). The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory

- Synapses. *Cell*, 135(3), 422–435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.008>
- Turrigiano, Gina G., & Nelson, S. B. (2000). Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(3), 358–364. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00091-X)
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2014). Astroglial cradle in the life of the synapse. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1654). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0595>
- Vinken, M., Decrock, E., Leybaert, L., Bultynck, G., Himpens, B., Vanhaecke, T., & Rogiers, V. (2012). Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(8), 2002–2008. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.06.011>
- Vitureira, N., & Goda, Y. (2013). The interplay between hebbian and homeostatic synaptic plasticity. *Journal of Cell Biology*, 203(2), 175–186. <https://doi.org/10.1083/jcb.201306030>
- Vitureira, N., Letellier, M., White, I. J., & Goda, Y. (2012). Differential control of presynaptic efficacy by postsynaptic N-cadherin and β -catenin. *Nature Neuroscience*, 15(1), 81–89. <https://doi.org/10.1038/nn.2995>
- Vogt, A., Hormuzdi, S. G., & Monyer, H. (2005). Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Molecular Brain Research*, 141(1), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.08.002>
- Wang, J., & Dahl, G. (2010). SCAM analysis of Panx1 suggests a peculiar pore structure. *The Journal of General Physiology*, 136(5), 515–527. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010440>
- Whyte-fagundes, P., Kurtenbach, S., Zoidl, C., Shestopalov, V. I., Carlen, P. L., & Zoidl, G. (2018). A Potential Compensatory Role of Panx3 in the VNO of a Panx1 Knock Out Mouse Model, 11(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00135>
- Whyte-Fagundes, P., & Zoidl, G. (2018). Mechanisms of pannexin1 channel gating and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1860(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.07.009>
- Wicki-Stordeur, L. E., Dzugalo, A. D., Swansburg, R. M., Suits, J. M., & Swayne, L.

- (2012). Pannexin 1 regulates postnatal neural stem and progenitor cell proliferation. *Neural Development*, 7(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-11>
- Wicki-Stordeur, L. E., & Swayne, L. A. (2013). Panx1 regulates neural stem and progenitor cell behaviours associated with cytoskeletal dynamics and interacts with multiple cytoskeletal elements. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-62>
- Wicki-Stordeur, L. E., & Swayne, L. A. (2014). The emerging Pannexin 1 signalome: a new nexus revealed? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(January), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00287>
- Wierenga, C. J., Walsh, M. F., & Turrigiano, G. G. (2006). Temporal Regulation of the Expression Locus of Homeostatic Plasticity. *Journal of Neurophysiology*, 96(4), 2127–2133. <https://doi.org/10.1152/jn.00107.2006>
- Wilson, N. R., Kang, J., Hueske, E. V., Leung, T., Varoqui, H., Murnick, J. G., Liu, G. (2005). Presynaptic Regulation of Quantal Size by the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1. *Journal of Neuroscience*, 25(26), 6221–6234. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3003-04.2005>
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., & Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends in Immunology*, 36(10), 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.008>
- Zoidl, G., Petrasch-Parwez, E., Ray, A., Meier, C., Bunse, S., Habbes, H. W., Dermietzel, R. (2007). Localization of the pannexin1 protein at postsynaptic sites in the cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 146(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.061>
- Zoidl, Georg, Locovei, S., Bunse, S., Dahl, G., Schmidt, M., Qiu, F., & Dermietzel, R. (2009). The potassium channel subunit Kv β 3 interacts with pannexin 1 and attenuates its sensitivity to changes in redox potentials. *FEBS Journal*, 276(21), 6258–6270. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07334.x>