

Tesis de Maestría en Biología

Opción Neurociencias

PEDECIBA

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Canales de comunicación intercelular compuestos de conexinas
en astrocitos: Modulación por FGF-1 y ATP

Juan Mauricio Garré Castro

28 de Junio, 2005

Orientadores: Dra. Verónica Abudara

Dra. Patricia Cassina

Co-orientador: Dr. Juan Carlos Sáez

Tribunal

Presidente: Dr. Gustavo Brum

Vocales: Dr. Angel Caputi y Dra. Mónica Marin

1- Resumen

Los astrocitos se encuentran funcionalmente acoplados a través de uniones en hendidura o uniones "gap". Las uniones en hendidura están formadas por cientos de canales intercelulares o de unión generados por la aposición simétrica de dos hemicanales (o conexones) compuestos a su vez de seis subunidades proteicas, las Conexinas. Los hemicanales o conexones son aportados por células adyacentes. Los canales intercelulares permiten la comunicación directa del fluido intracelular de dos células vecinas. Las uniones en hendidura proveen la base morfológica para la formación de sincicios o redes funcionales entre astrocitos. En los últimos años, evidencias crecientes indican que los hemicanales expuestos al medio extracelular pueden actuar funcionalmente en la membrana que no forma unión en hendidura aunque la regulación de los mismos recién comienza a entenderse.

Los astrocitos responden a diferentes noxas o estímulos mediante la adquisición de fenotipos neuroinflamatorios o reactivos. El FGF-1 es uno de los factores que han sido involucrados como un inductor de reactividad glial.

En esta tesis estudiamos los efectos del FGF-1 en la comunicación celular mediada por canales compuestos de conexinas en el contexto de la reacción inflamatoria desarrollada por astrocitos espinales. Para ello utilizamos técnicas funcionales y de detección inmune en cultivos primarios de astrocitos derivados de la médula espinal de rata.

Nuestros resultados muestran que, (a) los astrocitos espinales expresan hemicanales compuestos de Cx43 y Cx45, (b) el FGF-1 aumenta la cantidad de hemicanales funcionales en la membrana que no forma unión en hendidura al tiempo que reduce el acoplamiento intercelular, y (c) el aumento de la permeabilidad dependiente de hemicanales requiere de la activación previa de canales purinérgicos ionotrópicos y de la presencia de ATP en el medio extracelular.

La presencia de hemicanales funcionales expuestos en la membrana que no forma unión en hendidura, permitiría la liberación de moléculas de señalización parácrina tales como ATP, NAD⁺ o glutamato al espacio extracelular posibilitando así la sincronización metabólica sin la necesidad de una vía de comunicación intracelular entre astrocitos reactivos.

2-Introducción

Históricamente se había asignado un papel pasivo a los astrocitos en las funciones del sistema nervioso. El avance en las técnicas de biología molecular y bioquímica, la obtención de cultivos primarios puros y la aproximación molecular de la actividad de canales iónicos en los últimos 20 años, han permitido incrementar la comprensión de la fisiología de los astrocitos. Esto ha generado una nueva perspectiva en el conocimiento de la neurociencia, que obliga a replantearse el papel de estas células en procesos neurobiológicos tales como la neurotransmisión, la comunicación intercelular no-sináptica, el desarrollo del sistema nervioso y la neurodegeneración, e incluso la cognición.

La comunicación intercelular entre astrocitos puede ser mediada por canales compuestos de conexinas (Cxs). Los astrocitos se encuentran funcionalmente acoplados a través de uniones en hendidura o "*gap*". Las uniones en hendidura están formadas por cientos de canales intercelulares o de unión generados por la aposición simétrica de dos hemicanales (o conexones) compuestos a su vez de seis subunidades proteicas, las conexinas. Los hemicanales o conexones son aportados por células adyacentes. Los canales intercelulares permiten la comunicación directa del fluido intracelular de células vecinas. Por dicha propiedad, las uniones en hendidura proveen la base morfológica para la formación de sincicios o redes funcionales entre astrocitos.

El descubrimiento de hemicanales funcionales expuestos en la membrana que no forma unión en hendidura ha cambiado la concepción de muchos científicos dedicados al estudio de la comunicación intercelular mediada por canales de conexinas. Esta vía alternativa de comunicación permitiría la sincronización de redes de astrocitos a través del espacio extracelular sin la necesidad de una vía intracelular.

Frente al estímulo de diversas noxas o agentes pro-inflamatorios, los astrocitos adquieren cambios reactivos caracterizados por cambios morfológicos y aumento en la producción de mediadores de la inflamación tales como factores de crecimiento, radicales libres del oxígeno y diversas citoquinas. Todos estos mediadores inflamatorios han sido sugeridos como candidatos para regular los procesos de comunicación intercelular mediada por canales compuestos de conexinas.

Esta tesis tuvo como objetivo el estudio de la regulación de la comunicación intercelular mediada por canales compuestos de conexinas, en el contexto de una

reacción inflamatoria desarrollada por los astrocitos espinales en cultivo ante la exposición al factor de crecimiento fibroblástico (FGF-1).

3- Antecedentes

3.1 Los astrocitos se comunican entre sí a través de canales intercelulares formados por conexinas

Las conexinas (Cxs) son proteínas integrales de membrana que oligomerizan en hexámeros, denominados conexones o hemicanales de las uniones en hendidura. La aposición simétrica de dos hemicanales en células adyacentes forma canales intercelulares o de unión, y un conglomerado de éstos forma las denominadas uniones comunicantes, en hendidura o uniones “gap”. Esta unión de baja resistencia eléctrica permite el intercambio de iones, segundos mensajeros y moléculas de menos de 1kDa a través de una vía intercelular sin la intervención del fluido extracelular (Giaume y McCarthy, 1996; Bruzzone y Ressot, 1997). Mediante el empleo de trazadores de permeabilidad de uso experimental como el Amarillo Lucifer (AL), Bromuro de Etidio, (BrEt), o Neurobiotina que atraviesan las uniones en hendidura se ha podido estimar que el diámetro equivalente del canal intercelular es aproximadamente 1.2 nm en vertebrados y algo mayor en insectos (Schwarzmann y col, 1981), (figura 1). Las Cxs constituyen miembros de una familia multigénica y son reguladas y expresadas de manera específica de acuerdo al tejido considerado (Bennett y col, 1991, Willecke y col, 2002). Al momento actual se han clonado y secuenciado 20 miembros en roedores y 21 en humanos (Söhl y Willecke, 2004). Las Cxs se denominan de acuerdo al peso molecular (en kDa) predictivo de su secuencia génica. La Cx expresada principalmente por los astrocitos en cultivo es la Cx43, aunque se han detectado bajos niveles de otras Cxs, incluyendo Cx26, Cx30, Cx40, y Cx45 (Giaume y McCarthy, 1996; Dermietzel y col, 2000; Rash y col, 2001).

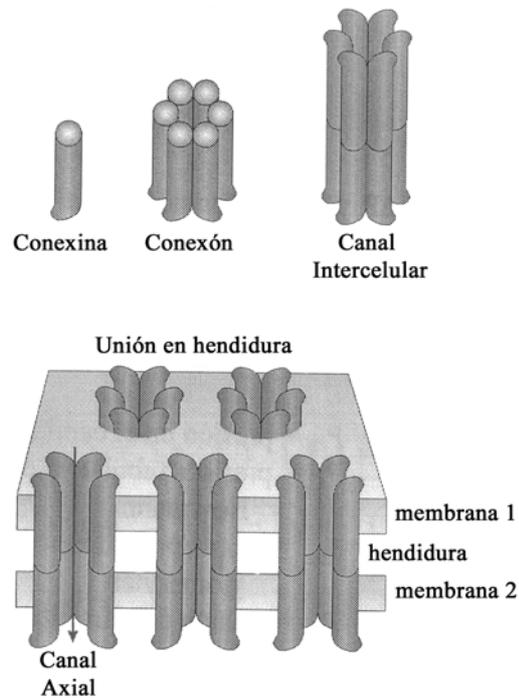


Figura 1 - Representación esquemática de conexas, conexones, canales intercelulares y uniones en hendidura.

El diagrama muestra un monómero de conexina, el ensamblaje hexamérico de conexas para formar un conexón o hemicanal y la aposición de dos conexones para formar un canal intercelular dodecamérico. Los canales intercelulares se agrupan a nivel de las uniones en hendidura que dejan a su nivel un espacio extracelular de 2 nm (gap o hendidura) que separa las membranas plasmáticas adosadas de las células en aposición. Cada canal intercelular posee un poro central o canal axial que permite el intercambio directo de iones y moléculas entre los citoplasmas de las células. Tomado de Goodenough et Paul, 2003.

La presencia de uniones en hendidura en astrocitos de mamíferos se ha confirmado *in situ* por microscopía electrónica y crio-fractura, tanto en la sustancia blanca como en la gris (Dermietzel, 1976; Masa y Mugnaini, 1982). Los astrocitos en cultivos confluentes están funcionalmente acoplados a través de uniones en hendidura. Las uniones en hendidura proveen la base morfológica para la formación de sincicios y redes funcionales en astrocitos. Estas redes son transitorias y dinámicas pudiendo transmitir una variedad de señales para ajustar el tono de la actividad neuronal (Giaume y McCarthy, 1996). Se ha propuesto que las uniones en hendidura participan en las siguientes funciones de los astrocitos: disipación y homeostasis de iones K^+ , aporte de nutrientes metabólicos a las neuronas, regulación del volumen y de la proliferación

celular y señalización intercelular de calcio a distancia entre astrocitos y entre astrocitos y neuronas (ondas de calcio) (Giaume y McCarthy, 1996; Araque y col, 2001; Venance y col, 2001; Hoffer y col, 2002).

3.2 Los canales compuestos por Cxs presentan selectividad iónica y metabólica

Durante muchos años se había considerado que los canales intercelulares compuestos por Cxs no presentaban selectividad al pasaje de iones o moléculas menores de 1kDa; sin embargo, distintos estudios muestran que algunos de estos canales pueden presentar cierta selectividad en su permeabilidad, aunque esta propiedad es diferente de la clásicamente descrita para los canales iónicos sensibles al voltaje. La selectividad iónica de estos últimos, tales como los canales de sodio o de potasio sensibles al voltaje, es de varios órdenes de magnitud mayor que la de los canales compuestos por Cxs.

Los primeros aportes que comenzaron a cambiar idea de la ausencia de selectividad de los canales compuestos por Cxs provienen de Veenstra y colaboradores (Veenstra y col, 1994). Ellos definieron coeficientes que relacionan la permeabilidad a aniones y a cationes para distintos tipos de Cxs. Los coeficientes de permeabilidad anión /catión fueron de, 0.12 para la Cx45 de pollo y 0.43 para la Cx37 humana. Estudios más recientes relacionan el coeficiente de permeabilidad para un catión o un anión sobre un valor de referencia, la permeabilidad al potasio estimada por doble fijación de voltaje bajo configuración célula entera (Valiunas y col, 2002; Goldberg y col, 2004). Estos estudios mostraron que los coeficientes de permeabilidad al AL (PM= 443, carga eléctrica - 2) con relación a la permeabilidad de potasio fueron 0.028, 0.01 y 0.0025 para la Cx43, Cx45, Cx40 respectivamente. Es de hacer notar que a pesar de que la conductancia unitaria de los canales intercelulares de Cx45 (30 - 50 pS) es menor que la de Cx40 (> 150 pS), la permeabilidad al AL en relación con la de potasio, o dicho de otra manera, el flujo de colorante por el canal, es mayor en los canales de Cx45 que en los de Cx40. Por lo tanto no existe una correlación entre la conductancia individual de los canales intercelulares y sus propiedades de selectividad a solutos de cientos de kDa como el AL o el BrEt. Bruzzone ya había sugerido que este tipo de propiedades podría ser explicado por la presencia de compartimentos metabólicos y/o iónicos formados transitoriamente en los diferentes subestados de conductancia que muestran algunos canales de Cxs (Bruzzone y col, 1996; Bukauskas y col, 1995; Moreno y col, 1995).

Algunos de los canales intercelulares compuestos por conexinas expresados en astrocitos, presentarían permeabilidades selectivas que dependen del tipo de Cx que forma el canal, es decir, conexina-específicas (Bruzzone y col, 1996). Los canales compuestos por Cx43, muestran menor selectividad que los formados por las otras Cxs (Cx40, Cx45, Cx26) expresadas por los astrocitos (Nicholson y col, 2000). En particular, en los astrocitos el acoplamiento intercelular está mediado principalmente por canales intercelulares de Cx43, lo cual resulta ventajoso en el mantenimiento de la homeostasis iónica. La baja selectividad de los canales de Cx43 facilita la disipación de potasio y el equilibrio en las concentraciones intracelulares de metabolitos como el ATP, el IP₃ y la glucosa, a través del sincicio celular. Los canales intercelulares de Cx43 entonces permiten que se alcance más fácilmente el equilibrio en las concentraciones de esos metabolitos a ambos lados de la membrana de unión entre astrocitos acoplados, y así, en toda la red. Si el acoplamiento intercelular fuera mediado por canales de Cx45 o Cx40, cualquier cambio metabólico generado en una célula (o en un grupo pequeño de células) sería más difícil de transmitir a las vecinas y se acumularían metabolitos en unas células mientras que disminuirían en otras. Esto último es lo que sucede en redes de astrocitos *knock-out* para la Cx43, o en astrocitos pobremente acoplados como los derivados de médula espinal (Scemes y col, 2000). En este caso tomarían relevancia otras vías (de difusión extracelular) para mantener sincronizado el estado metabólico de la red de células.

3.3 La permeabilidad de las uniones en hendidura puede ser modulada

La permeabilidad de las uniones en hendidura es susceptible de modulación por diversos agentes y estímulos (Abudara y col, 1998; 2002). Los mecanismos celulares subyacentes a la regulación de la permeabilidad intercelular total dependen del número de canales intercelulares funcionales.

El *gating* (transiciones reversibles entre aperturas y cierres) de canales intercelulares formados por Cxs es sensible a diferencias de potencial generadas a través de la unión en hendidura (*voltaje trans-union*). El rango de sensibilidad a voltaje es dependiente del tipo de Cx que forma el canal (Spray et al, 1998).

Importantes aumentos en la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) y descensos en el pH_i disminuyen la probabilidad de apertura de los canales y por lo tanto la permeabilidad de las uniones en hendidura.

Modificaciones de tipo covalente pueden afectar las propiedades cinéticas de los canales de Cxs. La mayoría de las Cxs (excepto la Cx26) son fosfoproteínas y la fosforilación en residuos de serina y/o tirosina pueden alterar además el *gating* de los canales en forma específica del tejido considerado (Sáez y col, 2003).

El grado y el estado funcional del acoplamiento entre los astrocitos se encuentra además influenciado por una inmensa variedad de neurotransmisores, factores de crecimiento y citoquinas presentes en el sistema nervioso de mamíferos.

Citoquinas tales como $IL1\beta$ (interleukina), $TNF\alpha$ (factor de necrosis tumoral), CNTF (factor neurotrófico ciliar), y FGFs (factores de crecimiento fibroblástico), modulan el acoplamiento funcional entre astrocitos (Brosnan y col, 2001, Reuss , 2003). Diferentes tipos de factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs) modulan los niveles de Cx43 en astrocitos (Brosnan y col, 2001). Por ejemplo, el FGF-2 disminuye los niveles totales de Cx43 en astrocitos de corteza cerebral y estriado mientras que el FGF-5 lo hace en astrocitos de mesencéfalo. Estos efectos a largo plazo resultan en una disminución del acoplamiento intercelular mediado por uniones en hendidura (Reuss y Unsicker, 1998).

No han sido descritas hasta el momento modulaciones de los FGFs sobre los niveles totales de otras Cxs en astrocitos.

3.4 Los hemicanales de las uniones en hendidura participan en la comunicación intercelular en astrocitos

Evidencias recientes indican que, además de permitir la comunicación intercelular por una vía intracelular a través de las uniones en hendidura, las Cxs podrían participar en la señalización autócrina y parácrina mediante la exposición de hemicanales funcionales en la membrana plasmática que no forma unión en hendidura.

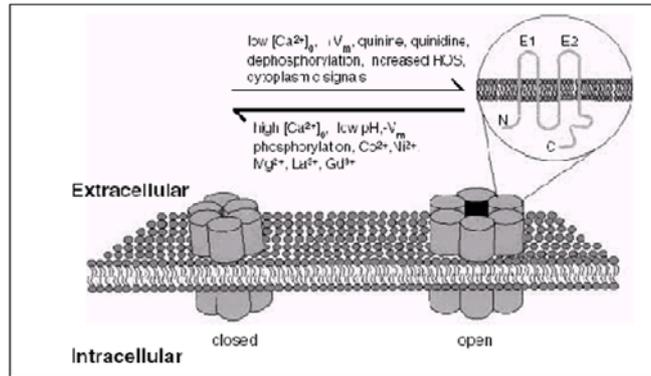


Figura 2 - Modulación del *gating* los hemicanales.

Las conexinas son proteínas trans-membrana con sus dominios carboxilo y amino terminal en el lado citoplasmático. La probabilidad de apertura de los hemicanales es incrementada por un descenso en la $[Ca^{2+}]_i$, la depolarización de la membrana, agentes farmacológicos como quinina y quinidina, e inhibición del metabolismo celular (situación en la cual se incrementa la defosforilación de Cx43 y aumenta la generación de especies reactivas del oxígeno). La probabilidad de apertura es disminuida por un descenso del pH_i , hiperpolarización de membrana, fosforilación de dominios citoplasmáticos, cationes polivalentes como Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , La^{3+} , Gd^{3+} e inhibidores de las uniones en hendidura. Tomado de Sáez y colaboradores (Sáez y col, 2003).

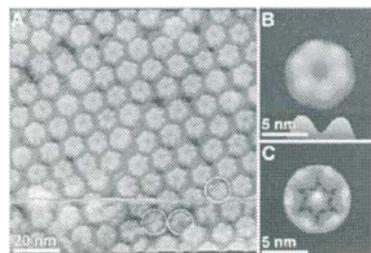


Figura 3 - Imágenes de hemicanales obtenidas por Microscopía de Fuerza Atómica

Registro en un medio carente de calcio de la superficie extracelular de los hemicanales mediante el empleo de Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) en (A). Se muestra un hemicanal (B) y su mapa promedio (C). Tomado de Müller y colaboradores (Müller y col, 2002).

La modulación de la permeabilidad de hemicanales obedece a muchos de los mecanismos clásicos descritos para las uniones en hendidura (figura 2). Por ejemplo, el aumento de la permeabilidad de hemicanales en presencia de bajas concentraciones de

calcio extracelular (figuras 3 y 4), su sensibilidad al voltaje (en este caso sería al potencial de membrana en lugar del potencial *trans-unión*), la regulación del *gating* por fosforilación (Müller y col, 2002; Contreras, 2002; Stout y col, 2002; Ploktin, 2002) y su sensibilidad a agentes farmacológicos empleados para inhibir las uniones en hendidura como octanol, heptanol, α -GA, y carbenoxelona entre otros

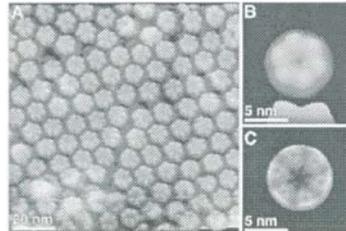


Figura 4 - El aumento del calcio extracelular induce un cambio conformacional de la superficie extracelular del hemicanal

Las figuras (A), (B) y (C) se encuentran en las mismas condiciones que en la figura 3. Tomado de Müller y colaboradores (Müller y col, 2002).

De la misma forma que los canales de uniones en hendidura, los hemicanales además, son permeables a moléculas cuyo peso molecular es menor a un 1,2 kDa y cuya carga eléctrica es positiva y/o negativa a pH fisiológico (Contreras y col, 2002; Bruzzone, 1996). En astrocitos, los hemicanales de Cx43 son permeables a pequeñas moléculas de importancia fisiológica como ATP, NAD^+ , glutamato (figura 5), y regulan la liberación de prostaglandinas en células osteoblásticas lo cual abre una serie de especulaciones acerca del papel fisiológico que estos canales podrían tener (Stout y col, 2002; Bruzzone y col, 2000; Zu-Cheng Ye y col, 2003, Cherian y col, 2005).

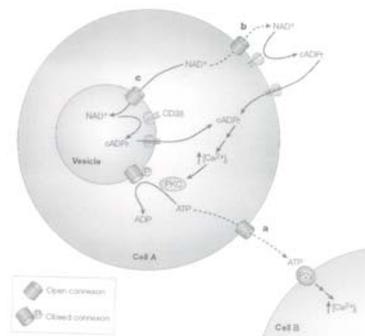


Figura 5 - Liberación de moléculas de señalización parácrina por hemicanales

La apertura de hemicanales en astrocitos aumenta la liberación de ATP al medio extracelular (a) lo que podría activar receptores purinérgicos P2Y en células adyacentes e iniciar una onda de calcio. Los hemicanales podrían ser una vía para que el NAD⁺ alcance a la ectoenzima CD38, la cual lo convierte a ADPr (b). El movimiento de ADPr hacia el interior causa un incremento del calcio intracelular.

La apertura de los hemicanales de Cx43 puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Contreras y col, 2003; Stout y col, 2002; Stout y Charles, 2003; Sáez y col, 2003), (figura 6).

Estudios electrofisiológicos mostraron que los hemicanales de Cx43 tienen una baja probabilidad de apertura en condiciones fisiológicas (Contreras y col, 2003). Sin embargo desde el punto de vista fisiológico, la apertura de hemicanales se ha implicado en la modulación de la transmisión sináptica en la retina (Xia et al, 2003; Pottek et al, 2003) y más recientemente en la inducción de la formación de uniones en hendidura funcionales entre ovocitos (Beahm y col, 2004). En un trabajo muy reciente, Weissman y colaboradores demostraron que los hemicanales son esenciales para la iniciación de la transmisión de ondas de calcio espontáneas de la glía radial durante el desarrollo de la neocorteza (Weissman y col, 2004). Los hemicanales además permiten la liberación de ATP del epitelio pigmentado de la retina lo que favorece la proliferación celular en la retina neural (Pearson y col, 2005).

Los hemicanales han sido estudiados además en situaciones patológicas. Novedosas evidencias indican que los hemicanales de Cx43 localizados en la membrana que no forma unión en hendidura de los astrocitos corticales aumentan considerablemente su permeabilidad durante la inhibición del metabolismo celular (Contreras y col, 2002), (figura 6). Este proceso parecería depender de la acumulación de radicales libres del O₂ y del óxido nítrico (Contreras y col, 2004). En las situaciones de isquemia se reducen los niveles intracelulares de ATP, lo que también se ha asociado con la apertura de hemicanales en astrocitos (Contreras, 2003), miocardiocitos, y células del túbulo proximal renal (Kondo y col, 1999; Vergara y col, 2003). Estos resultados han sido materia de discusión (Spray, 2003; Parpura y col, 2004, Giaume y col, 2004) ya que la apertura ha sido detectada en situaciones experimentales particulares tales

como baja concentración extracelular de cationes divalentes o inhibición del metabolismo celular. Se ha argumentado que estos fenómenos reflejan la exageración de

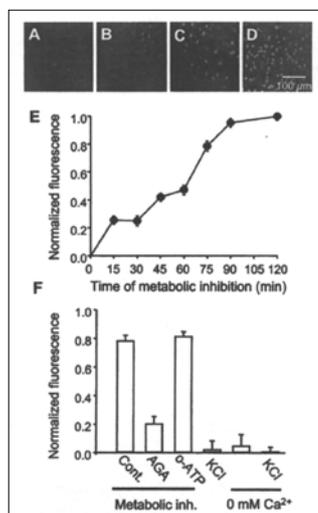


Figura 6 - Hemicanales formados por Cx43 aumentan su permeabilidad durante la inhibición metabólica de astrocitos corticales

Se muestra el aumento de la captación a Bromuro de Etidio por astrocitos corticales a tres tiempos diferentes luego de la inhibición del metabolismo celular en (A), (B), (C) y (D). En (E) se grafica el curso temporal del aumento en la fluorescencia de células que captaron el colorante. La captación de Bromuro de Etidio es inhibida por el ácido α -GA, pero no por el ATPo (F). Tomado de Contreras y colaboradores (2003).

una vía de comunicación intercelular que opera normalmente (o en algunas condiciones patológicas) por ejemplo, para la transmisión de ondas de calcio mediadas por ATP o glutamato (Stout y col, 2003; Bennett y col, 2003; Sáez y col, 2003; Contreras y col, 2004) o, precediendo procesos relacionados con la muerte celular apoptótica (Contreras y col, 2002; Kalvelyte y col, 2003).

A diferencia de la extensa bibliografía concerniente a la modulación de los canales intercelulares de las uniones en hendidura y al creciente interés en buscar situaciones experimentales en las cuales los hemicanales operen funcionalmente, al momento actual existen pocos reportes que indaguen sobre los mecanismos que regulan el estado funcional de los hemicanales, y prácticamente todos los reportes tratan sobre hemicanales formados de Cx43.

Dado que existen antecedentes sobre la regulación de canales intercelulares compuestos de Cxs por una extensa cantidad de factores de crecimiento y citoquinas, y que estos últimos tienen importantes implicancias en el desarrollo de modelos neuropatológicos, nos planteamos el problema de la regulación de hemicanales en astrocitos espinales que están desarrollando una respuesta inflamatoria inducida por FGF-1.

3.5 El FGF-1 es un activador de astrocitos espinales

En enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central, ocurre una reacción astrocitaria denominada gliosis reactiva, que se traduce por un aumento en el número de células y un cambio morfológico acompañado de una redistribución de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un aumento en la producción de factores neurotróficos y citoquinas, y la expresión de las enzimas tales como óxido nítrico sintasa y ciclooxigenasa-2 (McGeer y McGeer, 2002; Levine y col, 1999). En esta situación, los astrocitos podrían contribuir en la muerte de neuronas circundantes (Cassina y col, 2002). Existen evidencias de que mientras los astrocitos normales en cultivo facilitan y promueven la supervivencia de motoneuronas, por ejemplo, los astrocitos activados son fuertemente citotóxicos para estas células. Entre los factores que podrían estar implicados en la generación de reactividad astrocitaria se encuentra los factores de crecimiento fibroblástico.

La familia de factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs) se compone de más de 20 proteínas relacionadas que se unen a heparina de los cuales FGF-1 y FGF-2 son los miembros mejor caracterizados. Estos factores se han involucrado en la regulación de múltiples procesos biológicos que incluyen crecimiento y diferenciación celular, inflamación, angiogénesis y cicatrización (Burgess y Maciag, 1989; Szebenyi y Fallon, 1999). En el sistema nervioso central, el FGF-1 se detecta en múltiples tipos neuronales, pero es particularmente abundante en motoneuronas espinales (Elde y col, 1991; Eckenstein, 1994; Kresse y col, 1995). El FGF-1 no se libera de manera clásica a través del retículo endoplásmico, Golgi y exocitosis, sino que utiliza un mecanismo alternativo desencadenado por diversas señales de daño celular tales como el estrés oxidativo (Jackson y col, 1992, Opalenick y col, 1995, 1998), hipoxia (Mouta Carreira y col,

2001) y privación de suero en cultivo (Shin y col, 1996). Los efectos de estos factores se ejercen a través de 4 receptores de tipo tirosina quinasa (Reuss y col, 2003): FGFR-1 a -4, de los cuales FGFR-1 está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central adulto fundamentalmente en poblaciones neuronales, pero también astrocitos (Reuss y col, 2003). La unión de los receptores al ligando depende en gran medida de la presencia de proteoglicanos (heparan sulfato) de la matriz extracelular. Los proteoglicanos actúan como receptores de FGFs de baja afinidad. Esta propiedad limita su sitio de acción al lugar donde son liberados.

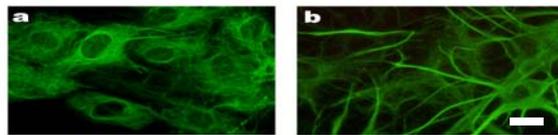
Los receptores de FGF están sujetos a una compleja regulación en los diversos tipos celulares y contribuyen a los cambios adaptativos que ocurren en situaciones fisiológicas y patológicas en el Sistema Nervioso Central. Por lo tanto, la movilización y señalización de FGF-1 podría alterarse en situaciones de daño en el sistema nervioso central.

El estímulo provocado por FGF-1 o FGF-2 determina la translocación del receptor hacia el núcleo celular. Se ha detectado la presencia de FGFR-1 completamente traslocado en el núcleo de varios tipos celulares incluyendo astrocitos (Gonzales y col, 1995; Stachowiak y col, 1996; Liu y Zhu, 1999; Clarke y col, 2001). La activación de los receptores de FGF dispara diversas cascadas de señalización intracelular, acopladas a la PLC y MAP/ERK quinasa, las cuales llevan a la activación de PKC, Crk y Shc, y Ras en algunos sistemas a la IP₃k (Reuss, 2003; Langford y col, 2005; Schulman y Roberts, 2004). Los astrocitos estimulados con FGF-1 proliferan, experimentan cambios morfológicos e inducen la expresión de NGF (Yoshida y Gage, 1991; Ono y col, 1991).

En astrocitos derivados de la médula espinal, el FGF-1 activa a dichas células y genera una transformación fenotípica a un estado reactivo (figura 7). Los astrocitos activados muestran una redistribución de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), y cambios morfológicos luego de 24 horas de incubación con FGF-1 además de inducir muerte neuronal en cocultivos de astrocito-motoneuronas (Cassina y col, 2005). Se ha descrito en un modelo de enfermedad neurodegenerativa, la Esclerosis Lateral Amiotrófica, que el FGF-1 probablemente liberado de motoneuronas en un entorno de estrés oxidativo activa a los astrocitos circundantes los cuales a su vez generan señales tóxicas que propagan la reactividad glial y promueven una selección de las neuronas dañadas (Cassina y col, 2005).

En forma interesante con nuestro proyecto, se ha reportado una correlación entre el estado reactivo de los astrocitos en situaciones patológicas (durante la injuria citotóxica y la isquemia) y alteraciones en la distribución y los niveles de conexas, en particular de la Cx43 (Ochalski y col, 1995; Hossain y col, 1994; Brosnan y col, 2001).

A



B

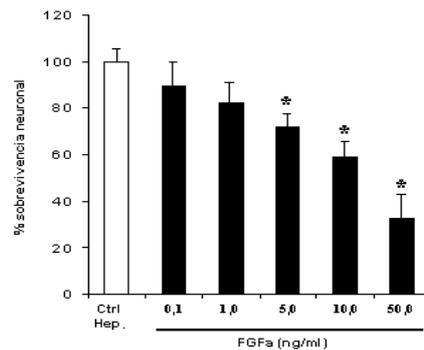


Figura 7 - El FGF-1 es un activador de astrocitos espinales en cultivo

A – Inmunofluorescencia anti-GFAP en monocapas de astrocitos cultivados luego de 24 h de exposición a: vehículo (a) o FGF-1 / heparina (10 ng/ml) en (b). Barra de calibración: 20 μ M.

B – Porcentaje de sobrevida neuronal obtenida luego del conteo bajo microscopio. Los datos se representan como porcentaje del control y son la media \pm DS de tres experimentos independientes. * = $p < 0.05$. Los astrocitos tratados con FGF-1 por 24 se vuelven fibrosos (A) y disminuyen la sobrevida de motoneuronas (B).

De estos trabajos se desprende además que el sincicio funcional en astrocitos reactivos es dinámico y puede reorganizarse mediante la modulación de la expresión de Cxs en forma dependiente del tipo de estímulo que lo desencadena y de la región del sistema nervioso involucrada.

En este contexto se desconoce si existe alguna relación entre la señalización de FGF-1/FGFR-1 en astrocitos reactivos y la exposición de hemicanales o su modulación, o incluso su participación en la alteración del fenotipo astrocitario.

3.6 Durante la gliosis reactiva existe una acumulación de factores difusibles purinérgicos en el medio extracelular

Otro de los factores que ha sido implicado en el desarrollo de la gliosis reactiva que caracteriza a los astrocitos durante situaciones patológicas es un aumento en los niveles extracelulares de ATP (Neary et al, 2004; Bianco y col, 2005). Los astrocitos reactivos incrementan considerablemente la liberación de ATP, el cual puede alcanzar concentraciones extracelulares de hasta 100 micromolar (Needergaard y col, 2004). El ATP puede ser liberado por los astrocitos mediante exocitosis, a través de hemicanales de uniones en hendidura, y posiblemente a través de sus propios receptores ionotrópicos, P2X, ya que estos últimos sufren modificaciones en el diámetro del poro ante la estimulación prolongada por su ligando, lo que los vuelve permeables a moléculas de un tamaño de hasta 800 kDa (North, 2002; Anderson y col, 2003; Stout y col, 2002; Sáez y col, 2003; Parpura y col, 2004).

Los efectos de este nucleótido sobre los astrocitos son mediados por dos tipos de receptores purinérgicos: los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (P2Y), y los receptores ionotrópicos (P2X). Aunque no está del todo claro todavía, el ATP participaría en la gliosis reactiva actuando a través de sus receptores P2Y, los cuales activarían vías de señalización intracelular relacionadas con el sistema de quinasas MAP/ERK (Brambilla y col, 2002; Neary y col, 2000). La posible implicancia de los receptores P2X en la gliosis reactiva radicaría en la modulación de la liberación de citoquinas (y posiblemente ATP) durante el proceso inflamatorio (Narcise y col, 2005).

Por otra parte, cuando se ha estudiado el efecto de FGF-1 o FGF-2 y ATP en cultivos de astrocitos se ha encontrado que existe una acción sinérgica entre ambos en estimular la síntesis de ADN (Neary y col, 1994).

4 - Hipótesis de Trabajo

Nuestra hipótesis de trabajo es que el FGF-1 aumenta el número de hemicanales funcionales presentes en la membrana que no forma unión en hendidura.

Trabajos previos han mostrado la existencia de hemicanales funcionales de la membrana que no forma unión en situaciones de daño celular. Dado que el FGF-1 es liberado durante situaciones de daño celular y es un potente activador de astrocitos, postulamos que la señalización por FGF interviene en la expresión de hemicanales. En segundo lugar, nuestra hipótesis predice que este efecto del FGF-1 estaría mediado por ligandos purinérgicos como el ATP (que también se liberan y acumulan durante la activación glial), activando vías de señalización que controlarían críticamente el grado de expresión de hemicanales y/o su estado funcional.

5-Objetivo general

Estudiar la regulación de canales de comunicación intercelular compuestos por conexinas, (a) hemicanales localizados en la membrana que no forma unión en hendidura, y (b) canales intercelulares de uniones en hendidura localizados en la membrana de unión, en el contexto de la activación de astrocitos espinales en cultivo ante la exposición a FGF-1.

6-Objetivos específicos

1. Investigar la presencia de hemicanales expuestos en la membrana que no forma unión en hendidura y su modulación por el FGF-1 en astrocitos espinales.
2. Investigar la modulación de los canales intercelulares de la membrana de unión por el FGF-1 en astrocitos espinales.
3. Investigar si los efectos del FGF-1 sobre la permeabilidad de los hemicanales son mediados por una molécula de señalización extracelular. Se estudiará en primer término al ATP como candidato.

7-Materiales y Métodos

7.1 Cultivos celulares de astrocitos de médula espinal

Los cultivos primarios de astrocitos expresan conexinas. Esto proporciona una simple y accesible preparación para estudiar las propiedades biofísicas y bioquímicas de los hemicanales y de los canales de uniones en hendidura.

Los cultivos primarios de astrocitos se realizaron como fueron previamente descritos por Saneto y de Vellis con algunas modificaciones según Cassina y colaboradores (Cassina y col, 2002). Para los cultivos de astrocitos se utilizaron neonatos de rata (1-2 días post-natales). Las ratas se decapitaron para luego diseccionar sus médulas espinales. El tejido obtenido se disoció en tripsina al 0.25% por 25 minutos a 37 °C. Las células se filtraron por una malla de disociación celular y se centrifugaron a 1000 revoluciones/minuto (rpm) por 10 minutos para luego plaquearse a una densidad de 1.5×10^6 células por 25 cm^2 en placas Nunc (Nuperville, IL) cubiertas con medio Dulbecco's modificado de Eagle, enriquecido con suero fetal bovino al 10 %, HEPES (3.6 g/l), NaHCO_3 (1,2 g/l), penicilina (100 UI/ml), y estreptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$). Cuando los cultivos alcanzaron confluencia se colocaron en un agitador orbital por 48 h a 2500 rpm a 37 °C, y luego se incubaron por otras 48 h con arabinósido de citosina (10 μM). La población celular fue amplificada al re-plaquear los cultivos en cajas de Petri (35 mm o 60 mm de diámetro) o en cubreobjetos de vidrio (12 mm de diámetro) según el caso. La monocapa presentó un alto grado de pureza, 98 % de astrocitos, lo que fue determinado por la inmunoreactividad para GFAP. Los cultivos no fueron positivos para células microgliales (marcador OX42).

7.2 Captación de colorantes por astrocitos espinales

Para investigar si los astrocitos sometidos a tratamiento con FGF-1 exponen hemicanales funcionales en su membrana que no forma unión en hendidura, determinamos si dichas células captan trazadores de permeabilidad de hemicanales desde el medio extracelular. Los cultivos de astrocitos se incubaron en una solución de Locke en presencia de AL (500 μM) o BrEt (10 μM) durante 5 min y 3 min

respectivamente. El AL tiene un PM de 443 y una carga de -2 , mientras que el BrEt, un agente intercalante del ADN celular, posee un PM de 394 y una carga de $+1$ al disociarse a pH fisiológico. Debido a su pequeño tamaño molecular, estas moléculas fluorescentes atraviesan las uniones en hendidura cuando se inyectan intracelularmente pasando a células vecinas acopladas (“acoplamiento de colorante”). Además, estos colorantes constituyen trazadores de permeabilidad de los hemicanales a los cuales atraviesan.

Luego de culminado el período de incubación, los astrocitos se lavaron tres veces en solución salina y se montaron en una cámara de perfusión para registrar las imágenes en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot). Se utilizaron filtros con espectro de excitación y de emisión para el AL (longitud de onda de excitación: 450 - 490 nm; longitud de onda de emisión: > 520 nm, y para el BrEt (longitud de onda de excitación: 528 nm; longitud de onda de emisión: 598 nm). Las imágenes de epifluorescencia se obtuvieron mediante una cámara digital conectada al microscopio. La cámara se conectó a su vez a una computadora. Las imágenes digitalizadas son exhibidas y analizadas utilizando software adecuado (Adobe Photoshop).

Para confirmar que la captación de los trazadores se debió a la apertura de hemicanales, las células se pre-trataron 15 a 30 minutos antes de la captación de colorante, con distintos inhibidores de las uniones en hendidura, tales como el ácido 18 α -glicirretínico (50 μM), la carbenoxelona (200 μM) y el octanol (1 mM).

Para descartar que las variaciones de la permeabilidad de la membrana que no forma unión en hendidura se debieran a cambios en la actividad de canales purinérgicos ionotrópicos, los astrocitos fueron pretratados 30 minutos antes del registro de la captación de colorante, con ATPo (200 μM), un antagonista selectivo de los canales P2X7 y con Suramina (200 μM), un antagonista purinérgico no selectivo.

La cuantificación de la captación de colorante se realizó mediante la obtención del nivel de luminosidad en unidades arbitrarias por el programa Adobe Photoshop. Definimos un índice de captación como la relación entre la diferencia de luminosidad entre las células que captaron (valor luminosidad promedio de 10 células permeabilizadas) y las que no captaron (valor de luminosidad promedio de 10 células no permeabilizadas: luminosidad del "background" o fondo) sobre este último valor de luminosidad (Índice de captación = fluorescencia células que captan menos

fluorescencia background / fluorescencia background). Los valores medios de los índices de captación de la células que captaron se encuentran a más de 2 errores estandar de los índices de captación de las que no captaron. El índice de captación representa así un valor normalizado de la captación celular de colorante con respecto al *background*.

7.3 Acoplamiento de colorante

El acoplamiento funcional entre astrocitos se puede medir en monocapas de astrocitos utilizando la técnica de acoplamiento de colorante en su variedad “scrape loading”o por inyección de colorantes a las células.

Para el *scrape loading* las células se incuban por 3 minutos en una solución que contiene en mM: NaCl (130), KCl (2.8), CaCl₂ (1), y HEPES (10); 10 mM glucosa ; pH = 7.2, a temperatura ambiente. Las células se lavan luego con la misma solución anterior pero sin calcio. El corte de la monocapa (“scrape”) se realiza con una hoja de bisturí en presencia de la solución libre de calcio conteniendo AL (1 mM) (PM 457 Da). La incubación con AL se realiza durante 8 minutos para esperar que los astrocitos se carguen de colorante y que el mismo difunda a través de las uniones en hendidura.

Para cuantificar el acoplamiento se tomó en cuenta los resultados obtenidos con el empleo de 18 α -glicirretínico 50 μ M, agente que bloquea el acoplamiento por uniones *gap* en forma irreversible. Cultivos de astrocitos tratados con 18 α -glicirretínico revela que las únicas células que pueden captar los colorantes desde el medio extracelular se encuentran en la primera fila cercana a la línea de corte (datos no mostrados). Estas células no se contarán como acopladas por que tienen alta probabilidad de estar lesionadas. Las células que se cuantificarán como acopladas, son aquellas fluorescentes ubicadas por fuera de la primera fila. Se tendrán en cuenta la incidencia de acoplamiento así como el número de astrocitos acoplados por campo visual.

Para las mediciones de acoplamiento mediante *inyección de colorante*, se utilizó BrEt, el cual también atraviesa las uniones en hendidura debido a su pequeño tamaño

molecular (PM = 394). Así pues, este colorante puede difundir a través de una red de células funcionalmente acopladas (a través de la membrana de unión).

Durante la medición del acoplamiento, las células fueron mantenidas en solución extracelular (solución de incubación) en presencia de La^{3+} (200 μM) para evitar la pérdida del colorante por la membrana plasmática que no forma unión en hendidura. El BrEt fue inyectado iontoforéticamente en un astrocito mediante un microelectrodo intracelular hasta que la célula empalada se volvió fluorescente.

Los cultivos celulares, se colocaron en el fondo de una cámara de perfusión que fue montada en la platina de un microscopio invertido (Nikon, TE 200). Una micropipeta de vidrio (AM - Systems 6030, 30-70 Mohms), llena con BrEt (1 mM disuelto en LiCl 150 mM) en la punta y estirada en un estirador de pipetas (Brown-Flaming P-87), fue guiada por un micromanipulador (Narishige Modelo MN-151) hacia los astrocitos bajo control visual (200x). El microelectrodo activo se conectó mediante alambres de plata clorurados, a un amplificador de registro intracelular Neuro Data (1R-183). El electrodo de referencia fue conectado a una tierra virtual y consistió en un alambre de plata clorurado inmerso en el baño de perfusión. Luego de penetrar un astrocito con una micropipeta de vidrio, se pasaron estímulos depolarizantes de 10 nA de intensidad y 200 ms de duración, o se produjo una sobrecompensación de la capacitancia del electrodo. Posteriormente, el ingreso de colorante a la célula se realizó simplemente por difusión que no mostró diferencias con los métodos anteriores. Se esperaron 2 minutos para cuantificar el acoplamiento intercelular mediante dos parámetros, incidencia e índice de acoplamiento.

La incidencia de acoplamiento fue calculada como el porcentaje de casos en los cuales el colorante difundió a, por lo menos, una célula vecina. El índice de acoplamiento fue calculado como el número de células acopladas en cada inyección dividido el número de inyecciones. En cada experimento se realizó un mínimo de 10 inyecciones por preparación.

7.4 Inmunofluorescencia

Identificación de astrocitos - Detección de GFAP

Para la detección de GFAP se fijaron las células en paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.1 % durante 15 minutos en PBS a 4°C. Luego se permeabilizaron las células con Triton X-100 por 15 min, y se incubaron 2 h a temperatura ambiente con solución bloqueante (0.1% Triton X-100, suero de cabra al 10 % en PBS). Las células se incubaron toda la noche con anticuerpo monoclonal anti-GFAP diluído en solución bloqueante (1:400, SIGMA). Los preparados se lavaron luego tres veces con PBS y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario para luego visualizar las imágenes en microscopio de epifluorescencia Nikon. Un 98% de las células resultaron positivas para GFAP (datos no mostrados). Para detectar la distribución del receptor de tipo 1 de FGF (R1FGF), se empleó similar protocolo de fijación pero se empleó un anticuerpo de tipo monoclonal anti- R1FGF.

Inmunofluorescencia de Conexinas

La distribución de Cxs en los astrocitos se evaluó mediante inmunofluorescencia para Cxs como describen Abudara y colaboradores (Abudara y col, 1999). Los astrocitos confluentes se lavaron en PBS dos veces. Las células se fijaron en etanol (70 %) durante 20 minutos a -20 °C. Finalizada la fijación, las células se lavaron dos veces en PBS. Para bloquear los sitios de unión inespecífica de los anticuerpos primarios, las células se incubaron por 30 minutos en solución bloqueante que contiene suero de hamster al 50 % y SBS al 50 % (5 mM EDTA, 1% de gelatina de pescado, 0,1 % de albúmina sérica bovina, 1% de suero de cabra, en PBS). Los anticuerpos primarios policlonales (anti-Cx43, anti-Cx40 y anti-Cx45 de conejo) se diluyeron en solución bloqueante (1/500). Los astrocitos se incubaron con anticuerpos primarios durante toda noche a 4°C. Luego de lavar tres veces el anticuerpo primario con PBS, las células se incubaron por 40 minutos con anticuerpo secundario (fluoreceína anti-conejo de cabra, 1/100 en solución bloqueante). Los anticuerpos anti-Cx fueron provistos por el Dr. JC Sáez.

Las células se montaron en glicerol al 30% y se visualizaron mediante el empleo de un microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron mediante una cámara digital conectada al microscopio y a una computadora PC. Las imágenes digitalizadas fueron exhibidas y analizadas utilizando un software adecuado (Adobe Photoshop).

7.5 Western Blotting

Para evaluar los niveles de conexinas y su migración electroforética se realizaron “*Western blot*” como describen Abudara y colaboradores (Abudara y col, 1999). Las proteínas se extrajeron mediante el desprendimiento de la monocapa con raspador en 1 ml de una solución que contiene PPI (44,6 mg/ml), FNa (100 mM), Na₃VO₄ (0,5 mM), inhibidores de proteasas, y 2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) helado en agua bidestilada previo a la lisis por sonicación.

Las muestras de proteínas fueron corridas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 8 % mediante la aplicación de una corriente constante de 20 nA. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana nitrocelulosa mediante una corriente de 30 nA durante toda la noche.

Para inhibir los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos primarios a la nitrocelulosa, las membranas se incubaron en leche descremada (5 % en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego las membranas se incubaron en anticuerpo primario (1/1500 de anti-Cx43 o 1/500 de anti-Cx45 en leche descremada) toda la noche a 4 °C. Se lavaron las membranas en PBS repetidamente para luego incubarlos durante 1h con Ig anti-conejo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina en leche descremada (1/3000). Después de haber sido lavados repetidamente en PBS, los *blot* se visualizaron mediante un kit de quimioluminiscencia ultrasensible (Pierce). La señal luminiscente se expuso a una placa de radiografía.

Para identificar la movilidad electroforética de las bandas de Cx43 se utilizó como control positivo una muestra proteica derivada de un extracto de corazón de rata. En el caso de la Cx45 se utilizaron como controles positivos las bandas observadas en muestras de células HeLa tranfectadas con ADNc de la Cx45, o en su defecto un extracto proteico de corazón de pollo.

7.6 Biotinilización de proteínas de la superficie celular

Para evaluar los niveles y la migración electroforética de las Cxs que componen los hemicanales de la membrana que no forma unión en hendidura, se biotinilaron las proteínas de la superficie extracelular antes de identificarlas mediante *immunoblotting*. Los astrocitos confluentes se lavaron 3 veces con Hank`s a pH= 8,0 a 4 °C. Las células

se incubaron con “EZ-link sulfo-NHS-SS-Biotin” (0,5 mg/ml, Pierce) por media hora a 4 °C.

Las células biotiniladas se lavaron en Hank’s con glicina 15 mM (pH 8) 3 veces a 4°C para detener la reacción de biotinilización. Las células se homogeneizaron por sonicación en una solución que contiene PPI (44,6 mg/ml), FNa (4,2 mg/ml), Na₃VO₄ (0,5 mM), e inhibidores de proteasas. Se midió la concentración de proteínas como fue descrito previamente (item *Western blotting*). Las proteínas biotiniladas se precipitaron con avidina (“immunopure immobilized avidin cross-linked agarose”) por 1 h a 4 °C (3 µg de proteína biotinilada / µl de avidina), (Pierce).

Las proteínas precipitadas se lavaron en buffer Hank’s a pH 7,2 con SDS 0,1%, NP40 1%, 3 veces a 4 °C. Las muestras proteicas fueron eluidas en 0,1 M de glicina-HCl, a pH 2,8 y se hirvieron 3 min en buffer Tris 1 M con mercaptoetanol al 5 % y se analizaron por *immunoblotting* con anti-Cx43 y anti-Cx45.

Un esquema de este proceso se ilustra en la figura 8.

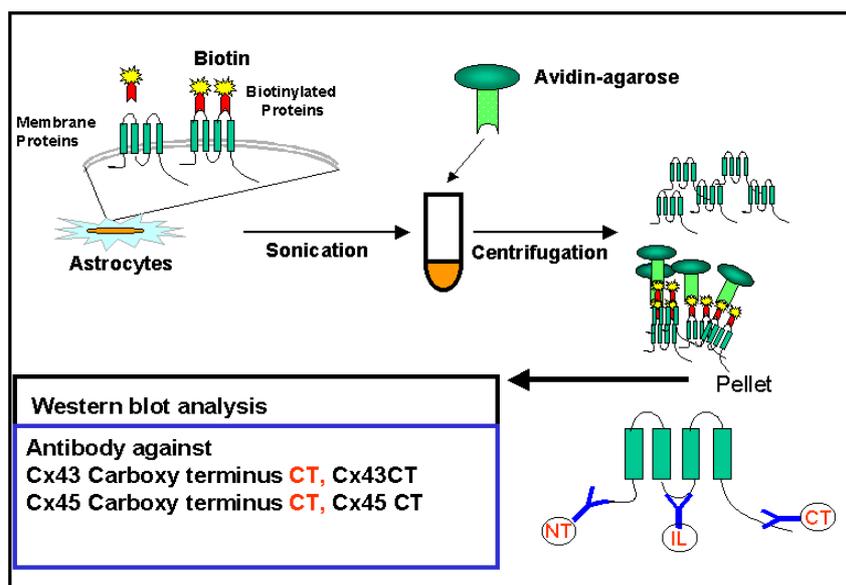


Figura 8 - Diseño experimental del marcado de proteínas de superficie por biotinilación.

Con el fin de estimar el porcentaje de conexina que constituye hemicanales en la membrana que no forma unión en hendidura, seguimos el protocolo que describimos a continuación.

Primero, a partir de varias muestras con diferente cantidad de proteínas totales construimos una curva de calibración entre, la densidad de la banda del *blot*, que refleja la reacción anti-Cx-Cx, y la cantidad de proteínas sembradas. De esta manera, el valor

de densidad nos proporciona un índice de la cantidad total de la Cx evaluada por *immunoblot* en cada muestra. La curva de calibración se ajusta a la siguiente función lineal:

$$D = ax + b,$$

donde “D” representa la densidad relativa para la reacción anti-Cx-Cx, y “x” representa la cantidad de proteínas en cada muestra.

El valor de la pendiente “a” de esta recta corresponde al coeficiente que relaciona la cantidad de un tipo de conexina en una muestra (evaluado por la densidad relativa) y la cantidad total de proteínas de dicha muestra (evaluado en gramos). Dado que conocemos la cantidad total de proteínas de la placa de cultivo control sin biotinilar (de donde hemos obtenido muestras más pequeñas para confeccionar la curva de calibración), utilizando la ecuación de la recta podemos obtener el valor de densidad máxima para la Cx *bloteada*, que es un índice de la cantidad de Cx total en esa placa de cultivo. De otra placa de cultivo con la misma cantidad de proteínas que la anterior pero que fue previamente biotinilada, analizamos por densitometría la banda del *blot*, la cual representa un índice de la cantidad de Cx que está formando hemicanles.

Para obtener el porcentaje estimado de conexina que compone los hemicanles calculamos el cociente:

Densidad obtenida para la reacción anti-Cx-Cx biotinilada / Densidad para la reacción anti-Cx-Cx total.

Drogas y soluciones

Composición de la solución de Hank's, en mM: NaCl, 137; KCl, 5; CaCl₂, 0,95; MgCl₂, 0,5; KH₂PO₄, 0,4; MgSO₄, 0,4; NaHCO₃, 4, NaH₂PO₄, 0,3; Glucosa, 5.

Composición de la solución de Locke, en mM: NaCl, 154; KCl, 5,4; CaCl₂, 2,3; MgCl₂, 1; NaHCO₃, 3,6; Glucosa, 10; HEPES, 5.

Medio de mantenimiento de los astrocitos: DMEM (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y penicilina estreptomicina 100 UI/ml

Medio de mantenimiento de los cocultivos astrocito-motoneurona: medio Liebovitz (L15) (GIBCO) suplementado con insulina (5 mg/ml), progesterona (20 μ M), conalbúmina (0,1 mg/ml) Selenito de Na (30 μ M), suero de caballo (2%), penicilina-estreptomicina (100 UI/ml).

Tratamiento con FGF-1

Los astrocitos confluentes se lavaron tres veces en solución de Locke y se les reemplazó el medio de mantenimiento por DMEM con 2% de suero de caballo o L15 suplementado. En estas condiciones se incubaron las células con FGF-1 en una estufa a 37 °C con una atmósfera de 5% CO₂. El FGF-1 fue provisto por el laboratorio del Dr. Antony Thopson (Alabama, Universidad de Birmingham). El FGF-1 se preparó previo al experimento en una solución stock a 1000X en heparina 5000 UI/ml (SIGMA). La concentración final utilizada fue de 10 ng/ml de FGF-1 y 5 UI/ml de heparina.

Trazadores de permeabilidad de hemicanales y de canales de uniones en hendidura: El AL (SIGMA) utilizado en los experimentos de captación de colorante fue preparado en un stock al 5% en LiCl 150 mM y aplicado a las células en una concentración de 500 μ M. El BrEt para los experimentos de captación de colorante fue preparado en un stock 1000X en agua bidestilada. El BrEt para los experimentos de acoplamiento de colorante fue diluido en un stock 1000X en LiCl, 150 mM.

Inhibidores de receptores purinérgicos, de hemicanales y de canales de uniones en hendidura: el octanol (Sigma) fue disuelto al 5 % en etanol y el ácido α -glicirretínico (SIGMA) en una solución 500x de 2 partes de cloroformo y 3 partes de metanol. La carbenexolona, el ATPo, y la suramina fueron disueltos en un stock de solución salina 100x.

Todos los stocks fueron preparados exclusivamente el día del experimento y descartados posteriormente a los mismos.

7.7 Estadísticas

Los datos se presentan como media \pm error estándar. Para los test estadísticos empleamos el test no paramétrico para variables continuas y no pareadas, test de Mann-Whitney (U-test).

8- Resultados

8.1 El FGF-1 aumenta la permeabilidad de la membrana de astrocitos espinales a trazadores de las uniones en hendidura

Antes de comenzar a estudiar los posibles efectos del FGF-1 sobre hemicanales, confirmamos la presencia del receptor de FGF-1 en nuestros cultivos de astrocitos mediante inmunofluorescencia (figura 9A). El receptor de FGF-1 (RFGF-1) muestra una distribución citoplasmática en situación basal.

Con el fin de determinar la presencia de hemicanales funcionales en astrocitos espinales, incubamos los cultivos previamente expuestos a FGF-1 (10 ng/ml), con AL (PM= 443.3; carga eléctrica negativa -2) y BrEt (PM= 394; carga eléctrica positiva $+1$), trazadores de la permeabilidad de hemicanales. El tratamiento de cultivos de astrocitos espinales con FGF-1 aumentó la captación desde el medio extracelular a ambos trazadores (figuras 9 y 12). La figura 9B muestra la captación de AL desde el medio extracelular por astrocitos controles y por astrocitos tratados con FGF-1 por 7 h. Se observaron células marcadas por el aumento en la captación por FGF-1-7 h en todo el campo enfocado. En todos los casos se seleccionó la zona central de la monocapa. Nótese el cambio de forma de los astrocitos a las 7 h de tratamiento con FGF-1, los cuales se vuelven reactivos y emiten prolongaciones. En la figura 9C se graficó la evolución temporal del índice de captación (IC) para el AL en astrocitos en medio control y en astrocitos tratados con FGF-1. Se puede observar que el FGF-1 aumenta la captación del trazador en forma significativa a partir de tratamiento tempranos, 30 min ($IC_{\text{FGF-1-30min}} = 0,12 \pm 0,03$), continúa aumentando para alcanzar su máximo a las 7 h ($IC_{\text{FGF-1-7h}} = 0,21 \pm 0,06$) y a partir de ahí comienza a disminuir para retomar los niveles basales a las 40 h ($IC_{\text{FGF-1-40 h}} = 0,08 \pm 0,01$). Las diferencias en los $IC_{\text{FGF-1-30 min}}$ a $IC_{\text{FGF-1-7h}}$ no necesariamente reflejen un aumento en la captación ya que el cambio de forma de los astrocitos podría influenciar estos valores (ver discusión).

Se determinó el índice de captación para astrocitos en situación basal, es decir, incubados en DMEM o L15 completo (2% de suero de caballo) a los mismos tiempos de tratamiento que con FGF-1 y heparina (vehículo). En la situación basal, el índice de captación fue similar al de la heparina para todos los puntos estudiados ($p > 0.05$; U-test) (datos no mostrados). Por esto último, de aquí en adelante, el tratamiento con heparina se considera como situación control.

8.2 El aumento de la captación de aniones orgánicos (AL) inducido por FGF-1 se debió a un aumento en el número de hemicanales y también de canales purinérgicos (P2X) funcionales

Para determinar que tipo de canales estaban implicados en el aumento de la permeabilidad de membrana al AL utilizamos inhibidores de hemicanales y antagonistas purinérgicos pues los canales purinérgicos pueden presentar propiedades de permeabilidad similares a los hemicanales. En la figura 10A se muestra la inhibición de la captación de AL inducida por FGF-1-7 h por el octanol (1 mM), un inhibidor de las uniones en hendidura y la carencia de inhibición por ATPo (200 μ M), un antagonista selectivo de los canales purinérgicos P2X7. La figura 10B describe el curso temporal del índice de captación para el AL en astrocitos espinales tratados con FGF-1 en distintas situaciones de registro de captación, (a) en presencia de octanol, el cual fue pre-incubado en los cultivos 15-30 minutos antes de realizar el registro de la captación (IC FGF-1/Oct, cuadrados llenos) (b) en presencia de ATPo el cual fue pre-incubado en los cultivos 30 minutos antes de realizar el registro de la captación (IC FGF-1/ATPo, triángulos llenos negros), (c) en ausencia de pre-incubación farmacológica (IC FGF-1, círculos llenos), datos que fueron superpuestos en esta gráfica para su comparación con los datos obtenidos en presencia de los bloqueantes. En el recuadro superior de la figura 10B, se reproduce la gráfica anterior (sólo las medias sin los errores estándar) pero se agrega la suma de los valores promedios de los índices de captación obtenidos experimentalmente durante los tratamientos con FGF-1 en presencia de los bloqueantes octanol y ATPo (IC FGF-1/Oct + IC FGF-1/ATPo, triángulos rojos). La preincubación

de los astrocitos con octanol inhibió significativamente la captación del colorante AL inducida por tratamientos de 4 h, 7 h, y 15 h con FGF-1, (figura 10, A y B). La inhibición de la captación de AL fue prácticamente total para los tratamientos de 7 h (IC FGF-1/Oct-7h = $0,03 \pm 0,007$) y 15 h (IC FGF-1/Oct-15h = $0,03 \pm 0,007$). Esto último sugiere que las principales conductancias responsables del aumento de la permeabilidad de membrana ante 7 y 15 h de exposición a FGF-1 dependen de la apertura de hemicanales de uniones en hendidura. Otros bloqueantes de las uniones en hendidura, el ácido 18 α -glicirretínico (α -GA) (50 μ M) y la carbenexolona (CBX) (200 μ M) (figura 11), mostraron un bloqueo de la captación similar al octanol ($p < 0.05$, U-test) apoyando el concepto de que existe una mayor contribución de los hemicanales al aumento de la permeabilidad ante 7 h de exposición al FGF-1.

Por su parte, el ATPo no afectó la captación del colorante inducida por el FGF-1 a las 7 y 15 h, pero inhibió significativamente la captación de AL para los tratamientos más cortos con FGF-1 de 30 minutos y 2 h, los cuales a su vez no fueron alterados por el octanol (figuras 10B y 11). Esto sugiere que las principales conductancias responsables de la permeabilización de la membrana para estos tiempos de exposición a FGF-1 corresponden a la apertura de canales purinérgicos ionotrópicos (posiblemente P2X7) en la membrana que no forma unión en hendidura. Este hecho fue ratificado por la aplicación de otro antagonista no selectivo de receptores purinérgicos, la suramina (200 μ M), la cual mostró un bloqueo de la captación similar al de ATPo (figura 11).

El ATPo y el octanol, inhibieron en forma similar la captación de colorante inducida por 4 h de exposición a FGF-1 (figura 10B), sugiriendo que a este tiempo de tratamiento, ambos canales contribuyen al aumento de la permeabilidad al AL.

Como puede observarse en el gráfico del recuadro superior de la figura 10B, la suma IC

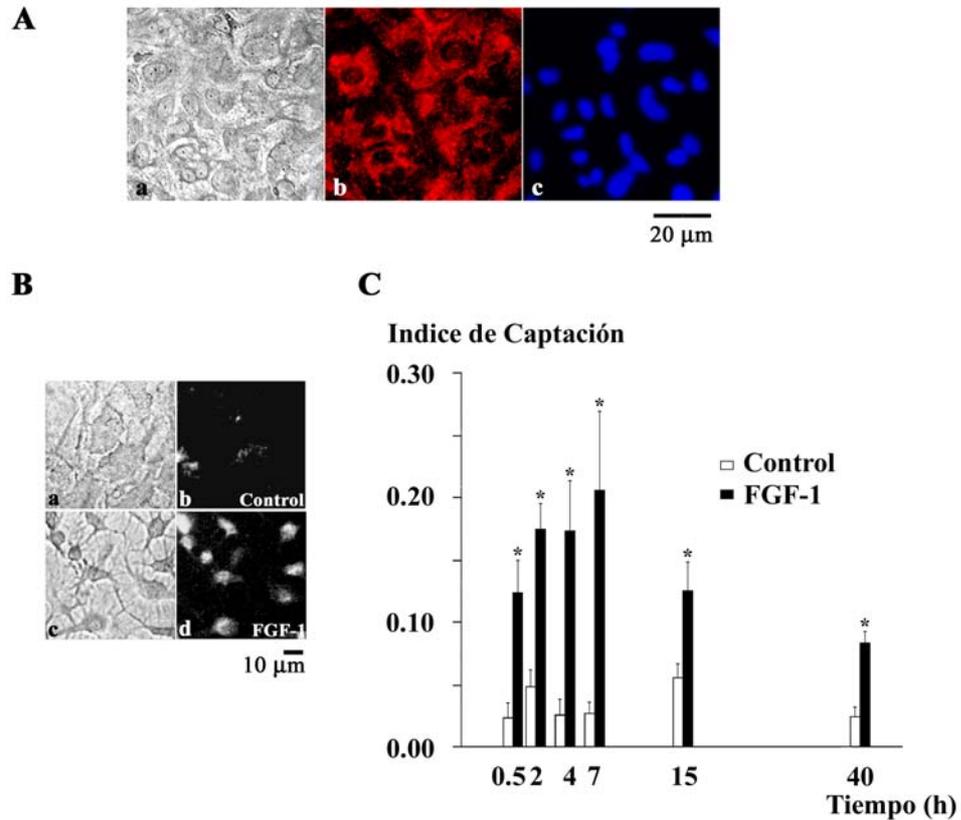


Figura 9 - El FGF-1 aumentó la permeabilidad de membrana al AL en cultivos de astrocitos

- A- Los astrocitos en cultivo forman una monocapa confluyente como se observa por microscopía de contraste de fase (a) y presentan una inmunoreactividad difusa para el receptor de FGF-1 (b). Los núcleos se marcaron con DAPI (c).
- B- Microscopía de contraste de fase en monocapas de astrocitos control (a) y luego de 7 horas de tratamiento con FGF-1 (c). Nótese el cambio morfológico descrito en resultados. Epifluorescencia en las mismas condiciones anteriores (b) y (d) respectivamente.
- C- Índice de captación de AL luego de los tiempos indicados en monocapas confluentes de astrocitos en situación control (barras vacías) o tratadas con FGF-1 (barras llenas). (* $p < 0,05$, U-Test)

FGF-1/Oct + IC FGF-1/ATP_o se superpone a la curva obtenida con el FGF-1 (IC FGF-1), mostrando entonces que canales purinérgicos y hemicanales son los principales contribuyentes al aumento de la permeabilidad al AL inducida por el FGF-1 en astrocitos derivados de la médula espinal, y que la activación de los canales purinérgicos no potencia ni ocluye a la de los hemicanales.

Debido a que nuestros resultados mostraron que existe un componente de la captación dependiente de hemicanales que llega a su máximo a las 7 h de tratamiento con FGF-1, de aquí en adelante, profundizaremos nuestro estudio a este tiempo de tratamiento.

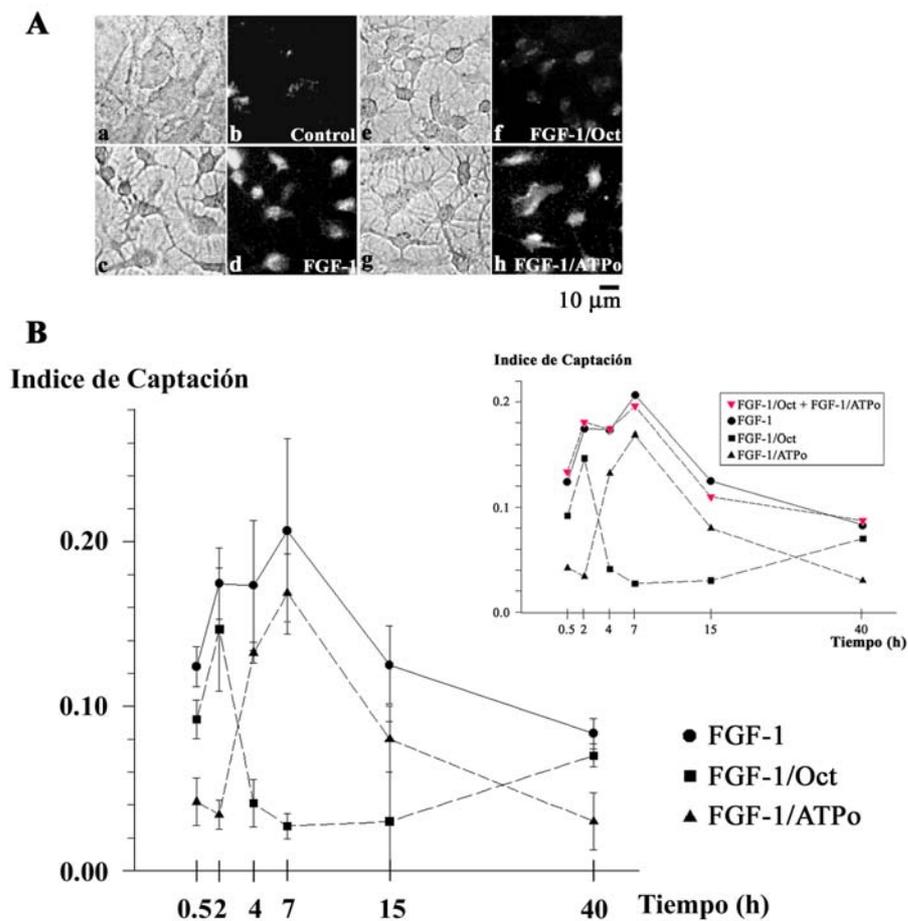


Figura 10 - El aumento de la permeabilidad de membrana al AL inducido por FGF-1 se debe a la apertura de hemicanales y de canales purinérgicos.

A- Microscopía de contraste de fase de las monocapas de astrocitos en situación control (a), luego de 7 horas de tratamiento con FGF-1 sin agentes farmacológicos (d), o en presencia de 1 mM octanol (e) o 200 μ M ATPo (g), en el momento del registro. Imágenes epifluorescentes de los mismos tratamientos (b), (d), (g) y (h) respectivamente.

Índice de captación de AL luego de los tiempos indicados en monocapas confluentes de astrocitos tratadas con FGF-1 en ausencia (círculos negros), o en presencia de Octanol (cuadrados negros) o ATPo (triángulos negros) en el momento del registro. ($p < 0,05$ en cada caso, U-Test). En el recuadro superior derecho se agrega la suma de las captaciones en presencia de ATPo y octanol (triángulos rojos). Nótese que dicha suma es similar en todos los puntos al índice de captación obtenido por el tratamiento con FGF-1.

8.3 El tratamiento con FGF-1 incrementó además la captación de cationes orgánicos (BrEt) desde el medio extracelular a través de su pasaje por hemicanales y por canales purinérgicos

Con el fin de estudiar las propiedades de selectividad por carga iónica de la membrana que no forma unión en hendidura al pasaje de trazadores de hemicanales, realizamos los registros de captación en presencia de BrEt (carga eléctrica +1).

La figura 12 muestra la captación de BrEt (10 μ M) en astrocitos controles y tratados con FGF-1-7 h y su inhibición por bloqueantes de las uniones en hendidura y por antagonistas de los canales purinérgicos. En forma similar a lo observado para el AL, el FGF-1 aumentó la captación de BrEt por los atrociitos espinales desde un IC C-7h = $2,7 \pm 0,9$ en situación control, hasta un IC FGF-1-7h = $4,9 \pm 0,5$ luego de 7 h tratamiento. Esta captación fue inhibida por la preincubación de los astrocitos con α -GA (50 μ M) y carbenoxelona (200 μ M), ambos bloqueantes de los canales intercelulares y hemicanales de las uniones en hendidura, en forma similar a lo observado para el AL. Sin embargo, a diferencia de lo observado para la captación con AL, la captación de BrEt también fue inhibida por el ATPo (200 μ M).

8.4 El tratamiento con FGF-1 por 7 h disminuyó el acoplamiento intercelular entre astrocitos

El bajo nivel de acoplamiento previamente descrito en los astrocitos espinales (Lee et al, 1994) fue confirmado por la técnica de *scrape loading* (datos no mostrados). Para validar este dato, aplicamos idéntico protocolo en astrocitos de corteza, los cuales, como ya ha sido descrito (Martínez y col, 2001), se encuentran extensamente acoplados mediante uniones en hendidura. En astrocitos corticales control, el colorante alcanzó varias filas de células alejadas desde el sitio de corte, *scrape*, evidenciando el extenso acoplamiento funcional en dichas células (datos no mostrados). En astrocitos espinales, la difusión fue a 1 o 2 células desde el corte. Nuestros hallazgos son compatibles con reportes anteriores que muestran heterogeneidad en el acoplamiento funcional entre astrocitos de distintas regiones del sistema nervioso (Lee et al, 1994; Batter, 1994).

Indice de Captación

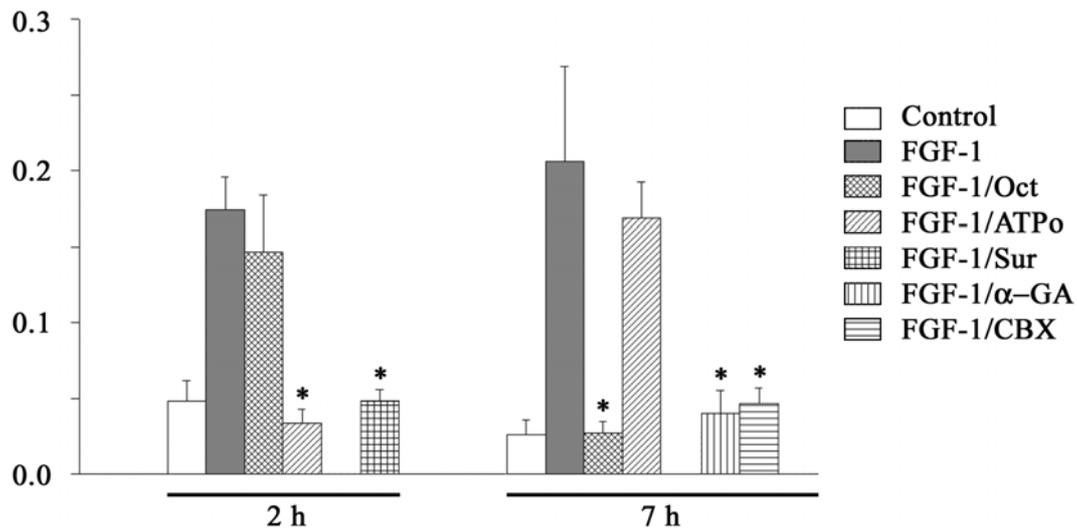


Figura 11 - El aumento de la permeabilidad de membrana al AL inducido por FGF-1 se inhibió por diferentes bloqueantes de hemicanales o antagonistas purinérgicos.

Índice de captación de AL luego de los tiempos indicados, en monocapas confluentes de astrocitos en situación control o tratadas con FGF-1, en ausencia o en presencia de 1 mM Octanol (Oct), 200 μ M ATP oxidado (ATPo), 200 μ M suramina (Sur), 50 μ M ácido glicirretínico (α -GA), 200 μ M carbenoxelona (CBX) en el momento del registro. (* $p < 0,05$, U-Test).

Descartamos la técnica del *scrape loading* para medir los efectos del FGF-1 sobre el acoplamiento intercelular, ya que en estas condiciones experimentales, no existe forma de impedir la pérdida de colorante por la membrana que no forma unión en hendidura. La aplicación de lantano (La^{3+}) al medio salino en que se realiza el *scrape loading*, podría inhibir el acoplamiento de colorante, ya que este catión tendría acceso a través del sitio de injuria al medio intracelular.

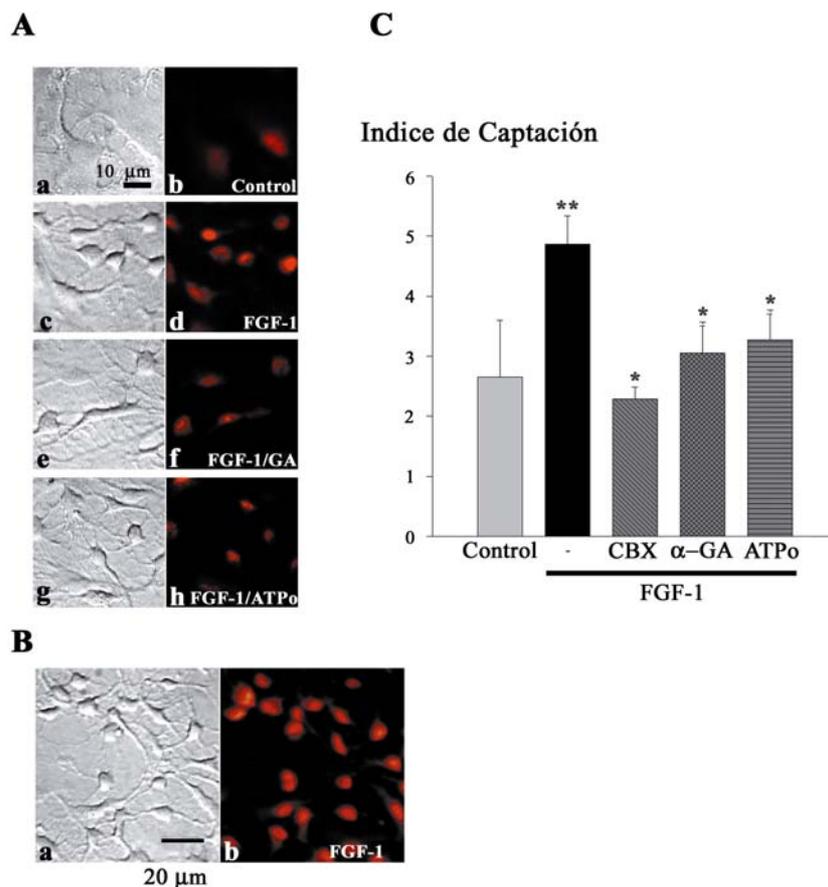


Figura 12 - El FGF-1 aumentó la permeabilidad de membrana al BrEt en cultivos de astrocitos

- A- Microscopía de contraste de fase de las monocapas de astrocitos en situación control (a), luego de 7 horas de tratamiento con FGF-1, sin agentes farmacológicos (b), o en presencia de 50 μ M α -GA (e) o 200 μ M ATPo (g), en el momento del registro. Imágenes epifluorescentes de los mismos tratamientos (b), (d), (f) y (h) respectivamente.
- B- Una imagen que muestra un campo mayor de la captación inducida por FGF-1 que en A. Nótese que todas las células del campo seleccionado se permeabilizaron.
- C- Índice de captación de BrEt en monocapas confluentes de astrocitos controles y tratadas con FGF-1, en ausencia o en presencia de CBX, α -GA, y ATPo en el momento del registro. (* $p < 0,05$, U-Test, en relación a FGF-1; ** $p < 0,05$, U-Test, en relación al control).

Para cuantificar el grado de acoplamiento intercelular entre los astrocitos espinales y su modulación por el FGF-1 se realizaron las mediciones de acoplamiento por inyección de colorante. Dado que evidenciamos hemicanales y canales purinérgicos funcionales en la membrana que no forma unión en hendidura en astrocitos espinales, dichas mediciones fueron realizadas en un medio salino con 200 μ M de La^{3+} , un bloqueante inespecíficos de canales catiónicos que impide la captación o pérdida de colorante por la membrana que no forma unión en hendidura. Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 13. Los astrocitos en situación control mostraron una incidencia de acoplamiento del $72 \pm 8,7$ % ($n = 18$) con un índice de 1,5 células acopladas. El tratamiento con FGF-1-7 h redujo la incidencia de acoplamiento a un $17,5 \pm 9,5$ % ($n = 12$). El remanente de células que conserva el acoplamiento lo hace con índice similar al de los controles (1,5 células acopladas).

En suma, los estudios funcionales y farmacológicos muestran que el FGF-1-7 h reduce el acoplamiento intercelular por uniones en hendidura y aumenta la cantidad de emicanales funcionales sí como también de canales purinérgicos (P2X7) funcionales.

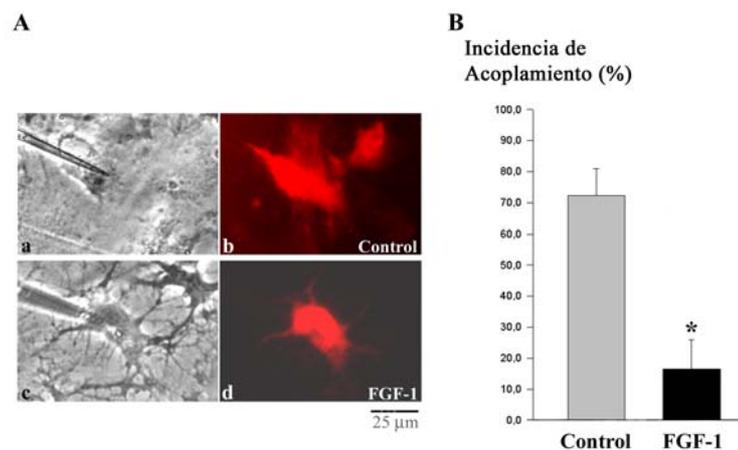


Figura 13 - El FGF-1 redujo la incidencia de acoplamiento en astrocitos espinales.

- A- Microscopía de fase de monocapas de astrocitos confluentes controles (a), y tratados con FGF-1-7 h (b) y empaladas mediante micropipeta de vidrio. Epifluorescencia de las condiciones anteriores, (b) y (d) respectivamente de células inyectadas iontoforéticamente con BrEt.
- B- Incidencia de acoplamiento (%) de monocapas confluentes de astrocitos controles y tratados con FGF-1. (*p<0,05, U-Test). La transferencia del colorante inyectado en astrocitos controles fue de 1,5 en promedio y se inhibió por CBX y α -GA (datos no mostrados).

A continuación tomaremos especial interés en uno de los componentes que podría participar en la señalización intercelular a través del medio extracelular, los hemicanales de Cxs. Por tanto estudiaremos la distribución celular, los niveles y la movilidad electroforética de Cxs, así como detectaremos la presencia de hemicanales de Cx en la membrana que no forma unión en hendidura y su regulación por el FGF-1.

8.5 El FGF-1 provocó una redistribución de la Cxs 45 en los astrocitos

Para analizar la distribución de Cxs en los astrocitos y su alteración por el FGF-1 realizamos inmunofluorescencia para 4 de las Cxs expresadas en los astrocitos en cultivo.

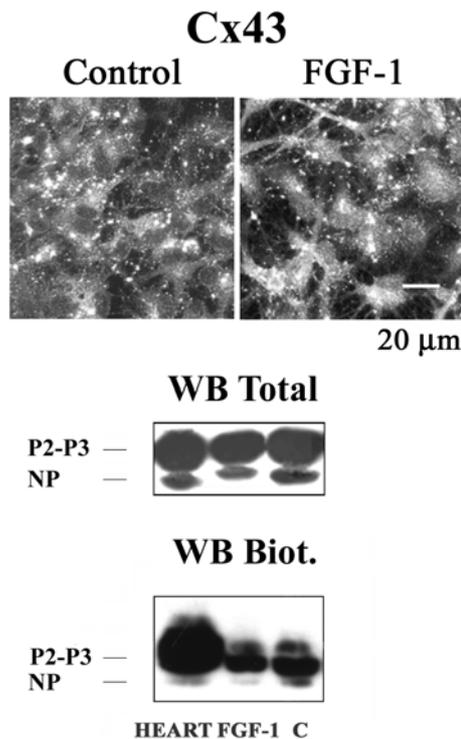


Figura 14 - El FGF-1 no generó cambios en la distribución de Cx43 pero alteró la movilidad electroforética de dicha Cx en muestras totales y biotiniladas.

A- Inmunofluorescencia anti-Cx43 de astrocitos controles y tratados con FGF-1-7 h. Se observa una marca difusa y otra de tipo puntiforme entre los límites celulares.

B- Análisis de *Western Blot* para Cx43 en muestras totales de astrocitos controles y tratados con FGF-1 como se indica en la figura. El carril de la izquierda muestra la migración de Cx43 de corazón (control positivo). NP (por *non phosphorylate*), P2-P3, y HP (por *hiperphosphorylate*), corresponden a las distintas isoformas fosforiladas de la Cx43.

Análisis de *Western Blot* en muestras biotiniladas de astrocitos controles y tratados con FGF-1. Misma secuencia que en B.

Comenzamos nuestro estudio con la Cx43 ya que ésta es la conexina principalmente expresada por los astrocitos en cultivo y porque la mayoría de los reportes sobre hemicanales involucran a esta conexina. La figura 14A ilustra una fotografía con inmunofluorescencia anti-Cx43 en astrocitos espinales luego de 7 horas de tratamiento con FGF-1. La inmunoreactividad puntiforme de la Cx43 en los contornos celulares y zonas de aposición (placas de unión) sugiere que esta Cx está formando parte de uniones en hendidura en astrocitos espinales. La distribución de las placas de unión resultó heterogénea en el cultivo siendo más notable la presencia de inmunofluorescencia para Cx43 en algunas zonas que en otras. No se observaron cambios evidentes en la distribución de las placas de unión de los astrocitos controles y los sometidos a FGF-1, salvo un leve aumento de la marca citoplásmica.

La inmunoreactividad para Cx45 presentó un patrón difuso en las monocapas de cultivo, sin concentrarse de manera evidente en los contornos celulares tanto en situación control como en los cultivos sometidos a tratamiento con FGF-1 (figura 15 A). Esto sugiere entonces, que esta Cx no se encuentra formando placas de unión, y que la misma no es un componente importante de las uniones en hendidura en cultivos de astrocitos espinales. El tratamiento con FGF-1 por 7 h aumentó considerablemente la intensidad de la marca difusa para la Cx45, sin hacerse aparente la presencia de marca puntiforme en los límites celulares.

Experimentos realizados con anticuerpos contra Cx40 mostraron un patrón de distribución similar al de la Cx45 en astrocitos controles y tratados con FGF-1-7 h (figura 17 en discusión).

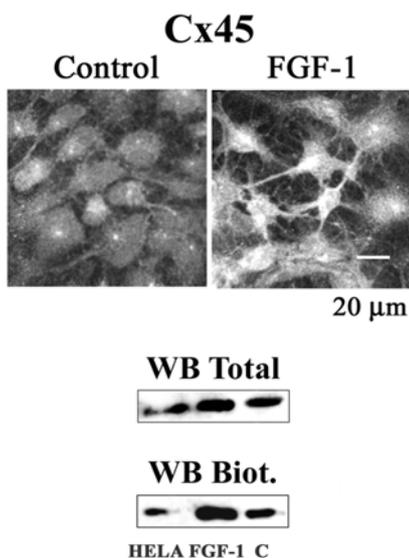


Figura 15 - El FGF-1 generó un aumento de la inmunoreactividad y de los niveles de Cx45 en muestras totales y biotiniladas de astrocitos.

- A- Inmunofluorescencia anti-Cx45 de astrocitos controles y tratados con FGF-1-7 h. Se observa una marca difusa y ausencia de marca puntiforme. Nótese el incremento en la marca difusa por el FGF-1.
- B- Análisis de *Western Blot* para Cx45 en muestras totales de astrocitos controles y tratados con FGF-1 como se indica en la figura. El carril de la izquierda muestra el control positivo obtenido de células HeLa transfectadas con el ADNc de Cx45. Solo se observó una banda en todas las muestras. Análisis de *Western Blot* para Cx45 en muestras biotiniladas de astrocitos controles y tratados con FGF-1. Misma secuencia que en B.

Como ya ha sido descrito para astrocitos de corteza cerebral, la Cx26 no forma uniones en hendidura y su marca es poco intensa y perinuclear en astrocitos espinales (Martínez y col, 1999). El tratamiento con FGF-1 generó un pequeño incremento en la inmunoreactividad de esta Cx en astrocitos espinales, pero no cambió su distribución (datos no mostrados). Por su distribución celular, esta Cx posiblemente se encuentra formando parte de compartimentos intracelulares, retículo endoplásmico y aparato de Golgi, y por lo tanto se descartó como una candidata a formar hemicanales de membrana que no forma unión en hendidura.

Para descartar “reacciones cruzadas” de los anticuerpos policlonales Anti-Cxs (Anti-Cx43, Anti-Cx40, Anti-Cx45) se utilizaron células HeLa transfectadas con el ADNc de una de las tres Cxs y se realizaron experimentos de inmunodetección con los tres anticuerpos en cada variante de célula transfectada. Las células transfectadas con una de las Cxs sólo mostraron marca positiva con el anticuerpo correspondiente, mientras que no existió señal con los otros dos anticuerpos (datos no mostrados). En el caso de la Cx26 el anticuerpo utilizado fue monoclonal.

A partir de aquí, se profundizará en la composición y regulación por FGF-1 de hemicanales compuestos de Cx43 y Cx45. Quedará para el futuro detectar la existencia de hemicanales compuestos de Cx40 o de hemicanales heteroméricos (compuestos de subunidades con varias de estas Cxs).

8.6 El FGF-1 aumentó los niveles totales de Cx45 y reguló la movilidad electroforética de las distintas isoformas de la Cx43 en astrocitos espinales

Los niveles totales y la movilidad electroforética de las Cx43 y Cx45 y su regulación por el FGF-1-7 h, se evaluaron mediante el levantamiento de proteínas de la placa de cultivo de astrocitos y posterior detección inmune de las Cxs por *Western Blot*. Los *immunoblots* para la Cx43 de los astrocitos control en condiciones basales muestran tres bandas de diferente movilidad electroforética (figura 14B), las cuales están asociadas a distintas isoformas fosforiladas, P2-P3 y NP, ya descritas de la Cx43 en cultivo e “*in vitro*” (Berthoud y Sáez, 1993; Hossain y col, 1994; Martínez y col, 2002).

El tratamiento con FGF-1 por 7 h, produjo una disminución en los niveles totales de la Cx43. La densidad de las muestras tratadas con FGF-1 fue de 0,63 veces la del control (n = 3). Por otra parte, la relación P2-P3/NP en astrocitos tratados con FGF-1-7 h aumentó 1.74 (n = 3) veces con respecto al control, lo que obedece a un cambio en el patrón de movilidad electroforética de la Cx43.

El *immunoblot* para la Cx45 de los astrocitos mostró una sola banda tanto en los astrocitos controles como en los tratados con FGF-1. El mismo tratamiento no generó cambios en los patrones de movilidad electroforética pero produjo un aumento en el nivel total de la Cx45 de 1,96 veces el control (n = 3), (figura 15B).

8.7 Detección de Cx43 y Cx45 como constituyentes de hemicanales en la membrana que no forma unión en hendidura de los astrocitos espinales

Para tener más información sobre la presencia y los niveles de Cxs que forman hemicanales en la membrana que no forma unión en hendidura de los astrocitos espinales, utilizamos la técnica de biotilación de proteínas de superficie y precipitación de las mismas con estrepto-avidina (Plotkin y col, 2002, Cooper y col, 2002). Las muestras de proteína obtenidas luego de este proceso fueron analizadas por *immunoblot* para la Cx43 (figura 14 C) y la Cx45 (figura 15 C).

Dado que las Cxs se encuentran en las membranas oligomerizadas en hexámeros formando canales, nuestros resultados obtenidos al precipitar proteínas de superficie celular avalan la existencia de hemicanales que contienen Cx43 y Cx45 tanto en los astrocitos controles como en los tratados con FGF-1 (figuras 14 C y 15 C).

Mediante el procedimiento descrito en métodos se pudo estimar que el 6,5% de la Cx43 se encuentra en la superficie celular formando hemicanales (n = 3). Por lo tanto el resto (93 %) de la Cx se encuentra en placas de uniones intercelulares (uniones en hendidura) y en compartimentos u organélos intracelulares. Estos últimos transportan la

Cx desde el lugar de su síntesis hacia la membrana celular o en sentido contrario, desde la membrana celular hacia vesículas de internalización que van a la degradación.

La estimación para la Cx45 que se encuentra en la superficie celular formando hemicanales fue de 16,5% (n=3). Dado que nuestros datos inmunohistoquímicos no nos dan indicios de que la Cx45 forme placas de unión, proponemos que el resto (83 %) de la Cx45 se encuentra en tránsito celular, sintetizándose o degradándose y que la cantidad de Cx45 que forma uniones en hendidura en los astrocitos espinales es mínima.

8.8 El FGF-1-7 h aumentó los niveles de Cx45 que componen hemicanales y moduló la movilidad electroforética de la Cx43 que componen hemicanales

El tratamiento con FGF-1 por 7 h no disminuyó de forma importante los niveles de Cx43 que forma hemicanales constituyendo 0,8 veces el control. En astrocitos tratados con FGF-1-7 h la relación P2-P3/NP de las muestras biotiniladas fue 1,75 veces la del control (n=3), un resultado similar al obtenido con muestras de proteína totales (figura 14 C).

El tratamiento con FGF-1-7 h aumentó los niveles de Cx45 en la membrana que no forma unión en hendidura, que resultó 2.10 veces el control (n = 3). Este dato es concordante con el aumento de la inmunofluorescencia (marca difusa) para la Cx45 detectada por inmunohistoquímica. No se detectaron cambios en las movilidades electroforéticas de la Cx45 como consecuencia del tratamiento con FGF-1 (figura 15 C).

8.9 El ATP es el mediador de difusión extracelular de los efectos del FGF-1 sobre la permeabilidad de la membrana que no forma unión en hendidura a la 7 h de tratamiento. La apertura previa de canales purinérgicos es necesaria para el aumento de la permeabilidad dependiente de hemicanales inducida por FGF-1

La aplicación de 2 bolos de ATP (500 μM c/u) en un periodo de 7 h indujo una captación dependiente de hemicanales a AL con un IC en el orden del obtenido con FGF-1 ($\text{IC}_{\text{ATP}} = 0,17 \pm 0,003$), (figura 16 A).

El tratamiento con FGF-1 en presencia de apirasa (2 mU/ μL), una nucleotidasa que hidroliza el ATP a fosfato inorgánico, durante 7 h generó una marcada disminución en la captación de AL en comparación al de astrocitos expuestos a FGF-1 7 h ($\text{IC}_{\text{FGF-1}} = 0,21 \pm 0,06$; $\text{IC}_{\text{FGF-1+APY}} = 0,087 \pm 0,01$), (figura 16 B).

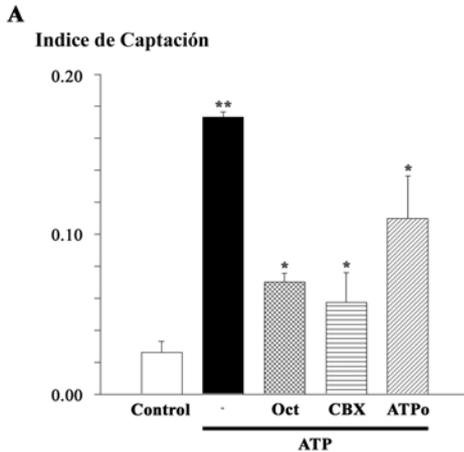
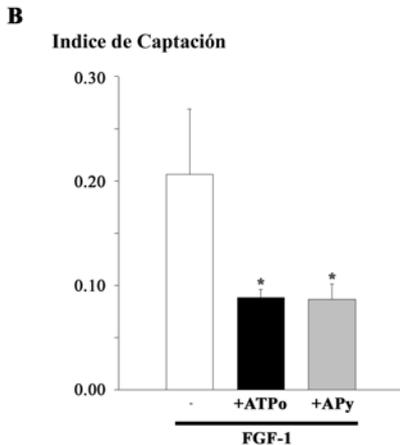


Figura 16 -

El aumento de la permeabilidad dependiente de hemicanales es mediado por ATP y depende de la activación de canales purinérgicos ionotrópicos.

A- Indice de captación para AL de astrocitos controles, y luego de la aplicación de 2 bolos de ATP (500 μM) en un período de 7 h sin agentes farmacológicos, y en presencia de Oct (1 mM), CBX (200 μM), y ATPo (200 μM), durante el registro.

B- Indice de captación para AL en astrocitos tratados con FGF-1, o FGF-1 más ATPo 200 μM (FGF-1+ATPo), o FGF-1 más apirasa 2 mU / μL (FGF-1+Apyr) durante el tratamiento. (* $p < 0,05$, U-Test, en relación a ATP (figura A) o al FGF-1 (figura B); ** $p < 0,05$, U-Test, en relación al control).



Para investigar si la apertura de los canales purinérgicos P2X7 es una condición previa necesaria a la apertura de los hemicanales inducida por 7 h de exposición al FGF-1, pre-tratamos los astrocitos media hora con el antagonista purinérgico selectivo de canales P2X7, de acción irreversible, ATPo (200 μM) antes de agregar FGF-1 al medio tratamiento. El FGF-1 más el ATPo fueron mantenidos en el medio durante 7h y luego lavados antes de hacer el registro de captación con AL. En estas condiciones, los valores de IC para AL obtenidos muestran que la captación dependiente de hemicanales

observada a las 7 h de tratamiento es considerablemente reducida en comparación con el IC de astrocitos tratados con FGF-1 ($IC_{FGF-1} = 0,21 \pm 0,06$; $IC_{FGF-1+ATPo} = 0,088 \pm 0,008$), (figura 16 B).

9- Discusión

9.1 Eventos responsables del aumento de la permeabilidad de la membrana que no forma unión en hendidura a trazadores de permeabilidad de hemicanales inducido por FGF-1 en astrocitos espinales

De acuerdo a los estudios funcionales de permeabilidad y su bloqueo farmacológico, la apertura de hemicanales y de canales P2X fueron responsables del pasaje de trazadores de hemicanales a través de la membrana de no-unión en astrocitos espinales expuestos a distintos tiempos con FGF-1. Efectivamente, el FGF-1 incrementó la captación de Amarillo Lucifer, un trazador de la permeabilidad de hemicanales, debido a la apertura temprana (30 min a 4 h) de canales purinérgicos P2X7 y tardía (más de 4 h) de hemicanales de uniones en hendidura.

Las curvas que grafican el curso temporal del bloqueo farmacológico de la permeabilización inducida por el FGF-1 en presencia de octanol y de ATPo, presentaron un trazo especular existiendo 2 puntos de entrecruzamiento (a las 4 y 27 h aproximadamente). Estos puntos señalarían una inversión en la predominancia de los canales determinantes del aumento de la permeabilidad al AL. Así, antes de las 4 h de tratamiento con FGF-1, la apertura de canales P2X sería la mayor determinante del aumento de captación del AL (fundamentalmente a las 2 h), mientras que a partir de las 4 h comienzan a predominar los hemicanales (con un máximo a las 7 h), para volver a invertirse esta predominancia a las 40 h.

Por otra parte, nuestros hallazgos mostraron que la suma de los valores de captación inducidos por el FGF-1 en presencia de octanol y de ATPo fue similar a la curva de captación inducida por el FGF-1, sugiriendo que la activación de ambos canales ni se potencia ni se ocluye. De todos modos, podemos sugerir que una actividad conjunta en exceso de ambos tipos de canales podría no ser viable para el astrocito.

La inhibición significativa de la captación de AL en presencia de FGF-1-7 h por inhibidores de las uniones en hendidura y la ausencia de bloqueo significativo de dicha captación con ATPo, sugieren que las principales vías de pasaje para aniones orgánicos

dependen de hemicanales. Para el caso de cationes orgánicos (BrEt), también se encontró una inhibición significativa de su captación en presencia de FGF-1-7 h por inhibidores de las uniones en hendidura (CBX y α -GA). Sin embargo existió una inhibición parcial de la captación de BrEt para el FGF-1- 7 h en presencia de ATPo. Por lo tanto, no podemos descartar la presencia de canales P2X7 funcionales a las 7 h de tratamiento con FGF-1. La disminución de la captación de Amarillo Lucifer por el ATPo no fue significativa con respecto a la obtenida en astrocitos tratados con FGF-1, pero sí lo fue la conseguida con BrEt. Este hecho podría ser explicado por las propiedades de selectividad de los canales P2X7 que son más permeables a cationes como el BrEt que a aniones como el Amarillo Lucifer (North y col, 2002).

Los resultados obtenidos mediante el empleo de inhibidores de hemicanales y de receptores purinérgicos nos refleja que el pasaje de Amarillo Lucifer (anión) por la membrana depende principalmente de hemicanales mientras que el pasaje de BrEt (catión) es dependiente tanto de hemicanales como de receptores purinérgicos ionotrópicos en astrocitos tratados con FGF-1-7h.

En los astrocitos tratados por 7 h con FGF-1, podemos pensar que existe una gran contribución de los hemicanales y de los canales purinérgicos en la conductancia total de la membrana, ya que el acoplamiento intercelular en estos astrocitos (determinado por estudios de acoplamiento de colorante) es muy bajo. Si bien los registros electrofisiológicos corroborarían la apertura de canales de alta conductancia iónica, no nos darían mucha información sobre el tipo de canal funcional; los registros obtenidos con trazadores de permeabilidad como AL y BrEt nos restringen más el origen de las conductancias, ya que los colorantes mencionados pueden atravesar unos pocos tipos de canales; hemicanales (Contreras y col, 2002), algunos canales purinérgicos (North y col, 2002), y canales aniónicos (Parpura y Spray, 2004). Además, las técnicas electrofisiológicas tampoco nos dan información acerca del patrón espacial de cambio de la permeabilidad en los campos estudiados (Salvo que se registraran todas las células de un campo). En nuestros experimentos, la permeabilización, en caso de existir, se produjo en prácticamente todas las células del cultivo.

En relación a otras posibles vías de captación de colorante por los astrocitos espinales en presencia de FGF-1, es pertinente descartar que dicha captación se deba a otros procesos.

La endocitosis (pinocitosis) es un proceso dependiente de la temperatura (Dixon y col, 1998). Dado que la endocitosis se encuentra estimulada a temperaturas de 37°C, los experimentos de captación de colorante fueron realizados a temperatura ambiente (menos de 25°) o en algunos casos (captaciones con DAPI, no mostradas) a 4°C. Por lo tanto reducimos la probabilidad de que el aumento en la permeabilidad de la membrana al AL o BrEt se deba a una estimulación de la vía endocítica.

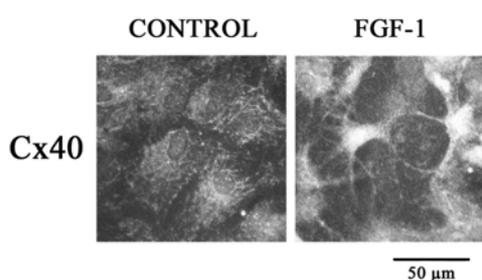


Figura 17 - El FGF-1 generó un aumento de la inmunoreactividad para la Cx40

Inmunofluorescencia anti-Cx40 en astrocitos controles y tratados con FGF-1. De forma similar a lo observado para la Cx45 se presenta una marca de tipo difusa para la Cx40 que es incrementada por el tratamiento con FGF-1-7 h. No se observa tampoco en este caso marca puntiforme.

Durante la realización de los experimentos y la obtención de los registros de captación, visualizamos las fases de los campos celulares explorados, y no notamos cambios en la forma de las células, el tamaño o la fragmentación de los núcleos, que indicasen algún proceso de muerte celular (apoptótica o necrótica) y por lo tanto, rotura de la membrana. Además, el bloqueo farmacológico de la captación por inhibidores de canales, es un hallazgo que habla a favor de la integridad de la membrana celular, ya que en caso de rotura de membrana, la captación difícilmente hubiese sido inhibida por dichos bloqueantes.

Realizamos captaciones tanto para el AL como para el BrEt a diferentes concentraciones de colorante. No se pudo apreciar saturación en el pasaje de AL hasta una concentración de 1200 μM . La saturación para el BrEt se comienza a apreciar a partir de concentraciones de 50 μM . No observamos diferencias en la captación de astrocitos controles y tratados con FGF-1 a concentraciones saturantes, y tampoco dicha captación pudo ser inhibida por antagonistas purinérgicos o por bloqueantes de los hemicanales. Este tipo de transporte hacia la célula no se puede atribuir a mecanismos dependientes de hemicanales o canales purinérgicos, si no más bien a toxicidad o a mecanismos de captación de baja afinidad.

Si bien el aumento de la captación de AL y BrEt por el FGF-1 podría ser atribuido a una mayor concentración intracelular de los colorantes debido al cambio de forma de los astrocitos reactivos, no encontramos una correlación entre la variación del IC inducida por el FGF-1 a diferentes tiempos y la evolución temporal del cambio morfológico. A tratamientos más prolongados (más de 15 h), los astrocitos disminuyen el diámetro de su soma y su IC se acerca al de los tratamientos tempranos, cuando el soma de los astrocitos es de mayor diámetro (figura 17).

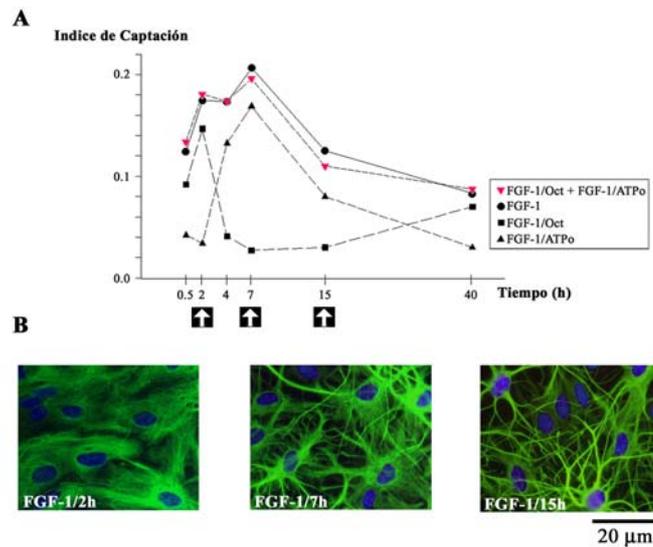


Figura 18 - El FGF-1 induce cambios morfológicos en los astrocitos

- A- Se adjunta la gráfica del recuadro de la figura 10 B para su comparación con la figura 18 B. Evolución temporal del índice de captación para el AL en monocapas confluentes de astrocitos tratadas con FGF-1 en ausencia (círculos negros), o en presencia de Octanol (cuadrados negros) o ATPo (triángulos negros) en el momento del registro. ($p < 0,05$ en cada caso, U-Test). Se superpuso además la suma de las captaciones en presencia de ATPo y octanol (triángulos rojos).
- B- Inmunofluorescencia anti-GFAP a las 2, 7, 15 h de tratamiento con FGF-1. Los núcleos celulares han sido contrastados con DAPI. Se puede apreciar la ausencia de correlación entre el cambio de forma de los astrocitos tratados con FGF-1 a distintos tiempos y la variación de la permeabilidad de membrana

9.2 Mecanismos subyacentes al aumento del número de hemicanales funcionales presentes en la membrana de no-uni3n inducido por el FGF-1

El aumento en el número de hemicanales funcionales detectado por las pruebas funcionales arriba mencionadas, puede deberse a, (1) un aumento en la cantidad de hemicanales (proteína o Cx) presente en la membrana de no uni3n y/o a (2) cambios en las propiedades cin3ticas de los hemicanales. A su vez, aumentos en la cantidad de

hemicanales (1) pueden deberse a una mayor síntesis *de novo*, a una mayor estabilidad del ARNm, o a un aumento en la inserción de hemicanales preformados o a una disminución de su degradación. Los cambios en las propiedades cinéticas de los hemicanales (2) pueden deberse a, aumentos en el tiempo medio y/o frecuencia media de apertura y/o a variaciones en la conductancia individual de los mismos.

Como aproximación a esta pregunta, primero debimos identificar algunas de las Cxs que conforman hemicanales en los astrocitos espinales para determinar luego si los niveles de Cxs de los hemicanales y sus movilidad electrofóretica estarían regulados por el FGF-1. En este sentido, la biotilización de proteínas de superficie y posterior análisis por *immunoblot* reveló la presencia de hemicanales constituidos por Cx43 y por Cx45. En situación basal, estos hemicanales tendrían una baja probabilidad de apertura ya que la captación de Amarillo Lucifer por los astrocitos control fue muy baja o despreciable en todos los tiempos estudiados. Esta hipótesis sería concordante con referencias previas (Contreras y col, 2003) que reportan una baja probabilidad apertura para los hemicanales formados de Cx43 en situación fisiológica. Estudios electrofisiológicos en células tranfectadas con el ADNc de Cx45 podrían aclarar más este punto.

Las estimaciones del porcentaje de Cx que forma hemicanales en cultivos de astrocitos espinales en situación control, mostraron que existe una fracción importante de la Cx45 total (16%) destinada a la membrana de no-uniión. La falta de inmunoreactividad puntiforme anti-Cx45 en zonas de aposición celular en astrocitos espinales, nos permite proponer que dicha proteína no se encuentra formando uniones en hendidura y que por sus considerables niveles en la membrana de no-uniión, su posible función en estas células estaría vinculada principalmente a constituir hemicanales.

Los niveles de Cx43 que forma hemicanales en la membrana de no-uniión detectada en astrocitos espinales en situación control (6,5 %), fueron menores que para la Cx45. El resto de la Cx43 se encuentra formando canales intercelulares (uniones en hendidura) o en compartimentos intracelulares posiblemente de síntesis o degradación de la proteína.

Los astrocitos espinales expuestos a FGF-1 por 7 h expresan hemicanales de uniones en hendidura compuestos también, por la Cx43 y la Cx45. A las 7 h de

tratamiento con FGF-1, aumentan principalmente los niveles de hemicanales de Cx45, sin que se afecten los niveles de hemicanales de Cx43, aunque disminuye los niveles de su forma no fosforilada. El incremento en los niveles de Cx45 se correlacionó con el aumento en la inmunoreactividad (marca difusa) y niveles totales de Cx45. Estos resultados muestran que existe un aumento en la cantidad de proteína en la membrana celular de los astrocitos sometidos a FGF-1-7 h. También, estos hemicanales podrían tener una mayor probabilidad de apertura ya que la permeabilidad de la membrana de no-uniión al Amarillo Lucifer se incrementó considerablemente, aunque con las técnicas empleadas no podemos afirmar si existieron cambios en las propiedades cinéticas de los hemicanales o simplemente existió un aumento en el número de hemicanales en la membrana con las mismas propiedades que en situación control.

La Cx43 por sí sola no podría ser la Cx involucrada en el aumento de permeabilidad de membrana ya que presentó una leve disminución en sus niveles ante el tratamiento con FGF-1, tanto en las muestras biotiniladas como en los Western Blot de proteínas totales. Los cambios en los patrones de movilidad electroforética de la Cx43 de los astrocitos tratados con FGF-1 nos sugieren además una modificación postraduccional de la proteína, posiblemente fosforilación, que podría llegar a alterar el “gating” de los canales de la Cx43. Este fenómeno ha sido asociado en algunos sistemas a un descenso en la probabilidad de apertura de los canales (Sáez y col, 2003). Sin embargo, en este modelo, no sabemos si este cambio se correlaciona con un descenso o un aumento de la apertura del hemicanal.

Si bien aquí nosotros le asignamos un significado importante a la apertura de hemicanales compuestos de Cx45 en el aumento de la permeabilidad de membrana de los astrocitos tratados con FGF-1-7 h, la carencia aún de fármacos específicos para bloquear canales compuestos de Cx45 y la posible presencia de otras Cxs en la membrana de no-uniión de los astrocitos (i.e., Cx40) nos impiden concluir que esta Cx sea la única responsable del fenómeno estudiado. Estudios más específicos como el empleo de ratones *Knock-out-in* y la utilización de ARNs de interferencia para la Cx45 aclararían más este punto (Sohl y Willecke, 2004).

Los hemicanales modulables por el FGF-1 en los astrocitos espinales podrían ser homoméricos (compuestos por un solo tipo de Cx) de Cx45, de Cx43 o eventualmente heteroméricos (compuestos por 2 tipos de Cxs) de Cx43/Cx45 o por alguna otra

combinación posible con el resto de las Cxs expresadas por los astrocitos (Cx40 y Cx30). En relación a la Cx40, la inmunorreactividad anti-Cx40 mostró un aumento importante de la marca difusa en astrocitos sometidos a FGF-1 por 7h (figura 18). No hay antecedentes que demuestren la existencia de hemicanales heteroméricos en astrocitos. Sin embargo, la compatibilidad de estas conexinas para formar canales heteroméricos ha sido demostrada en células Hela cotranfectadas con el ADNc de la Cx43 y la Cx45. Esta posibilidad es interesante ya que la permeabilidad y las propiedades electrofisiológicas y de regulación de los canales de las uniones en hendidura y de los hemicanales de la membrana de no-uniión, pueden variar de acuerdo al tipo de conexina que compone el canal. De esta forma, Martínez y colaboradores mostraron que canales heteroméricos de Cx43/Cx45 presentan conductancias y propiedades de permeabilidad diferentes a las descritas para los canales homoméricos de Cx43 o Cx45 canal (Martínez *y col*, 2002). Algunas de estas propiedades fueron dominadas por la Cx predominante en el canal heteromérico. También existen antecedentes en hemicanales que reportan que la coexpresión de otras Cxs (Cx56 y Cx45.6) genera conexiones con propiedades electrofisiológicas novedosas, que podrían ser explicadas por la formación de hemicanales heteroméricos que contienen ambos tipos de Cxs en oocitos (Ebihara *y col*, 1999).

En suma, los resultados hasta ahora obtenidos nos permiten postular que el aumento de captación de colorante inducido por el FGF-1 a las 7 h en astrocitos espinales, se debería, al menos en parte, a un aumento en el número de hemicanales funcionales que contienen Cx45 en la membrana de no-uniión (por una mayor síntesis *de novo*, una mayor estabilidad del ARNm, o un aumento en la inserción de hemicanales preformados), y/o a cambios en las propiedades cinéticas (tiempo medio y frecuencia de apertura) o de la conductancia individual de los hemicanales homoméricos de Cx43 o de Cx45, o de eventuales hemicanales heteroméricos de Cx43/Cx45. El FGF-1 podría regular además la proporción de hemicanales abiertos (con distintas conductancias) (homoméricos de Cx43 y Cx45 heteroméricos de Cx43/Cx45), afectando también así las propiedades de permeabilidad de la membrana de no-uniión.

La mayoría de los reportes sobre hemicanales tratan sobre aquellos compuestos de Cx43. Hasta el momento tampoco hay trabajos descritos en lo concerniente a la regulación de hemicanales de Cx45 y su regulación por citoquinas o factores de

crecimiento. Aquí nosotros mostramos novedosas evidencias que muestran una regulación de hemicanales compuestos de Cx45 por el FGF-1.

9.3 Mecanismos responsables de la disminución del acoplamiento intercelular de los astrocitos espinales tratados con FGF-1

En situación control, los astrocitos de médula espinal presentaron un bajo nivel de acoplamiento medido mediante la técnica de *scrape loading*. En experimentos de acoplamiento de colorante además encontramos un bajo índice de acoplamiento (1 a 2 células acopladas por inyección). La disminución del acoplamiento intercelular de los astrocitos espinales tratados con FGF-1 se debió a una disminución en el número de canales intercelulares funcionales presentes en la membrana de unión (unión en hendidura) de dichas células. La disminución considerable en la incidencia de acoplamiento funcional de los astrocitos espinales ante tratamiento con FGF-1-7 h, afianza aportes ya existentes que reportan que diversas citoquinas y factores de crecimiento reducen la comunicación intercelular mediada por uniones en hendidura en astrocitos (John y col, 1999; Scemes y col, 2000; Brosnan y col, 2001; Reus 2003).

La disminución en el número de canales intercelulares funcionales en la unión en hendidura, pudo deberse a su vez a (1) una disminución en la cantidad de canales intercelulares (proteína o Cx) presentes en la membrana de unión y/o a (2) cambios en las propiedades cinéticas de los canales intercelulares. Los experimentos de *Western Blot* e inmunofluorescencia anti-Cx43 nos sugieren que esta disminución de la comunicación intercelular mediada por uniones en hendidura en astrocitos puede ser atribuida al descenso del nivel de proteína. Dado que no hubo un cambio apreciable en la distribución de Cx43 en astrocitos tratados con FGF-1 no esperamos cambios en la compartimentalización de dicha Cx. A su vez el aumento en la relación de las bandas fosforiladas P2-P3/NP podría estar en la base de un mecanismo de modificación postraduccional, como fosforilación. Variaciones en los estados de fosforilación de la Cx43 se han correlacionado con variaciones en las propiedades cinéticas de los canales intercelulares (Sáez y col, 2003). Algo de reparo habría que tener con esta interpretación dado que similar cambio en la movilidad electroforética fue observado en las muestras biotiniladas (ver más adelante), y no deberíamos descartar que los resultados obtenidos

con WB de muestras totales estén reflejando la modulación del FGF-1 sobre los hemicanales formados por Cx43 más que una modificación sobre las Cxs en las uniones en hendidura. De esta manera, el mecanismo que explicaría la disminución del acoplamiento funcional sería diferente. En este sentido se ha sugerido que la acumulación de especies reactivas del oxígeno producto del tratamiento de astrocitos con LPS disminuiría el acoplamiento por uniones en hendidura (Bolaños et al, 1996) aunque no han sido descritas hasta el momento modificaciones postraduccionales de las Cxs como nitración o nitrosilación. Protocolos de experimentación que permitan purificar las Cx que forman las uniones en hendidura deberían ser desarrollados para aclarar este punto.

9.4 Mecanismos subyacentes al aumento en el número de canales purinérgicos funcionales presentes en la membrana celular (de no-uni3n) inducido por el FGF-1

El aumento en el n3mero de canales purinérgicos funcionales por FGF-1-30 min y FGF-1- 2 h, puede deberse, como en el caso de los hemicanales, a un aumento en la cantidad de prote3na presente en la membrana de no uni3n y/o a cambios en las propiedades cin3ticas de los canales purinérgicos.

Se ha descrito en astrocitos que diferentes tipos de citoquinas pueden regular la actividad de canales purinérgicos. La IL-1 β aumenta la cantidad de mensajero de las subunidades proteicas de los canales P2X7. Esto se correlacion3 con un aumento de la cantidad de prote3na en la membrana celular (Narcisse y col, 2005). A su vez el ATP liberado de los astrocitos en situaciones de da3o celular o durante el desarrollo del estado reactivo puede actuar sobre receptores P2X de macr3fagos para aumentar la liberaci3n vesicular IL-1 β (Bianco y col, 2005). IFN- γ induce la liberaci3n de ATP desde astrocitos, el cual act3a sobre los receptores P2X7 de microgl3as. La actividad excesiva de estos receptores en la microgl3a resulta en la apoptosis de las mismas. Esto se ha implicado en el control del n3mero de c3lulas en el foco inflamatorio (Verderio y col, 2001). En este sentido se ha descrito recientemente que la acumulaci3n de ATP en modelos de injuria espinal desencadena la muerte de neuronas al activar la entrada masiva de calcio por activaci3n de receptores P2X7 (Wang y col, 2004). Por lo tanto, la actividad prolongada de canales purinérgicos ionotr3picos puede tener consecuencias delet3reas en la supervivencia celular.

Como el estudio de los mecanismos de regulación de los canales purinérgicos no fue objetivo de esta tesis, no profundizamos los hallazgos funcionales y farmacológicos que sugieren que tempranamente, el FGF-1 aumenta la cantidad de canales purinérgicos P2X funcionales. No existen hasta el momento reportes que muestren una regulación de canales P2X por FGFs, lo que para nosotros puede ser objeto de análisis más detallado en el futuro mediato.

9.5 El aumento de la permeabilidad de la membrana inducido por el FGF-1-7 h a través de hemicanales en astrocitos espinales, está mediado por un factor de difusión extracelular, el ATP, y por la activación temprana de canales purinérgicos

La incubación de los astrocitos espinales con ATP indujo una captación de colorante comparable a la del FGF-1-7 h. El efecto sobre la permeabilidad de la membrana al AL de este factor de crecimiento fue inhibida por la presencia de apirasa. Estos hallazgos tomados en conjunto, permiten afirmar que el aumento de la captación de colorante por la membrana de no-unión inducido por el FGF-1-7 h en astrocitos, está mediado, al menos en parte, por la acumulación de ATP extracelular (o alguno de sus derivados) tal como fue propuesto en los antecedentes de esta tesis. Para afirmar que el ATP es el mediador de la regulación de hemicanales compuestos de Cx45 en astrocitos espinales, se deberá determinar en un futuro, si el aumento de la marca difusa para la Cx45 y el aumento de los niveles de Cx45 que forma hemicanales inducidos por el FGF-1, son también imitados por el ATP y bloqueados por la apirasa. También se deberá confirmar que los astrocitos espinales liberan ATP al medio extracelular durante el tratamiento con FGF-1, y sería interesante investigar el curso temporal de dicha liberación.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que a las 2 h de tratamiento con FGF-1 (FGF-1-2 h), la presencia de canales purinérgicos funcionales es la responsable principal del aumento de la captación de AL inducida por el FGF-1-2 h, mientras que a las 7 h de tratamiento con FGF-1, la presencia de hemicanales funcionales es la responsable principal del aumento de la captación de AL inducida por el FGF-1-7 h. De estos hallazgos surgió la pregunta de si la apertura previa de los canales purinérgicos era una condición necesaria para que se indujera un aumento en el número de hemicanales funcionales ante el tratamiento con FGF-1-7 h. El bloqueo farmacológico de los canales purinérgicos P2X durante el tratamiento con FGF-1-7 h, inhibió el aumento de la

permeabilidad de los hemicanales inducido por FGF-1-7 h. Así pues, la activación temprana de los receptores P2X7 por el FGF-1, es necesaria para el aumento de la permeabilidad de membrana al Amarillo Lucifer dependiente de hemicanales inducido por el FGF-1-7 h.

El nexo entre el ATP y la activación de receptores purinérgicos es claro. El ATP se sabe activa a receptores purinérgicos tanto de tipo P2X como P2Y (ver antecedentes). Sugerimos pues, que, en el transcurso del tratamiento del astrocito con FGF-1 y su transformación a un fenotipo reactivo y neurotóxico, el astrocito libera ATP el cual activaría a canales purinérgicos expresados en dichas células y en dichas condiciones.

Cuáles serían el o los nexos existentes entre la activación más temprana de receptores purinérgicos ionotrópicos, y el aumento más tardío en el número de hemicanales funcionales, ambos fenómenos observados en nuestros experimentos?.

La activación de receptores purinérgicos puede regular la transcripción de genes (NFk-b y AP1) que han sido asociados con la regulación de la expresión de diferentes tipos de conexinas (Sáez y col, 2003). Las elevadas concentraciones de ATP (>200 μ M) actúan sobre los receptores P2X7 produciendo a través de mecanismos dependientes de calcio, una traslocación nuclear del factor transcripcional NFk-b en osteoclastos y macrófagos (KorcoK y col, 2004; Aga y col, 2004). Por otra parte, altas concentraciones de calcio intracelular inducen un aumento en los niveles de NFk-b en linfocitos (Dolmetsch y col, 1997). En astrocitos humanos, la señalización a través de los receptores purinérgicos regula la transcripción de genes (NFk-b y AP1) involucrados en las respuestas inflamatorias (John y col, 2001). Por otro lado, se ha sugerido que receptores purinérgicos ionotrópicos (y también los P2Y) están acoplados con la IP3-k (Huwiler y col, 2002; Neary Jacques-Silva y col, 2004). La IP3-k podría facilitar la traslocación nuclear de NFk-b (Wymann y col, 2003). Así pues, la IP3-k podría ser el nexo entre la activación de receptores purinérgicos y un aumento de la expresión de conexinas que componen hemicanales, en nuestro estudio, de Cx45. En experimentos que no mostramos en esta tesis, pudimos inhibir la captación de trazadores de la permeabilidad de hemicanales inducida por FGF-1 con LY294002 y Wortmanin, bloqueantes de la actividad de dicha quinasa.

Así pues, existiría en nuestro modelo una vía de señalización que involucraría la apertura temprana de canales P2X por acumulación de ATP, la activación de la IP3-k y la generación de una señal que permitiría el aumento de la expresión de Cx45 (u otras Cxs no estudiadas por nosotros) que forma hemicanales en la membrana de no-unión en astrocitos expuestos a FGF-1.

Si bien se ha reportado que existe una asociación entre receptores purinérgicos P2Y (acoplados a proteínas G) y las uniones en hendidura en astrocitos espinales (Scemes y col, 2001, Brosnan y col, 2001, nuevos de Scemes, 2005, Fortes y col, , 2005) no hay actualmente trabajos que describan una asociación entre el estado funcional de receptores P2X7 (inonotrópicos) y hemicanales.

Será razón de una investigación futura describir más en detalle una vía que vincule al ATP, sus receptores P2X, la activación de la vía dependiente de IP3-k y el posible efecto de esta última sobre la regulación de la transcripción o sobre la compartimentalización celular de Cxs en regulación de la comunicación intercelular mediada por hemicanales en astrocitos.

9.6 Implicancias fisiológicas de la modulación de hemicanales de uniones en hendidura por el FGF-1 en astrocitos espinales. Participación de la modulación de hemicanales por el FGF-1 en la señalización intercelular

En relación a la señalización celular, proponemos que los astrocitos espinales expuestos a FGF-1, mostrarán un cambio en la predominancia de sus mecanismos de señalización, de una vía intercelular mediada por uniones en hendidura a una vía extracelular mediada por hemicanales y canales purinérgicos.

Los astrocitos presentan una forma de excitabilidad basada en la transmisión de variaciones en la concentración intracelular de Ca^{2+} libre (ondas de calcio).

Para coordinar la transmisión por ondas de calcio, los astrocitos pueden utilizar tanto los canales intercelulares que conforman las uniones en hendidura como los hemicanales expuestos en la membrana de no-unión. Tanto el IP3 como el Ca^{2+} se proponen como transductores de la señalización a través de las uniones en hendidura (Sáez y col, 1989). Alternativamente, en astrocitos, las ondas de calcio también pueden estar mediadas por la difusión de moléculas como el ATP al medio extracelular (Charles, 1998; Giaume y

Venance, 1998). La liberación de estas moléculas de señalización parácrina (como ATP o glutamato) al espacio extracelular podría ocurrir a través de hemicanales funcionales expuestos en la membrana de no-unión. El ATP liberado puede actuar sobre los receptores P2X o P2Y para generar distintos patrones de cambio en la concentración intracelular de calcio. Así pues, se posibilitaría la sincronización de astrocitos sin la necesidad de una vía de comunicación intracelular.

Nuestros resultados avalan la existencia de hemicanales compuestos por Cxs y canales P2X funcionales en la membrana que no forma uniones en hendidura en astrocitos espinales tratados con FGF-1. Esta citoquina además disminuye la comunicación intercelular mediada por uniones en hendidura. Aquí surge la posibilidad muy interesante, aún no descrita, que en astrocitos sometidos a tratamiento con FGF-1 se generen ondas de calcio transmitidas vía la acción conjunta de hemicanales y canales purinérgicos ionotrópicos. Las ondas de calcio serían mediadas por la difusión extracelular del ATP liberado a través de los hemicanales por los astrocitos, el cual actuaría sobre receptores purinérgicos para determinar variaciones propagadas en la concentración intracelular de calcio. Esto último dependería de la densidad y distribución de receptores purinérgicos, la afinidad de los mismos por el ATP (o sus derivados), y la proximidad a los sitios de liberación de ATP (posiblemente hemicanales) en astrocitos tratados con FGF-1.

Por lo tanto canales purinérgicos y hemicanales podrían actuar cooperativamente y favorecer la señalización extracelular al coordinar la liberación de ATP (sin descartar otros mediadores como NAD⁺, o glutamato) en células que reducen su acoplamiento intercelular por uniones en hendidura. De esta manera la acción conjunta de hemicanales y P2X constituiría un mecanismo importante en la transmisión de ondas de calcio durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria de los astrocitos. *Es un objetivo de futuro para nosotros demostrar la generación de ondas de calcio por FGF-1 y sus mecanismos de propagación en astrocitos.*

9.7 Posibles implicancias fisiopatológicas de la apertura de hemicanales

Las redes funcionales de astrocitos son cruciales para mantener la homeostasis del sistema nervioso. Alteraciones de esta importante función podrían comprometer la salud neuronal, conduciendo a la disfunción e incluso a la muerte neuronal (Reuss y Unsicker, 1998). La modulación de hemicanales por citoquinas y la participación de esta

modulación en la propagación y/o amplificación de daño o protección celular, constituyen áreas que recién comienzan a desarrollarse. En otros sistemas, los hemicanales compuestos por Cx43 participan de manera alternativa según el entorno celular. Previenen la apoptosis en células osteoblásticas durante la osteogénesis (Plotkin y col, 2002) y aceleran de la muerte celular durante la inhibición metabólica (John y col, 1999; Kondo y col, 2000; Contreras y col, 2002). De la misma manera, en el sistema nervioso central, existe una extensa bibliografía concerniente a la participación de la modulación de las uniones en hendidura sobre la vulnerabilidad neuronal. En distintas regiones, las uniones en hendidura de los astrocitos participan en la propagación y en la amplificación de señales de injuria y/o de “rescate” celular entre astrocitos y sobre la población neuronal. También existen importantes referencias que reportan alteraciones en los niveles y la distribución de las conexinas de astrocitos en distintas patologías neurodegenerativas tales como la enfermedad de Huntington (Vis y col, 1998) y la Esclerosis Múltiple (en: Brosnan y col, 2001). No existen reportes en modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica y nuestros resultados podrían resultar de interés para la fisiopatología de dicha entidad.

Nuestro estudio se realiza en un modelo astrocitos reactivos que provocan muerte de motoneuronas en situaciones de co-cultivo. Los astrocitos reactivos se encuentran en la inflamación tisular presente en enfermedades neurodegenerativas, el daño, el traumatismo, o la isquemia del parénquima nervioso. El estudio de los mecanismos de comunicación astrocitaria durante el desarrollo del fenotipo neurotóxico aportará a la comprensión de los mecanismos de propagación de injuria o de protección en enfermedades neuro-degenerativas. De acuerdo a resultados obtenidos en un trabajo paralelo a nuestra tesis, el tratamiento con FGF-1 induce, en los astrocitos derivados de la médula espinal, (a) un estado reactivo, y (b) la adquisición de un fenotipo neurotóxico (Cassina y col, 2005).

Nosotros hemos corroborado que la neurotoxicidad comienza a partir de las 7 horas de tratamiento con FGF-1, momento en el cual detectamos un claro aumento en la permeabilidad de membrana a trazadores de hemicanales (figura 19).

Algunas preguntas surgen a partir de estos hallazgos: a) ¿Existe alguna correlación entre la modulación de los hemicanales inducida por el FGF-1, y el mantenimiento o la propagación de la reactividad de los astrocitos espinales?

La apertura de los hemicanales en la membrana que no forma unión en hendidura de los astrocitos constituiría una vía rápida para el intercambio de sustratos energéticos con el medio que les permitiría adaptarse a su nuevo estado reactivo; o, como mencionamos, la apertura de hemicanales permitiría la liberación de factores difusibles capaces de reforzar el estado reactivo de los astrocitos.

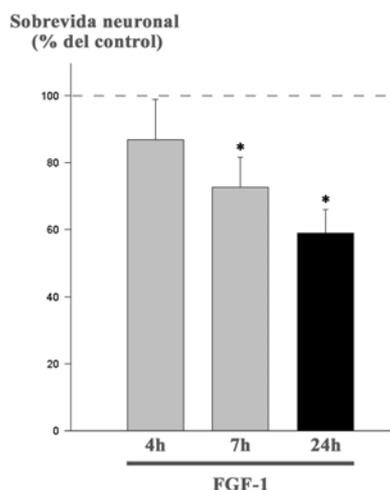


Figura 19 - El FGF-1 disminuye la sobrevida neuronal en cocultivos de astrocito-motoneuronas

Sobrevida de motoneuronas (% del control) sembradas sobre astrocitos tratados con FGF-1 por 4, 7, y 24 h. Nótese la disminución de la sobrevida neuronal a partir de las 7 h de tratamiento con FGF-1.

Por otra parte, la modulación de canales formados de Cxs en astrocitos inducida por el FGF-1 participa de alguna manera en la muerte neuronal? En estudios paralelos se ha atribuido la muerte neuronal a que los astrocitos reactivos aumenta la liberación conjunta de NGF y NO los cuales provocan la muerte de motoneuronas embrionarias, las cuales sobreexpresan el receptor p75 (Pehar y col, 2004). Quedará por determinar si los hemicanales tienen alguna participación en la regulación de la liberación de vesicular NGF.

En este sentido, datos preliminares muestran que la aplicación de ácido 18-alfa-glicirretínico a monocapas de astrocitos previamente tratados con FGF-1, mostraron una reducción de la muerte motoneuronas mantenidas en cocultivo (datos no mostrados). En efecto, la supervivencia de las motoneuronas en co-cultivos tratados con el bloqueante tuvieron valores comparables a los de la situación control (n=3) comparados con la reducción provocada por el pretratamiento con FGF-1. Estos resultados sugieren una eventual participación de canales formados por conexinas, posiblemente hemicanales, en la promoción de daño neuronal durante el desarrollo del fenotipo neurotóxico inducido por el FGF-1. De todos modos, por ahora esta interpretación debe ser muy cuidadosa por los siguientes motivos, (a) no sabemos si los niveles y la distribución de

Cxs de los astrocitos en cocultivos son afectadas por la presencia de motoneuronas. Se ha reportado que la mera presencia de neuronas altera el estado acoplamiento los niveles de Cxs en astrocitos (Giaume y col, 2002),

(b) no se puede establecer si efecto del ácido α -GA es sobre los hemicanales o sobre las uniones en hendidura de los astrocitos, aunque dado que la incidencia de acoplamiento de astrocitos tratados con FGF-1 7h es muy baja (20%) la participación de las uniones en hendidura sería poco relevante.

En suma, la eventualidad de que la apertura de los hemicanales por el FGF-1 juegue un papel en el desarrollo de la gliosis reactiva y la adquisición del fenotipo tóxico para las motoneuronas, deberá confirmarse en el futuro.

10- Conclusiones

10.1 Los astrocitos espinales expresan hemicanales compuestos de Cx43 y Cx45.

10.2 El FGF-1 aumenta la cantidad de hemicanales funcionales en la membrana que no forma uniones en hendidura que están compuestos de Cx45 al tiempo que el FGF-1 disminuye la comunicación intercelular a través de uniones en hendidura en astrocitos espinales.

10.3 Un factor de difusión extracelular, el ATP o sus derivados, y la activación previa de canales purinérgicos P2X, median los efectos del FGF-1 sobre la permeabilidad de la membrana a través de hemicanales en astrocitos espinales.

11- Perspectivas

11.1 Los astrocitos presentan una forma de comunicación intercelular basada en “ondas de calcio” que pueden propagarse a través de uniones en hendidura y hemicanales. ¿La regulación por FGF-1 de la permeabilidad de membrana a

solutos orgánicos a través de hemicanales y P2X7 podría reflejar un mecanismo novedoso para la generación y transmisión de “ondas” de calcio en astrocitos ?

11.2 ¿Las vías de señalización intracelular desencadenadas por la activación del canal P2X7 por ATP, regularán la transcripción o la distribución de Cxs en astrocitos espinales?

11.3 ¿Existirán mecanismos de cooperación entre los hemicanales y canales P2X7? ¿Compartirán los mismos dominio de membrana formando clusters o se encontrarán segregados entre sí?

11.4 ¿El FGF-1 regularía además la cinética de apertura de los hemicanales?

Referencias

Abudara,V., and C. Eyzaguirre, Modulation of Junctional Conductance between Rat Carotid Body Glomus Cells by Hypoxia, cAMP and Acidity, Brain Research 792 1998, 114 - 125.

Abudara,V., G. Garcés and Juan C. Sáez, Cells of the carotid body express connexin43 which is up-regulated by cAMP. Brain Research 849 (1999) 25 - 33.

Abudara,V., R.G. Jiang and C. Eyzaguirre, Behavior of junction channels between rat glomus cells during normoxia and hypoxia. J. Neurophysiol. 88 (2): 639 - 649, 2002.

Araque A, Carmignoto G, and Haydon PG(2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. Annu. Rev. Physiol., 63:795-893.

Batter DK, Corpina RA, Roy C, Spray DC, Hertzberg EL, Kessler JA. Heterogeneity in gap junction expression in astrocytes cultured from different brain regions. Glia. 1992;6(3):213-21.

Bennett MV, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Saez JC, Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron*. 1991 Mar;6(3):305-20.

Bennett MV, Contreras JE, Bukauskas FF, Sáez JC. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci*. 2003 Nov;26(11):610-7. Review.

Berridge MJ. The AM and FM of calcium signaling. *Nature* 1997. 386;759-760.

Bianco F, Pravettoni E, Colombo A, Schenk U, Moller T, Matteoli M, Verderio C. Astrocyte-Derived ATP Induces Vesicle Shedding and IL-1 β release from microglia. *J Immunol*. 2005 Jun 1;174(11):7268-77

Brosnan CF, Scemes E, & Spray DV. Cytokine regulation of en hendidura junction connectivity: an open and shut case or changing partners at the nexus. *American journal of pathology* 2001,138.

Bruzzone R, White W, and Paul D Connection with connexin the basis of direct intercellular signaling .*Eur.J.Biochem*.1996. 238:1-27.

Bruzzone S, Franco L, Guida L, et al,. A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD⁺ and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem*. 2001, 276, 48300–48308.

Bukauskas FF, Elfgang C, Willecke K, Weingart R. Biophysical properties of gap junction channels formed by mouse connexin40 in induced pairs of transfected human HeLa cells. *Biophys J*. 1995 Jun;68(6):2289-98.

Burgess W. H. and Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* .1989, **58**, 575-606.

Cassina P., Peluffo H., Pehar M., Martinez-Palma L., Ressia A., Beckman J. S.,

Estevez A. G. and Barbeito L. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J Neurosci Res* . 2002, **67**, 21-29.

Cassina P, Pehar M, Vargas MR, Castellanos R, Barbeito AG, Estévez AG, Thompson JA, Beckman J, and Barbeito L. Astrocyte Activation by Fibroblast Growth Factor-1 and Motor Neuron Apoptosis: Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis *J Neurochem* 2005 93(1): 38-46.

Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX. Mechanical Strain Opens Connexin 43 Hemichannels in Osteocytes: A Novel Mechanism for the Release of Prostaglandin. *Mol Biol Cell*. 2005 Apr 20.

Clarke W. E., Berry M., Smith C., Kent A. and Logan A. (2001) Coordination of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) trafficking to nuclei of reactive astrocytes around cerebral lesions in adult rats. *Mol Cell Neurosci* **17**, 17-30.

Contreras J, Sanchez H, Eugenin E, Peidel J, Thels M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MVL, Saéz, JC. Metabolic inhibition induce opening of unapposed connexin 43 gap junctions hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *PNAS*.2002, 99(1):495-500.

Cooper CD and Lampe PD. Casein Kinase 1Regulates Connexin-43 gap junctions assembly. 2002,277:47,44962-44968.

Dermietzel R, Gao Y, Scemes E, Vieira D, Urban M, Kremer M, Bennett MV, Spray DC. Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000, 32(1):45-56.

Elde R, Cao YH, Cintra A, Brelje TC, Pelto-Huikko M, Junttila T, Fuxe K, Pettersson RF, Hokfelt T. Prominent expression of acidic fibroblast grow factor in motor and sensory neurons. *Neuron*.1991, 7:349-364

- Eckenstein F. P. (1994) Fibroblast growth factors in the nervous system. *J. Neurobiol.* **25**, 1467-1480.
- Giaume C and McCarthy KD, Control of gap-junction communication in astrocytes networks. *TINS.* 1996;19:8.
- Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR. Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 23;1662(1-2):96-101. Review.
- Gonzalez A. M., Berry M., Maher P. A., Logan A. and Baird A. (1995) A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. *Brain Res* **701**, 201-226.
- Hofer T, Venance L, Giaume C. Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. *J Neurosci.* 2002 Jun 15;22 12:4850-9.
- Kalvelyte A, Imbrasaite A, Bukauskiene A, Verselis VK, Bukauskas FF. Connexins and apoptotic transformation. *Biochem Pharmacol.* 2003 Oct 15;66(8):1661-72
- Kresse A., Pettersson R. and Hokfelt T. (1995) Distribution of acidic fibroblast growth factor mRNA-expressing neurons in the adult mouse central nervous system. *J Comp Neurol* **359**, 323-339.
- Lee S, Kim WT, Cornell Bell AH, Sontheimer H. Astrocytes exhibit regional specificity in gap junction coupling. (1994) *Glia* 11(4): 315-325.
- Levine, JB; Kong; Nadler, M; and Xue. Astrocytes interact intimately with degenerating motor neuron in mouse Amyotrophic Lateral Sclerosis. 1999, *Glia.*,28:215-24.
- Liu X. and Zhu X. Z. (1999) Increased expression and nuclear accumulation of basic fibroblast growth factor in primary cultured astrocytes following ischemic-like insults. *Brain Res Mol Brain Res* **71**, 171-177.

McGeer PL, and McGeer EG. Inflammatory processes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Muscle & Nerve* octubre 2002

Martínez, A; and Saéz, JC. Arachidonic acid induced dye coupling in rat cortical astrocytes is modulated by arachidonic acid byproducts. *Brain Research.*, 1999. 816: 411-423.

Moreno AP, Laing JG, Beyer EC, Spray DC. Properties of gap junction channels formed of connexin 45 endogenously expressed in human hepatoma (SKHep1) cells. *Am J Physiol.* 1995 Feb;268(2 Pt 1):C356-65

Mouta Carreira C., Landriscina M., Bellum S., Prudovsky I. and Maciag T. The comparative release of FGF1 by hypoxia and temperature stress. *Growth Factors* 2001 **18**, 277-285.

Narcisse L, Scemes E, Zhao Y, Lee SC, Brosnan CF. The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia.* 2005 15;49(2):245-58

Neary JT, Whittemore SR, Zhu Q, Norenberg MD. Synergistic activation of DNA synthesis in astrocytes by fibroblast growth factors and extracellular ATP. *J Neurochem.* 1994 63(2):490-4.

Neary JT, Kang Y, Shi YF. Signaling from nucleotide receptors to protein kinase cascades in astrocytes. *Neurochem Res.* 2004 Nov;29(11):2037-42.

Nicholson BJ, Weber PA, Cao F, Chang H, Lampe P, Goldberg G. The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz J Med Biol Res.* 2000 Apr;33(4):369-78. Review.

North RA .Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002 82(4):1013-67. Review.

Parpura V, Scemes E, Spray DC. Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction "hemichannels", purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochem Int.* 2004 45(2-3):259-64. Review

Ploktin LI, Manolagas SC, and Bellido T. Transductions of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *The Journal of Biological Chemistry.* 2002, 227:10 8648-8657.

Unwin P.N.T. and Ennis P.D., Two conformations of a channel forming protein. *Nature*, 307: 609-613, 1983.

Unwin P.N.T. and Zampighi G., Structure of junctions between communicating cells. *Nature*, 283: 545-549, 1980.

Rash JE, Yasumura T, Davidson KG, Furman CS, Dudek FE, Nagy JL. Identification of cells expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord. *Cell Commun Adhes.* 2001, 8 (4-6):315-20.

Reuss B, and Unsicker K. 1998. Regulation of gap junction communication by growth factor from non neuronal cells to astroglia: *Glia* 24:32-38.

Reuss B, Dermietzel R, and Unsicker K. Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) differentially regulates connexin (Cx)43 expression and function of astroglial cells from distinct brain regions. *Glia* 1998. 22:19-30.

Reuss B and von Bohlen und Halbach O. Fibroblastic growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 2003, 313:139-157.

Rouach N, Glowinski J, Giaume C. Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol.* 2000 Jun 26;149(7):1513-26.

Ochalski, PAY; Frankenstein; Hertberg; and Nagy, JY. (1997) Connexin 43 rat spinal cord. Localization in astrocytes and identifications of heterotypic astro-oligodendrocyte gap junctions. *Neuroscience.* 76(3): 931-945.

Ono T., Saito H., Kishimoto T., Okumoto T. and Miyamoto K. Stimulation of biosynthesis of nerve growth factor by acidic fibroblast growth factor in cultured mouse astrocytes. *Neurosci Lett* 1991, 126, 18-20.

Pehar M., Cassina P., Vargas M. R., Castellanos R., Viera L., Beckman J. S., Estevez A. G. and Barbeito L. (2004) Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89, 464-473.

Pearson RA, Dale N, Llaudet E, Mobbs P. ATP Released via Gap Junction Hemichannels from the Pigment Epithelium Regulates Neural Retinal Progenitor Proliferation. *Neuron*. 2005 Jun 2;46(5):731-44.

Pottek M, Hoppenstedt W, Janssen-Bienhold U, Schultz K, Perlman R, Weiler. Contribution of connexin26 to electrical feedback inhibition in the turtle retina. *J Comp Neurol*. 2003, 466, 468-477.

Sáez JC, Berthoud VM, Brañes MC, Martínez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*. 2003 Oct; 83(4):1359-400. Review.

Scemes E, Dermietzel R, Spray DC. Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. *Glia*. 1998 24(1):65-73.

Scemes E, Suadicani SO, Spray DC Intercellular communication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation. *J Neurosci*. 2000 15;20(4):1435-45.

Schulman H and Roberts JL. Intracellular signaling. In *Fundamental Neuroscience* second edition, chapter 10. Editors: Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ. 2004. Academic Press

Shin JT, Barbeito L, MacMillan-Crow LA, Beckman JS, Thompson JA. Acidic fibroblast growth factor enhances peroxynitrite-induced apoptosis in primary murine fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Nov 1;335(1):32-41.

Sohl G and Willecke K, Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*, 2004;62:228-232

Stachowiak M. K., Maher P. A., Joy A., Mordechai E. and Stachowiak E. K. 1996. Nuclear localization of functional FGF receptor 1 in human astrocytes suggests a novel mechanism for growth factor action. *Brain Res Mol Brain Res* 38, 161-165.

Stout C.E, Costantin J.L, Naus CC, & Charles, A.C.. Intercellular calcium signaling in astrocytes by ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem*. 2002, 277, 10482-10488.

Spray DC, Scemes E, and Rozental R. Cell-Cell Communication via Gap Junctions. In *Fundamental Neuroscience* first edition, chapter 11. Editors: Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ. 1998. Academic Press

Szebenyi G. and Fallon J. F. (1999) Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol* 185, 45-106.

Valiunas V, Beyer EC, Brink PR. Gap junction channels show quantitative differences in selectivity. *Circ Res*. 2002 Jul 26;91(2):104-11

Veenstra RD, Wang HZ, Beyer EC, Ramanan SV, Brink PR. Connexin37 forms high conductance gap junction channels with subconductance state activity and selective dye and ionic permeabilities. *Biophys J*. 1994 Jun;66(6):1915-28.

Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, Peng WG, Wan P, Li P, Xu Q, Liu QS, Goldman SA, Nedergaard M. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med*. 2004 Aug;10(8):821-7. Epub 2004 Jul 18.

Weissman. TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC, Kriegstein AR. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*. 2004 2;43(5):647-61.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Romualdi A, Güldenagel M, Deutsch U, and Söhl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol.Chem*. 2002,383,725-737.

Xia Y, Nawy S. The gap junction blockers carbenoxelone and 18 beta-glycyrhethinic acid antagonize cone-driven light responses in the mouse retina, *Vis. Neurosci* 2003, 20, 429-435.

Ye et al, Ye Z, Wyeth M.S, Baltam-Tekkok S, & Ransom B.R. Gap junction hemichannels in astrocytes mediate glutamate release upon removal of extracellular divalent cations. *J Neurosci*. 2003, 23, 3588–3596.

Yoshida K. and Gage F. H. (1991) Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain Res* 538, 118-126

Agradecimientos

Agrezco:

- A los miembros del tribunal por aceptar corregir mi trabajo de tesis y por sus valiosas críticas
- A la Dra Abudara y Dra Cassina, y al Dr Juan Carlos Sáez por haberme brindado las herramientas necesarias para mi desarrollo intelectual como científico.
- Al Dr Barbeito por su aportes y sugerencias en la versión preliminar escrita de la tesis.
- Al Lic Retamal por sus valiosos aportes y sugerencias en el abordaje experimental del trabajo.

-Agradezco además a todos los integrantes del departamento de Fisiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, y de los Laboratorios de Neurobiología celular y Comunicación Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República Oriental del Uruguay por la excelente atmósfera de trabajo que construimos.

Indice

1- Resumen

2- Introducción

3- Antecedentes

3.1 Los astrocitos se comunican entre sí a través de canales intercelulares formados por conexinas

3.2 Los canales compuestos por Cxs presentan selectividad iónica y metabólica

3.3 La permeabilidad de las uniones en hendidura puede ser modulada

3.4 Los hemicanales de las uniones en hendidura podrían participar en la comunicación intercelular en astrocitos

3.5 El FGF-1 induce un fenotipo reactivo y neurotóxico en astrocitos espinales

3.6 Durante la gliosis reactiva existe una acumulación de factores difusibles purinérgicos en el medio extracelular

4- Hipótesis de Trabajo

5- Objetivo general

6- Objetivos específicos

7- Materiales y métodos

- 7.1 Cultivos celulares de astrocitos de médula espinal
- 7.2 Captación de colorantes por astrocitos espinales
- 7.3 Acoplamiento de colorante
- 7.4 Inmunofluorescencia. Identificación de astrocitos - Detección de GFAP. Inmunofluorescencia de Conexinas.
- 7.5 Western Blotting
- 7.6 Biotinilización de proteínas de la superficie celular
- 7.7 Drogas y soluciones
- 7.8 Estadísticas

8- Resultados

- 8.1 El FGF-1 aumenta la permeabilidad de la membrana a trazadores de las uniones en hendidura en astrocitos espinales
- 8.2 El aumento de la captación de aniones orgánicos (AL) inducido por FGF-1 se debió a un aumento en el número de hemicanales y también de canales purinérgicos (P2X) funcionales
- 8.3 El tratamiento con FGF-1 incrementó además la captación de cationes orgánicos (BrEt) desde el medio extracelular a través de su pasaje por hemicanales y por canales purinérgicos
- 8.4 El tratamiento con FGF-1 por 7 h disminuyó el acoplamiento intercelular entre astrocitos
- 8.5 El FGF-1 provocó una redistribución de la Cxs 45 en los astrocitos
- 8.6 El FGF-1 aumentó los niveles totales de Cx45 y reguló la movilidad electroforética de las distintas isoformas de la Cx43 en astrocitos espinales
- 8.7 Detección de Cx43 y Cx45 como constituyentes de hemicanales en la membrana que no forma unión en hendidura de los astrocitos espinales
- 8.8 El FGF-1-7 h aumentó los niveles de Cx45 que componen hemicanales y moduló la movilidad electroforética de la Cx43 que componen hemicanales
- 8.9 El ATP es el mediador de difusión extracelular de los efectos del FGF-1 sobre la permeabilidad de la membrana que no forma unión en hendidura a las 7 h de tratamiento. La apertura previa de canales purinérgicos es necesaria para el aumento de la permeabilidad dependiente de hemicanales inducida por FGF-1

9- Discusión

9.1 Eventos responsables del aumento de la permeabilidad de la membrana que no forma unión en hendidura a trazadores de permeabilidad de hemicanales inducido por FGF-1 en astrocitos espinales

9.2 Mecanismos subyacentes al aumento del número de hemicanales funcionales presentes en la membrana de no-unión inducido por el FGF-1

9.3 Mecanismos responsables de la disminución del acoplamiento intercelular de los astrocitos espinales tratados con FGF-1

9.4 Mecanismos subyacentes al aumento en el número de canales purinérgicos funcionales presentes en la membrana celular (de no-unión) inducido por el FGF-1

9.5 El aumento de la permeabilidad de la membrana inducido por el FGF-1-7 h a través de hemicanales en astrocitos espinales, está mediado por un factor de difusión extracelular, el ATP, y por la activación temprana de canales purinérgicos

9.6 Implicancias fisiológicas de la modulación de hemicanales de uniones en hendidura por el FGF-1 en astrocitos espinales. Participación de la modulación de hemicanales por el FGF-1 en la señalización intercelular

les implicancias fisiopatológicas de la apertura de hemicanales

10- Conclusiones

11- Perspectivas

12- Referencias

