

Los receptores purinérgicos P2X₇ y los hemicanales formados de panexina-1 y conexina-43 en astrocitos regulan la reacción inflamatoria secundaria al traumatismo de la médula espinal

Juan Mauricio Garré, MS

**Tesis de Doctorado
Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)
Facultad de Ciencias y Facultad de Medicina, Universidad de la República Oriental del Uruguay**

Dominick Parpura Department of Neuroscience

Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, NY, Bronx, USA

**Tutor: Michael V.L. Bennett, PhD
Co-tutor: Verónica Abudara, PhD**

Tribunal de Tesis: Dr. Angel Caputi, Dr. Alberto Pereda, Dr. José Sotelo

Indice

Capítulo I

I.1. Resumen

I.2. Introducción

I.3. Hipótesis general

I.4. Objetivos

I.5. Materiales y Métodos. ARN de interferencia contra la Px1 y knock out de Cx43. Mediciones de la concentración de ATP. Injuria de médula espinal. Imagenología del ATP en la médula espinal *in vivo*. Electrofisiología: doble fijación de voltaje. Imagenología de calcio en cultivos.

I.6. Referencias

Capítulo II

II.1-Resumen.

II.2- Introducción.

II.3- Resultados. **II.3.1-** El FGF-1 induce liberación de ATP en cultivos de astrocitos espinales y abre hemicanales de panexina 1 (panexones, Px HC) y hemicanales de conexina 43 (conexones, Cx43 HC).

II.3.2- Traumatismo de médula espinal. **II.3.3-** Implicancias en la injuria de la médula espinal.

II.4- Conclusiones.

II.5- Referencias

Capítulo III

III.1- Resumen.

III.2- Introducción.

III.3- Resultados. Propiedades a nivel de canal único de Px1 HC y Cx43 HC en células HeLa y cultivos de astrocitos derivados de la médula espinal.

III.4- Conclusiones.

III.5- Referencia

Capítulo IV

IV.1- Resumen

IV.2- Introducción

IV.3- Resultados. El incremento en la concentración intracelular de calcio inducido por el FGF-1 en astrocitos espinales es mediado por la activación de la PLC, la activación de receptores purinérgicos por el ATP secretado y la apertura de hemicanales

IV.4- Conclusiones

IV.5- Referencias

Capítulo V

V.1. Conclusiones generales

V.2. Agradecimientos

Capítulo I

I.1. Resumen

Como consecuencia del traumatismo de la médula espinal, el ATP se acumula en el medio extracelular. El ATP puede ser liberado desde células gliales con una corta latencia. El FGF-1, que es un activador de astrocitos espinales, y cuya actividad se incrementa también como consecuencia del traumatismo de la médula espinal, induce la liberación de ATP desde astrocitos mediante un proceso que involucra exocitosis vesicular y la apertura de (hemi) canales (HCs) formados de panexina 1 (Px1 HC o panexones o simplemente canales de panexina) y de conexina 43 (Cx43 HC o conexones).

En la primera parte de esta tesis, hemos medido en astrocitos derivados de médula espinal en cultivo, (1) la permeabilidad de la membrana mediante el estudio de la captación de colorantes y la liberación de colorantes permeables a los HCs en tiempo real y (2) la liberación de ATP por bioluminiscencia. Para diferenciar ambas vías de permeabilización (mediadas por PxHCs o Cx HCs), se utilizaron fármacos que inhiben los Cx HCs, y los Px HCs; se emplearon animales con delección del gen que codifica para la Cx43 y se redujo la expresión de Px1 mediante ARN de interferencia (siRNA). El FGF-1 aumentó la permeabilidad de la membrana mediante la activación de los receptores purinérgicos P2X₇ y la apertura de los Px1 HCs y los Cx43 HCs. La toxina botulínica A bloqueó el aumento de la permeabilidad inducido por FGF-1, lo cual sugiere la dependencia de una vía exocitótica. Una vez el ATP es liberado a través de vesículas, el proceso continúa de forma autoregenerativa, a través de la activación de receptores purinérgicos P2X₇R y probable apertura de los Px1 HCs y luego de los Cx43 HCs. In vivo, la activación de receptores de FGF1 (FGFR) medió la liberación de ATP inducida por el traumatismo de médula espinal.

En la segunda parte de esta tesis, empleamos doble fijación de voltaje, en donde una pipeta se utilizó en la configuración de *cell attach* para registrar la actividad del canal único y la segunda en *whole cell* para fijar el voltaje de su membrana. En estas condiciones describimos a nivel del canal único las propiedades electrofisiológicas de los Px1 HCs y los Cx43 HCs en un sistema de expresión que consiste en células HeLa que expresan la Px1 o la Cx43 con proteínas fluorescentes (*yellow* y *cyan fluorescent protein*; YFP y CFP respectivamente) unidas al C-terminal. Luego aplicamos la misma técnica electrofisiológica a los astrocitos

espinales en cultivo. La conductancia del canal único en el parche de células Px1-YFP fue sorpresivamente baja, 25-50 pS, con respecto a los datos publicados anteriormente. En células HeLa Cx43-CFP la conductancia fue mayor, 180-220 pS, un valor similar al publicado previamente, pero estos se registraron a una muy baja incidencia (>10%) en los parches. La fracción de canales abiertos fue mayor para los Px1 HCs que para los Cx43 HCs. Los dos tipos de HCs se registraron en cultivos de astrocitos espinales activados por FGF-1.

Por último, demostramos que la activación de astrocitos por FGF-1 incrementa la actividad de la PLC y la liberación de calcio (Ca^{2+}) desde los sitios de almacenamiento intracelular, lo que induce a su vez la liberación vesicular de ATP y la apertura de Px1 HCs. La acción tónica, en horas, del ATP a nivel extracelular, y la apertura de Px1 HC y Cx43 HC, induce oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$. La modulación en la $[Ca^{2+}]_i$ podría afectar la expresión de genes relevantes en la diferenciación e inducción de distintas subpoblaciones de astrocitos luego del traumatismo de la médula espinal. Los datos de esta tesis en conjunto sugieren que los P2X₇R y los hemicanales podrían estar implicados en patologías de la médula espinal.

I.2. Introducción

Los astrocitos son la población celular más numerosa en el sistema nervioso central (SNC) en los mamíferos. Las uniones en hendidura (GJs) entre los astrocitos comunican el medio intracelular de dos astrocitos adyacentes al permitir la transferencia eléctrica y metabólica entre ellos. Dos hemicanales (HCs o conexones), uno proporcionado por cada una de las células adyacentes, se unen en serie para formar un canal de GJ (ver **(1)**). Durante muchos años se había pensado que los HCs permanecían cerrados en la membrana de no-uni3n, antes de la formaci3n de un canal de GJ. No fue si no hasta los trabajos de Contreras et al., (2002) **(2)** que se demostr3 que los Cx43 HCs pueden ser funcionales en ciertas circunstancias y as3 permitir la comunicaci3n del medio intracelular con el espacio extracelular **(3)**. En vertebrados, los Cx HCs est3n formados por la oligomerizaci3n de seis mon3meros de conexinas (Cxs).

La conexinas (Cxs) son miembros de una familia multig3nica cuya principal funci3n en vertebrados es formar uniones en hendidura. En el SNC, las conexinas son expresadas por diferentes tipos de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos **(4-5)**. Los astrocitos en cultivo expresan la Cx43 y muy bajos niveles de otras conexinas **(6)**. La Cx30 no es detectada en cultivos de astrocitos pero puede ser expresada en subpoblaciones de astrocitos en rodajas **(7)** o en co-cultivos de astrocito-neurona **(8)**.

Las panexinas (Pxs) de los invertebrados (denominadas inexas por algunos investigadores) comparten funciones similares con las conexinas de los vertebrados, aunque no est3n estructuralmente y ni gen3ticamente relacionadas **(9)**. No obstante, hasta el momento no hay evidencias de que las Pxs formen uniones en hendidura en mamíferos, pero lo hacen en invertebrados **(10)**. Una hip3tesis es que una proteina ancestral adquiri3 la capacidad de formar canales entre membranas adyacentes, los cuales hoy conocemos como las uniones en hendidura o uniones gap junction. Dichas proteinas ancestrales fueron posiblemente

inexinas **(11)**, las cuales se denominaron con el nombre de panexinas por Panchin y col., (2002) **(12)** luego que ellos descubrieran los homólogos en el genoma humano. Algunas de estas proteínas, además de su novel función de unión en hendidura, preservaron la capacidad de formar hemicanales en la membrana de no unión (hemicanales formados de panexina o panexones) en invertebrados. No está claro el momento evolutivo en el que aparecen las conexinas, pero son posteriores a las panexinas. Las panexinas pueden haber sido retenidas sólo para formar hemicanales (o 'panexones') **(13)**. La estequiometría de los Px HCs no es clara aunque se acepta que al menos los Px1 HCs constituyen hexámeros **(14)**. Se han identificado tres genes de Pxs en mamíferos, estas proteínas son expresadas en astrocitos y neuronas. Los astrocitos expresan principalmente la Px1 **(15)** la cual presenta 3 variantes y polimorfismo simple **(16)**. El ciclo de vida de las conexinas y de las panexinas es resumido en la **figura 1**.

Los astrocitos también expresan receptores de tipo P2XR y P2YR **(17)**. Los receptores purinérgicos presentan interacción funcional con la Cx43 **(18)** y con la Px1 **(19)**. El principal ligando de los receptores purinérgicos, el ATP, puede ser liberado desde los astrocitos por exocitosis **(20)** o por la apertura de los Cx43 HCs en la membrana plasmática **(21)**. En roedores, el traumatismo de la médula espinal incrementa la liberación de ATP. Mediante la activación de receptores purinérgicos, el ATP causa muerte neuronal y promueve inflamación **(22)** pero por otro lado puede proteger a las neuronas contra la isquemia mediante la acumulación después del acondicionamiento de su metabolito, la adenosina **(23)**.

La liberación de ATP y la neurodegeneración **(22)** son características secundarias a la injuria de la médula espinal. Esta fase luego de la injuria es un proceso complejo que involucra la expresión de diferentes factores, y que tarda de horas a semanas en humanos. Diferentes citoquinas y factores de crecimiento producidos por astrocitos reactivos podrían regular la liberación de ATP. El Factor de crecimiento Fibroblástico (FGF-1), es expresado en la médula espinal y sus niveles aumentan luego del traumatismo de la médula espinal **(24)**. El rol del FGF-1 en esta patología no ha sido elucidado hasta el momento.

En esta tesis demuestro que el FGF-1 aumenta la liberación de ATP y que este media la permeabilidad de membrana en astrocitos espinales en cultivo. El ATP es liberado inicialmente mediante vesículas y activa los P2X₇R, e induce la apertura de los Px1 HCs, y más tarde de los Cx43 HC. Los dos tipos de HCs se diferenciaron electrofisiológicamente a nivel de canal único. La apertura de los Px1 HCs y los Cx43 HCs vuelve regenerativa la liberación de ATP, permitiendo la acumulación extracelular de esta purina y afectando la [Ca²⁺]_i. La apertura de P2X₇R y de HCs medió el proceso inflamatorio luego del traumatismo de la médula espinal.

I.3. Hipótesis

Pensamos que durante una estimulación de los astrocitos en cultivo con FGF-1, el ATP es liberado al medio extracelular. El ATP a nivel extracelular activa los P2X₇R y aumenta la permeabilidad de membrana mediante la apertura de los Px1 HCs y los Cx43 HCs. El proceso de liberación de ATP opera de un modo regenerativo y regula la [Ca²⁺]_i. Los receptores de FGF-1, los P2XR, y los HCs pueden regular la

concentración extracelular de ATP y mediar así la respuesta inflamatoria secundaria a la injuria de la médula espinal in vivo.

I.4. Objetivos

4.1 Demostrar que el ATP liberado durante la estimulación de los astrocitos espinales en cultivo con FGF-1 induce un incremento en la permeabilidad de membrana mediante la activación de receptores purinérgicos y la apertura de los Px1 HCs y los Cx43 HCs.

4.2 Evaluar si el FGF-1 media la liberación de ATP en un modelo de injuria espinal in vivo.

4.3 Caracterizar a nivel de canales únicos, las propiedades electrofisiológicas de los Px1 HCs y de los Cx43 HCs en las células HeLa y astrocitos espinales.

4.4 Determinar si el FGF-1 induce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por la apertura de HCs e investigar posibles mecanismos de acción.

I.5. Métodos

Los materiales y métodos utilizados en esta tesis tales como: cultivo de células, drogas y soluciones, los ensayos para medir la permeabilidad de la membrana al Lucifer yellow (Amarillo Lucifer o LY) y al bromuro de etidio, la transferencia de colorantes a través de *gap junctions* o uniones en hendidura, y las técnicas de detección inmune (Immunofluorescencia; Western Blot) han sido descritos en Garré et al., (2010), y además fueron incluidos y descritos en detalle en la versión en Inglés de esta tesis.

Pequeños ARN de interferencia contra la Px1 (siRNA Px1) y Knockout de Cx43.

Como complemento de los experimentos donde utilizamos la secuencia número (3) **(25): GGUGCUGGAGAACAUAUAAAtt**, en los resultados mostrados en el capítulo IV, hicimos experimentos con tres secuencias diferentes de siRNA (Invitrogen): (stealth™ siRNA duplex oligoribonucleótidos de invitrogen: (1) CCG AUA GCU UCC AGU GCA AGC UCA U; (2) AUG AGC UUG CAC UGG AAG CUA UCG G; (3) GAG CUC AAA UCG UAC AAG UGU CUU A. Los cultivos confluentes (90%) se transfectaron con una solución 1 μ M de siRNA Px1 y 10 μ l/ml de lipofectamina (Invitrogen). Los reactivos de transfección se lavaron luego de 6 – 7 h y las células se incubaron en DMEM (2% FBS) hasta ser utilizadas para los experimentos (luego de 24 - 40 h). Dos **stealth™ siRNA (duplex)** oligoribonucleótidos negativos se usaron como controles negativos (**Invitrogen**). Los ratones knockout (KO) para la Cx43 (originalmente publicados por Reaume et al., 1995) fueron proporcionados por los Drs. D.C. Spray y E. Scemes (Department of Neuroscience, Albert Einstein College of Medicine) y los cultivos de astrocitos se prepararon y se mantuvieron como fue descrito **(18, 26)**.

Modelo de injuria de médula espinal in vivo. Se anestesiaron ratas adultas (50 -100 g) con una inyección intraperitoneal (0.15 ml) de una solución que contiene Quetamina (8 mg/kg peso) y Xylazina (10 mg / kg peso). Se realizó una laminectomía en animales anestesiados a la altura de las vértebras T8 - T12. Para inducir el traumatismo de la médula espinal se empleó un sistema para realizar un impacto (“weight drop devise” del laboratorio de la Dra.Nedergaad, Rochester University, NY, US). Durante este procedimiento la duramadre se mantuvo intacta. El impacto se realizó con un punta metálica de 0.5 mm de diámetro y 3 g peso que se dejó caer desde una altura de 5 -10 mm.

Imagenología del ATP en la médula espinal. El ATP en la superficie de la médula espinal laminectomizada se visualizó en tiempo real mediante bioluminiscencia como se describe en (22) con modificaciones menores. La Luciferasa (0.132 mg/ml) y el luciferín (0.332 mg/ml) se disolvieron en solución salina (0.5 %) y se aplicaron tópicamente en el sitio de la laminectomía. La duramadre se mantuvo intacta para realizar el traumatismo de la médula espinal. La luz emitida como consecuencia de la reacción de la hidrólisis de la luciferina, por la luciferasa, la cual usa como cofactor el ATP, se visualizó sobre la superficie de la médula espinal mediante el empleo de una cámara de nitrógeno líquida (VersArray 1300B, Princeton instrument) (4x4 binning, 30s integration per frame). Esta cámara digital puede detectar ATP a concentraciones tan bajas como 5 nM, y la relación es lineal entre 5 -1000 nM (ver **curva de calibración en la Fig. 4 del capítulo II**)

Electrofisiología: doble fijación de voltaje. Los registros electrofisiológicos se realizaron en células HeLa y en astrocitos cultivados en cubreobjetos (22 mm, número 0) que se transfirieron a una cámara de registro montada sobre la platina de un microscopio invertido equipado con contraste de fase. En las células HeLa un sistema de imagen fluorescente se utilizó para visualizar la Cx43 o la Px1 con el C-terminal unido a las proteínas fluorescentes CFP o YFP.

La cámara de registro se perfundió con solución de Krebs-Ringer (en mM): 140 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 2 CsCl₂, 1 BaCl₂, 5 HEPES, 5 glucosa, 2 piruvato (pH 7.4). Las pipetas de patch (5 -10 MΩ) para los registros en la configuración de “*whole cell* o célula entera” se llenaron con una solución que contiene (en mM): 10 NaAsp, 140 KCl, 0.2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 2 MgATP, 5 HEPES (pH 7.3), 2 EGTA, 5 mM tetraethylammonium-Cl. Las pipetas para los registros en configuración “*cell attach* o parche” (5 -10 MΩ) se llenaron con la misma solución que las de “*whole cell* o célula entera” con la excepción de que el ATP fue omitido.

En los experimentos de doble clampeo de voltaje, una pipeta se utilizó en la configuración de “*cell attach*” para registrar la actividad del canal, y la otra pipeta se utilizó en “*whole cell*” para clampear el voltaje de membrana (V_m) y aplicar el estímulo.

El voltaje y la corriente se registraron y se digitalizaron subsecuentemente mediante un conversor análogo digital MIO-16X A/D (**National Instruments, Austin, TX**) y un programa de adquisición provisto por el Dr.Verselis (Albert Einstein College of Medicine). Los registros se digitalizaron a 5 kHz y se filtraron a 0.2 -1

kHz. La conductancia del canal único (γ) se calculó como el cociente entre las corrientes de canal único obtenidas en “cell attach” y el voltaje de membrana. En los experimentos de doble fijación de voltaje, el cociente $V1/V2$ se calculó para estimar la fuga de corriente a través de la pipeta en configuración “whole cell”. $V1/V2$ se encontró en el rango 0.8 - 0.95.

Imagenología de Calcio. Para medir la concentración intracelular de calcio $[Ca^{2+}]_i$, los astrocitos se cultivaron en placas de cultivo Mateck® 2 - 3 días antes del experimento. Antes de realizar las mediciones, las células se incubaron durante 30 - 40 min a 37°C con 5 μ M fura-2 AM en solución de Tyrode. Luego las células se lavaron e incubaron a temperatura ambiente durante 10 min antes de los registros. Las placas de cultivo se montaron sobre la plataforma de un microscopio invertido (Olympus-IX70) equipado con un sistema de imagen equipado con UltraView ®. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron cada 10 segundos y se evaluó el cociente de luz emitida (520 nm) que se obtuvo a dos longitudes de onda de excitación (340 y 380 nm). En cada experimento se evaluaron y se visualizaron aproximadamente 10 - 15 células; a la señal emitida por las células se le sustrajo el background o fondo. En los casos donde la $[Ca^{2+}]_i$ fluctuó, se consideró como oscilación cuando el cambio de la fluorescencia fue mayor que el doble de la desviación estándar de las fluctuaciones, ΔF , observadas en diferentes células control y tratadas con FGF-1 (ver (27)). La desviación estándar en más de 100 células evaluadas fue de 0.03 y los eventos se contaron como oscilaciones cuando $\Delta F > 0.060$ AU.

Estadísticas. Los datos son presentados como la media \pm S.E.M.; n expresa el número de experimentos independientes. La media para cada grupo se comparó usando un test no paramétrico para variables continuas y no pareadas, el test de Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron significativas para un $p < 0.05$. Las estadísticas se realizaron usando el Graph Pad Prism 4 (2003) software. Los gráficos se prepararon en Sigma Plot (2000).

I.6. Referencias

1. Giaume C and McCarthy KD (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 19:319-325.
2. Contreras JE, et al. (2002) Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:495-500.
3. Bennett MVL, Contreras JE, Bukauskas FF, & Saez JC (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* 26:610-617.
4. Bennett MV and Zukin RS (2004) Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron.* 41:495-511

5. Garré JM, BM (2009) Gap junctions as electrical synapses. *Springer, New York* In: THE STICKY SYNAPSE - CELL ADHESION MOLECULES AND THEIR ROLE IN SYNAPSE FORMATION AND MAINTENANCE (Hortsch & Umemori eds):chapter 21.
6. Dermietzel RG et al., (2000) Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res Brain Res Rev* 32:45-56.
7. Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N (2010) Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci.* 11:87-99.
8. Koulakoff A, Ezen P, Giaume C (2008) Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia.* 56:1299-1311.
9. Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, and Monyer H (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 11:13644-13649.
10. Macvicar BA and Thompson RJ (2010) Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci.* 33:93-102
11. Phelan P et al., (1998) Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins [letter]. *Trends Genet* 14:348-349.
12. Panchin Y et al., (2000) A ubiquitous family of putative gap junction molecules [letter]. *Curr Biol* 10:473-474.
13. Dahl G and Locovei S (2006) Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? *IUBMB Life* 58:409-419.
14. Ambrosi C et al., (2010) Pannexin1 and pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. . *J Biol Chem.* Epub ahead of print. IN PRESS.
15. Huang Y, Grinspan JB, Abrams CK, Scherer SS. (2007) Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional gap junctions. *Glia.* 55:46-56.
16. Ma W, Hui H, Pelegrin P, Surprenant A (2009) Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 328:409-418.
17. James G and Butt A (2002) P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca²⁺ signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur J Pharmacol.* 447:247-260.
18. Scemes E, Saudican SO, Spray DC. (2000) Intercellular communication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation. . *J Neurosci.* 20:1435-1445.
19. Pelegrin P and Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *EMBO J* 25:5071-5082.
20. Pascual O et al., (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310:113-116.
21. Cotrina ML et al., (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15735-15740.
22. Wang X et al., (2004) P2X₇ receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med.* 10:821-827.

23. Lin JH et al., (2008) A central role of connexin 43 in hypoxic preconditioning. *J Neurosci.* 28:681-695.
24. Koshinaga M, Sanon HR, Whitemore SR (1993) Altered acidic and basic fibroblast growth factor expression following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 120:32-48.
25. Locovei S et al., (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett* 581:483-488.
26. Cassina P et al., (2005) Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 93:38-46.
27. Takano T et al., (2007) Two-photon imaging of astrocytic Ca²⁺ signaling and the microvasculature in experimental mice models of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1097:40-50.

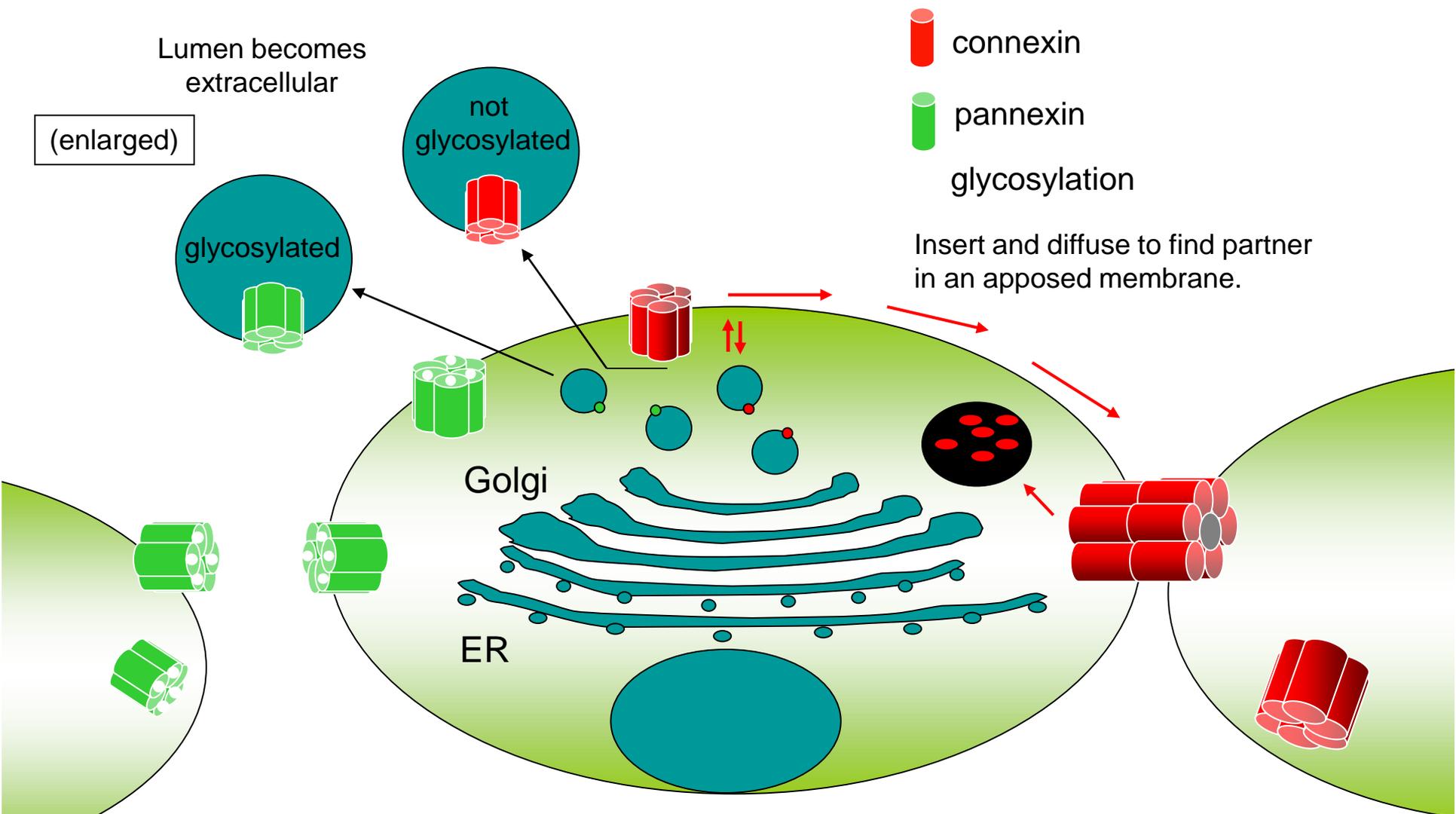


Fig1. El ciclo de vida de las conexinas y panexinas en astrocitos. Los hemicanales formados de conexinas (rojo) y de panexinas (verde) son sintetizados en el retículo endoplásmico y oligomerizan en hexámeros (hemicanales), en el retículo endoplásmico o en los compartimientos post-Golgi. Las vesículas que contienen hemicanales (conexones o panexones) son transportadas a la membrana plasmática. Las conexinas difunden lateralmente y se unen en serie con un hemicanal en la membrana de unión. Cada membrana, entre dos células en contacto, contribuye con un hemicanal para formar el canal intercelular completo. Las panexinas son glicosiladas en los compartimientos del Golgi. La glicosilación puede prevenir la formación de uniones en hendidura. Las panexinas sólo formarían hemicanales en mamíferos.

Capítulo II

El FGF-1 induce la liberación de ATP en cultivos de astrocitos espinales y abre hemicanales formados de panexina 1 y de conexina 43. Implicancias en el traumatismo de la médula espinal

II.1- Resumen

Los astrocitos espinales están acoplados a través de uniones en hendidura y expresan Cx43, panexina 1 y receptores purinérgicos. En este capítulo presentamos evidencias que demuestran que el FGF-1, un activador de astrocitos que es liberado durante el traumatismo de la médula espinal y en el curso de algunas enfermedades neurodegenerativas, induce la secreción vesicular de ATP en cultivos de astrocitos y los vuelve permeables a moléculas fluorescentes relativamente grandes (etidio, Etd⁺, Amarillo Lucifer o Lucifer yellow, LY⁻²) a través de la apertura de los hemicanales formados de panexinas y de conexinas (Px y Cx HCs respectivamente). Demostramos que estas dos vías (mediadas por Px1 y Cx43 HCs) coexisten en astrocitos en condiciones inflamatorias. Dichas vías pudieron diferenciarse farmacológicamente y mediante la reducción en la expresión de Px1 con siRNA y el uso de ratones knockout para la Cx43 (Cx43 KO). La permeabilización de la membrana requirió la secreción de ATP y sus acciones autócrinas. Los cambios en la permeabilidad de la membrana inducidos por el FGF-1 se acompañaron de una reducción progresiva de la comunicación mediada por uniones en hendidura, lo cual además dependió de la secreción de ATP. Demostramos además que el FGF-1 media la liberación de ATP inducida por la injuria de médula espinal *in vivo*.

Estos cambios en la permeabilidad de membrana mediada por los HCs y en las uniones en hendidura podrían regular la reacción inflamatoria que ocurre como respuesta aguda a la injuria de la médula espinal.

II.2- Introducción

Los Cx43 HCs pueden abrirse en la membrana de no-uniión a baja probabilidad de apertura, lo que los vuelve en este sentido funcionales **(1)**. En cultivos de astrocitos espinales, la apertura de los Cx43 HCs proporciona una vía para la captación y liberación de pequeñas moléculas, como por ejemplo colorantes a los cuales los HCs y las uniones en hendidura son permeables tales como bromuro de etidio y Amarillo Lucifer y además pequeñas moléculas orgánicas tales como ATP, NAD⁺, glutamato, glucosa y prostaglandinas **(2)**. Como hemos mencionado, la apertura de Cx43 HCs parece estar involucrada en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo, regulación del volumen, proliferación, propagación de ondas de calcio y aceleración de la muerte celular durante la inhibición del metabolismo celular **(1)**. Los mecanismos fisiológicos que pueden incrementar la permeabilidad de membrana mediada por HCs incluyen un incremento en el número de Cx HCs en la superficie de membrana **(3)**, activación mediante despolarización de la membrana **(1)**, oxidación y reducción de conexinas **(3-4)**, disminución en la concentración extracelular de cationes divalentes **(5)**, incremento en la concentración intracelular de Ca²⁺ **(6)** y un incremento en la concentración extracelular de K⁺ **(7)**. La expresión de Px1 en astrocitos corticales, la cual puede formar HCs funcionales, ha sido descrita recientemente **(8)**. La Px1 además puede formar HCs en diferentes tipos de células, incluyendo oocitos *Xenopus* **(9)** y células HEK293 **(10-11)**. Como los Cx43 HCs, los Px1 HCs median la captación de colorantes y la liberación de ATP inducido por la activación de receptores purinérgicos **(10, 12)**. Los astrocitos espinales además expresan receptores P2X₇ y P2Y **(13)**. Durante la activación sostenida con ATP, los P2X₇R, los cuales son expresados por astrocitos espinales y están involucrados en diversos procesos inflamatorios, pueden activar la permeación de moléculas relativamente grandes, como por ejemplo Etd⁺ **(14)**. En el pasado, esta respuesta se adjudicaba a un aumento en el diámetro del poro, denominado “dilatación” del canal. No obstante, la conductancia de canal único y el potencial de inversión del canal no cambian durante el tratamiento con ATP **(15)**, es así que ha sido propuesto que el mecanismo más probable es la apertura de los Px1 HCs inducido por la activación del P2X₇R **(10)**. Moléculas pro-inflamatorias tales como lipopolisacárido (LPS) y FGF-2 aumentan la liberación de ATP vía HCs en células de glioma C6 que expresan Cx43 **(16)**. Además la actividad de los Cx43 HCs es incrementada mediante dos tratamientos pro-inflamatorios, la privación de oxígeno y glucosa y la aplicación de TNF- α e IL-1 β **(4)**. El rol de los Px1 HCs en astrocitos durante condiciones inflamatorias ha sido pobremente descrito hasta ahora.

El FGF-1, es secretado en respuesta al daño en la médula espinal, y, como para el ATP, sus niveles son incrementados en respuesta a la injuria celular **(17- 22)**.

En este capítulo demostramos que el FGF-1 induce la liberación de ATP desde astrocitos espinales, el cual abre Px1 HCs mediante la activación de P2X₇R. La apertura de Px1 HCs explica el temprano (<2 h) incremento en la permeabilidad de membrana inducido por la acción autócrina/parácrina del ATP. Luego de 7 h de tratamiento ambos hemicanales, Px1 HCs y Cx43 HCs, contribuyeron al incremento de la permeabilidad de la membrana de los astrocitos espinales. Basado en estudios *in vivo*, propongo además que el FGF-1 media la liberación de ATP inducida por la injuria de la médula espinal *in vivo*, lo que es relevante en la progresión de procesos patológicos durante enfermedades neurodegenerativas y traumáticas.

II.3- Resultados

II.3.1- El FGF-1 induce la liberación de ATP en cultivos de astrocitos espinales y abre hemicanales de panexina 1 y hemicanales de conexina 43

Esta sección corresponde a la siguiente publicación, la cual se adjunta: “Garré et al., FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 22659-64”.

Los resultados publicados sugieren que el FGF-1 induce liberación de ATP desde astrocitos espinales, el cual a través de la activación de P2X₇R media la apertura primero, de los Px1 HCs, y luego de los Cx43 HCs. Inferimos que la liberación de ATP es mediada inicialmente por vesículas; luego de la apertura de los Px1 HCs y los Cx43 HCs, la vía vesicular no es más necesaria y el ATP es liberado mayormente mediante HCs. Los datos sugieren además, que el mecanismo de liberación de ATP en astrocitos espinales es regenerativo. Estos mecanismos podrían operar en procesos patológicos como la liberación de ATP que media la neurodegeneración y la respuesta inflamatoria secundaria al traumatismo de médula espinal, lo cual explayaremos a continuación.

II.3.2 - Traumatismo de médula espinal

II.3.3- El FGF-1, los P2XR, y los hemicanales en astrocitos median la respuesta inflamatoria y la degeneración secundaria a la injuria traumática de la médula espinal

La neuro-degeneración secundaria a la injuria traumática de la médula espinal es precedida por la liberación de ATP. La inhibición de los receptores P2X₇ resulta en una protección significativa, implicando estos receptores en la muerte celular (21-22). Los FGFRs se expresan en la médula

espinal dorsal y ventral; los niveles de FGF-1 y sus receptores pueden incrementarse por el traumatismo de este órgano **(18)**.

En experimentos realizados en ratón, nosotros hemos encontrado que el FGF-1 media la liberación de ATP inducida por el traumatismo de la médula espinal **(Fig. 1)**. La injuria se realizó en ratones salvajes (wild type) mediante un impacto agudo (*weight drop impact devise*). El ATP se visualizó en animales control, antes del traumatismo, y a las 0.5 h, 1 h, y 2 h después de realizar la lesión. Antes del traumatismo, la médula espinal dorsal mostró bajos niveles de ATP, 20 ± 5 AU **(Fig. 1 A)** ($n = 7$ animales). El traumatismo de médula espinal elevó el nivel de ATP con un patrón característico. Luego de realizada la lesión, un anillo de ATP rodeó el área de la lesión, la cual como consecuencia de la necrosis no contiene ATP (ver **(21)**). En la zona peri-traumática, el área con niveles detectables de ATP luego de la injuria tiene un diámetro de 0.75 ± 0.3 mm² luego de 0.5 h, de 1.20 ± 0.25 mm² luego de 1 h, y de 1.22 ± 0.1 mm² luego de 2 h post-lesión **(Fig. 1C)**

La intensidad de la luminiscencia es incrementada por la injuria 5 veces luego de 0.5 h y 1 h post-lesión, y 7.5 veces después de 2 h post-lesión **(Fig. 1D)**. El área y la intensidad de la luminiscencia se redujeron mediante la aplicación tópica, sobre la médula lesionada, de PD173074 (4 μ M), un inhibidor de los receptores de FGF-1 [FGFR1, FGFR3, VEGFR 3]. La reducción generada con el PD173074 es mayor a la 1 h y las 2 h que a la 0.5 h luego de realizar la lesión. Como ha sido descrito por Wang et al., (2004) en ratas, la liberación de ATP disminuye luego de 3 - 4 h de efectuar el traumatismo (dato no ilustrado).

El siguiente paso consistió en evaluar si la aplicación no invasiva de FGF-1 (200 ng / ml) a la médula espinal dorsal induce la liberación de ATP. Como la hemoglobina puede absorber parte de la luz emitida por la reacción de bioluminiscencia, el FGF-1 se aplicó sin el anticoagulante heparina, el cual es rutinariamente usado en los experimentos en cultivo. La membranas externas, meninges, no son permeables al FGF-1 (~15 -18 KDa), por lo que la duramadre se eliminó antes de aplicar este tópicamente. Luego del tratamiento con FGF-1, el nivel de ATP alcanzó un valor máximo a los 15 - 45 min y retornó a los niveles control a los ~120 min. Esta liberación de ATP se inhibió por la aplicación tópica del antagonista de los FGFR, el PD173074 (4 μ M), sobre la medula traumatizada **(Fig. 2B)**. La liberación de ATP inducida por la injuria o por el FGF-1 depende de un metabolismo celular viable **(21)**. El área con niveles de ATP detectables desaparecen a los 15 - 30 min luego de sacrificar al animal mediante altas dosis de una solución de ketamina (8 mg / kg) y xylazina (10 mg / kg) (vol. 0.5-0.7 ml) administrada por vía intraperitoneal **(Figs. 1B y 2C)**.

Realizamos una curva de calibración de la señal capturada por la cámara digital (CCD) mezclando diferentes concentraciones de una solución estable estándar de ATP (Invitrogen) con el

ensayo de Luciferasa / Luciferina sobre los cubreobjetos colocados sobre la plataforma de un microscopio donde los animales luego se colocaron para realizar los experimentos (**Fig. 3**). La curva fue lineal en un rango de 1 a 1000 nM. En los animales control, la media de la concentración de ATP detectada sobre la superficie de la médula espinal fue de ~5 nM, y el máximo valor, obtenido luego de 2 h de injuria fue de ~800 nM.

Realizamos diferentes controles para evaluar si el FGF-1 y el PD173074 interfieren con la actividad de la Luciferasa. En dos grupos de animales tratados con PD173074, control y lesionados, la aplicación de 1 μ M de ATP sobre la médula dorsal incrementa la luminescencia a un valor comparable al obtenido en la curva de calibración (**Fig. 4**). Evaluamos además, la actividad hidrolizante de la Luciferasa sobre el ATP en presencia de FGF-1 o PD173074 mediante el uso de un luminómetro (**Fig. 4**). En la médula dorsal la emisión de luz como consecuencia de la oxidación de luciferina en presencia de diferentes concentraciones de ATP no fue cambiada por la adición de 4 μ M de PD173074 ($n = 3$), aunque disminuyó modestamente (15%) por 200 ng / ml FGF-1 ($n = 3$). Estos datos demuestran que la reducción obtenida por PD173074 y el incremento por FGF-1 no se deben a cambios en la actividad de la luciferasa.

II.4- Conclusiones

En este capítulo presenté evidencias acerca de los mecanismos involucrados en la permeabilización de astrocitos inducida por el FGF-1. Esto se debió a la liberación de ATP y activación de P2X₇R que en 2 h conduce a la apertura de los Px1 HCs y luego a las ~7 h, a la apertura de los Cx43 HCs. Además, el ATP liberado en respuesta a la estimulación con FGF-1 redujo el acoplamiento intercelular mediado por uniones en hendidura.

Estos datos tienen relevancia *in vivo*, ya que el ATP extracelular podría inducir la liberación de más ATP desde la microglia y los astrocitos y potenciar así la respuesta inflamatoria actuando como una señal autócrina y parácrina de daño. Las microglías activadas liberan otras moléculas pro-inflamatorias incluyendo las citoquinas TNF- α e IL-1 β las cuales podrían activar a los astrocitos junto al FGF-1. Los hemicanales en astrocitos podrían liberar moléculas bioactivas y reducir la captación de K⁺ y glutamato extracelulares, lo que posiblemente provocaría excitotoxicidad. El descenso en el acoplamiento intercelular debería disminuir la capacidad buffer de la red de astrocitos. En conjunto estos cambios podrían incrementar la vulnerabilidad de las neuronas que subyacen sobre el dominio de los astrocitos. El uso de dos antagonistas de los P2X₇R, oATP y Brilliant blue G, promueve

protección en modelos de roedor. El BBG tiene un potencial rol terapéutico en un modelo de injuria de médula espinal en rata **(21-22)**.

Según nuestras predicciones, nuestros datos sugieren que luego de la injuria de la médula espinal, el FGF-1 media la liberación de ATP con un curso temporal menor a 2 h. El estudio sugiere que los mecanismos de liberación de ATP en cultivo podrían tener relevancia *in vivo*. El tratamiento de los cultivos con FGF-1/heparina causó la secreción de ATP e incrementó la permeabilidad de membrana mediante la apertura de los Px1 HCs medido a las 2 h aunque comenzó en minutos. A las 7 h de tratamiento, los Cx43 HCs contribuyeron en el incremento de la permeabilidad. La neurotoxina botulínica A (BoTx A), la cual puede bloquear la liberación vesicular de ATP, previene la permeabilización cuando es administrada previo a la aplicación de FGF-1, aunque tiene poco efecto cuando es administrada durante el tratamiento con FGF-1 o 1 h más tarde. El bloqueo de la permeabilización inducida por FGF-1 ejercido por la apirasa, una ATPasa soluble, o los receptores purinérgicos y los inhibidores de Px1 HC y Cx HC, sugiere que aunque el ATP es inicialmente liberado mediante vesículas, su continua liberación es mediada por la acción sobre receptores purinérgicos y la apertura de hemicanales.

De esta manera el FGFR, los P2XR y los HCs podrían estar involucrados en el proceso de neurodegeneración en la médula espinal. En este momento estamos investigando si el PD173074 es neuroprotector, como lo hicieron los antagonistas de los P2X7R en la médula espinal **(22)**. Datos previos sugieren que el bloqueo de las uniones en hendidura con ácido glicirretínico (GA) protege motoneuronas de la muerte **(23)**. En estos experimentos fue difícil diferenciar el rol de las uniones en hendidura de los hemicanales.

En conclusión, el ATP liberado por los astrocitos activados con FGF-1 contribuye a iniciar y conducir la respuesta inflamatoria luego de la injuria, y ofrece un posible mecanismo que impacta sobre la supervivencia neuronal. El análisis de la liberación de ATP en cultivo sugiere que una estimulación temprana en la liberación vesicular de ATP por FGF-1 promueve la apertura de hemicanales lo que media la continua liberación de esta purina. Este último punto será discutido en el capítulo IV.

En el próximo capítulo describiremos las propiedades de canal único de los Px1 HCs y Cx43 HCs para obtener evidencia a nivel de canal único de las posibles vías de liberación de ATP en astrocitos espinales.

II.5- Referencias

1. Bennett MVL, Contreras JE, Bukauskas FF, Sáez JC. (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* 26: 610-617.
2. Orellana JA et al., (2009) Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. (Translated from eng) *Antioxid Redox Signal* 11:369-399 .
3. Retamal MA et al., (2006) S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4475-4480.
4. Retamal MA, et al., (2007) Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J Neurosci* 27:13781-92 .
5. Contreras JE, Saez JC, Bukauskas FF, & Bennett MVL (2003) Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100:11388-11393.
6. Pearson RA et al., (2005) ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor. *Neuron* 46:731-744.
7. Srinivas M, Calderon DP, Kronengold J, Verselis VK. (2006) Regulation of connexin hemichannels by monovalent cations. *J Gen Physiol.* 127:67-75.
8. Huang Y, Grinspan JB, Abrams CK, Scherer SS (2007) Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional gap junctions. *Glia.* 55:46-56.
9. Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, & Monyer H (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 11:13644-13649.
10. Pelegrin P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071-5082.
11. Ma W HH, Pelegrin P, Surprenant A. (2009) Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 328:409-418.
12. Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett* 581:483-488.
13. Suadicani SO et al., (2006) P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci.* 26:1378-1385.
14. DiVirgilio F (1995) The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* 16:524-528.

15. Riedel T, Schmalzing G, Markwardt F (2007) Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X7 receptor-operated single-channel currents. *Biophys J* 93:846-858.
16. De Vuyst E et al., (2007) Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Mol Biol Cell*. 18:34-46.
17. Shin JT et al., (1996) Serum-starvation induces the extracellular appearance of FGF-1. *Biochim Biophys Acta* 1312:27-38.
18. Koshinaga M, Sanon HR, Whittemore SR (1993) Altered acidic and basic fibroblast growth factor expression following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 120:32-48.
19. Tourbah A et al., (1992) Endogenous aFGF expression and cellular changes after a demyelinating lesion in the spinal cord of adult normal mice: immunohistochemical study. *J Neurosci Res*. 33:47-59.
20. Cassina P et al., (2005) Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 93: 38-46.
21. Wang X et al., (2004) P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med*. 10:821-827.
22. Peng W et al., (2009) Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12489-12493.
23. Garré JM, (2005) Connexins hemichannels: regulation by FGF-1 and ATP. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, PEDECIBA-UDELAR.

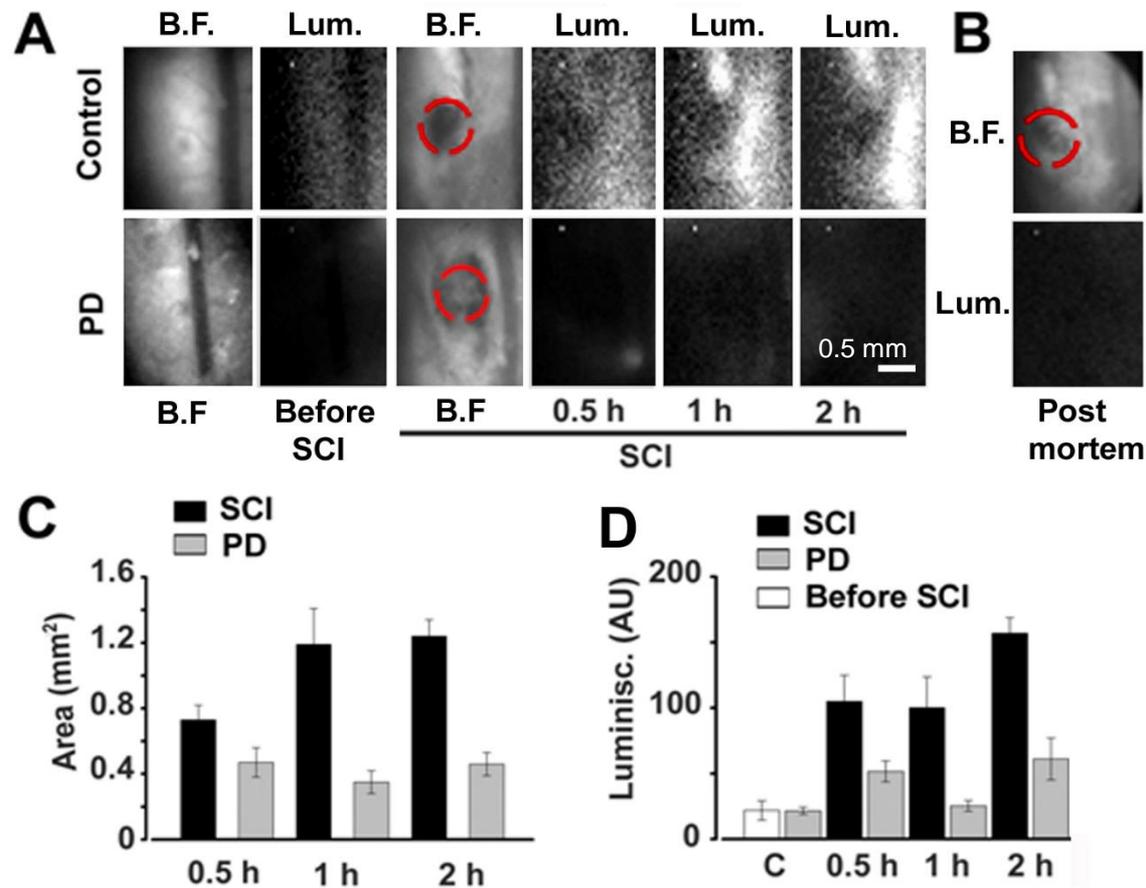


Fig. 1. La activación de los FGFR induce la liberación de ATP luego del traumatismo de la médula espinal en ratones (SCI). (A) Imágen de contraste de fase (B.F) y detección de ATP por bioluminescencia sobre las médulas espinales de ratón expuestas mediante laminectomía antes y luego del traumatismo, en animales control (paneles superiores) o tratados con 4 μ M de PD 173074 (un antagonista de los FGFR) (paneles inferiores). (B) Contraste de fase (panel superior) y luminiscencia (panel inferior) luego de sacrificar el animal con una dosis letal de ketamina. Los círculos rojos indican el sitio del traumatismo. El ensayo Luceferase/luciferin, y el PD se aplicaron tópicamente. (C, D) Cuantificación del área de liberación de ATP en la zona periférica a la lesión (C) e intensidad de la luminiscencia (D).

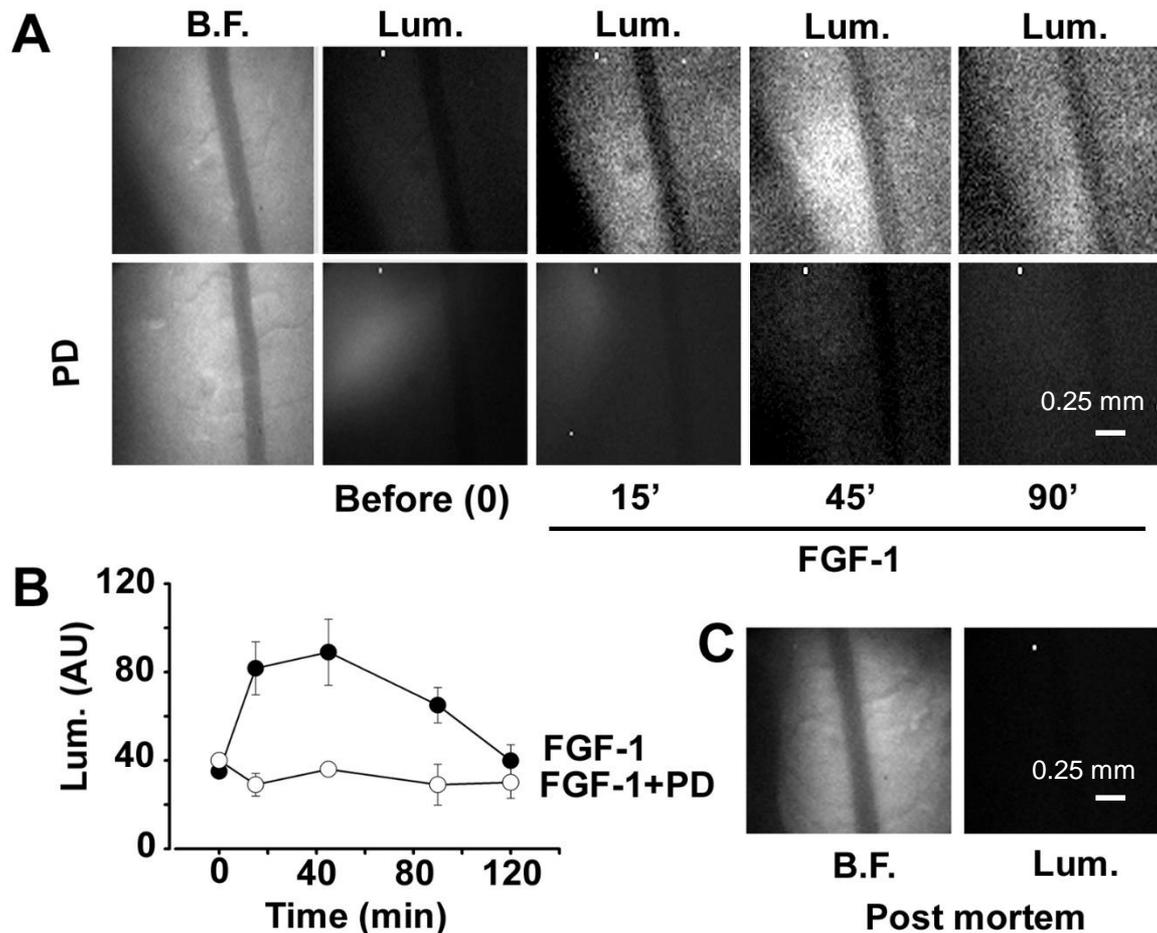


Fig. 2. **El FGF-1 induce liberación de ATP en la médula espinal *in vivo*.** (A) Imágenes de contraste de fase (BF) y detección de ATP mediante bioluminiscencia en médulas espinales laminectomizadas de ratón, antes y después de tratar los animales con 200 ng/ml FGF-1 solo o en presencia de 4 μ M PD 173074 (PD) (paneles inferiores). La duramadre se removió para realizar estos experimentos. El ensayo Luciferin-Luciferasa, el PD, y el FGF-1 se aplicaron tópicamente sobre la superficie de la médula espinal. (B) Cuantificación de la intensidad de luminiscencia. (C) Contraste de fase (panel de la izquierda) y luminiscencia (panel de la derecha) luego de sacrificar el animal con una dosis letal de ketamina.

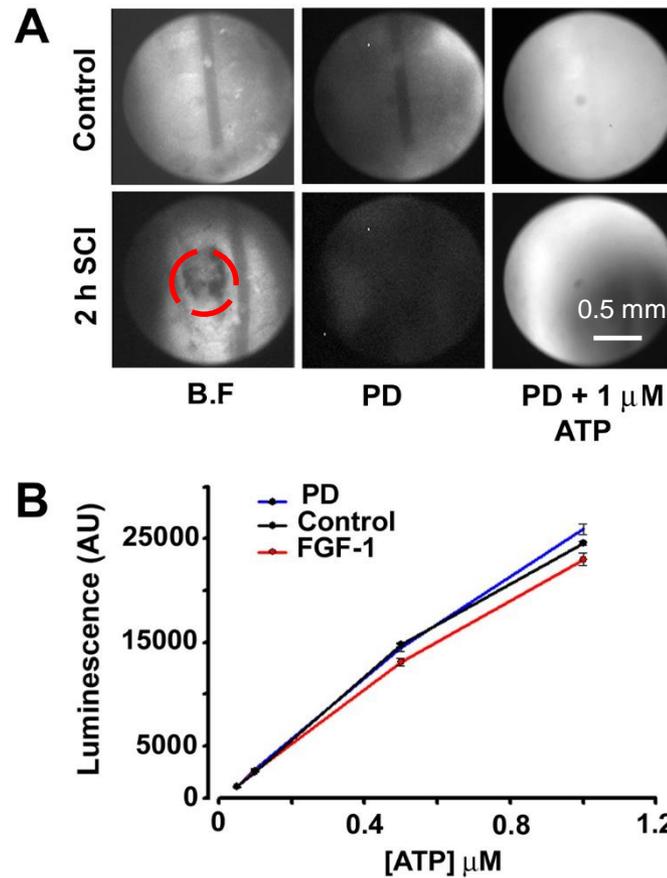


Fig. 3. **La actividad de la Luceferasa no es modificada por el PD y el FGF-1.** (A) Imágenes de contraste de fase y luminiscencia en un animal control o 2 h luego de realizar un traumatismo de médula espinal (SCI) tratado con 4 μ M de PD solo o en presencia de μ M ATP sobre las médulas espinales laminectomizadas. (B) Curvas de luminiscencia en función de la concentración de ATP obtenidas mediante el uso de un luminómetro. La emisión de luz no se modificó por el PD en presencia de ATP. El FGF-1 redujo modestamente la emisión de luz (15%)

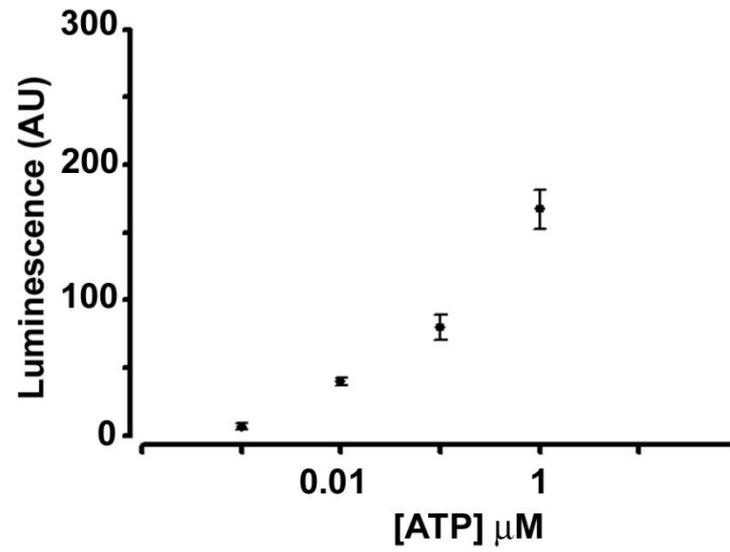


Fig.4. Curva de calibración de la señal de ATP obtenida con una cámara de nitrógeno líquida.

Capítulo III

Los hemicanales formados de Px1 y Cx43 pueden ser diferenciados por sus propiedades de canal único en células HeLa y en cultivos de astrocitos espinales

III.1- Resumen

En este capítulo describimos las propiedades electrofisiológicas a nivel de canal único de los Px1 HCs en células HeLa y cultivos de astrocitos espinales y las comparamos con los datos previos acerca de los Cx43 HCs.

En registros de *whole cell* o célula entera, las corrientes macroscópicas en HeLa Px1-YFP fueron 10 veces mayores que en las células parentales. Como no pudimos obtener registros con resolución de canal único en la configuración de *whole cell*, decidimos utilizar la técnica de doble fijación de voltaje, con una pipeta en configuración *cell attach* (registros en parches de membrana) para registrar la actividad del canal y la otra en *whole cell* para fijar el voltaje de la membrana (V_m) y aplicar el estímulo. La conductancia de canal único (γ_i) en los parches (*cell attach*) fue de 25-50 pS. Una corriente entrante de gran magnitud se activó por la despolarización a través de la pipeta en *whole cell*. En las células HeLa Px1-YFP la incidencia de este canal en los parches (*cell attach*) fue alta (~80%) con respecto a las células parentales (~20%). Este canal no se registró luego de la transfección de las células HeLa con siRNA contra la Px1. Los inhibidores de los Px1 HCs, probenecid y carbenoxolona, redujeron la apertura del canal. Estos datos sugieren que la Px1 subyace estas corrientes.

La apertura de los Px1 HCs y los Cx43 HCs es infrecuente en astrocitos espinales control, pero están presentes en estas células luego del tratamiento durante 7 h con FGF-1. Por lo tanto, los Cx43 HCs y los Px1 HCs son funcionales en células HeLa y astrocitos espinales. Ambos HCs tienen diferentes propiedades de canal único, en términos de su conductancia unitaria y probabilidad de apertura.

III.2- Introducción

Las Panexinas (Px) y las Conexinas (Cx) son miembros de dos familias diferentes de genes que pueden formar uniones en hendidura o *gap junctions*. Las Pxs y las Cxs oligomerizan en hexámeros en el retículo endoplásmico o en Golgi para luego insertarse como hemicanal en la membrana plasmática. Una vez en la membrana plasmática, los HCs de dos células adyacentes difunden lateralmente para unirse en serie y formar un canal intercelular o *de unión en hendidura*. Como mencionamos en el capítulo I, las conexinas forman uniones en hendidura en mamíferos y las panexinas lo hacen en invertebrados **(1-2)**. Los hemicanales formados de Px1 y Cx43 (Px1, Cx43 HCs) pueden abrirse en la membrana de no-uni6n en células de mamífero y mediar la se6alizacion autócrina y parácrina en astrocitos **(1, 3) (ver capítulo II)**.

Los astrocitos depuran el exceso de neurotransmisores en la hendidura sináptica y además pueden liberar neurotransmisores. En el caso del ATP, los mecanismos de liberación no están del todo claros, pero este puede ser liberado al menos en parte a través de HCs (ver capítulo II). El ATP cuando se acumula en el espacio sináptico extracelular puede facilitar o deprimir la actividad sináptica **(4)**. Desde un punto de vista patológico, el ATP se acumula en forma aguda como consecuencia del traumatismo de la médula espinal (ver capítulo II) y produce neurodegeneración **(5)** o durante el pre-condicionamiento isquémico, la adenosina producida como producto catabólico del ATP liberado a través de Cx43 HCs ejerce protección sobre las neuronas corticales **(6)**.

Muchos de los trabajos que describen las propiedades funcionales de los HCs fueron realizados en astrocitos en cultivo. En la mayoría de ellos, la permeabilidad de la membrana se evaluó mediante la medición de la captación o liberación de colorantes permeables a los HCs. La distinción entre la vía mediada por Pxs o Cxs en astrocitos se realizó por primera vez en nuestro trabajo **(capítulo II)** utilizando un criterio farmacológico, de manipulación genética de la Cx43, y la reducción de la expresión de Px1 mediante la transfección de siRNA **(ver capítulo II)**.

No obstante, estas vías no se han descrito claramente a nivel de canal único. Los Cx43 HCs tienen muy baja probabilidad de apertura **(7)**. En las células HeLa, la conductancia de los Cx43 HCs es ~220 pS con transiciones a un sub-estado de ~75 pS. Los Cx43 HCs tienen dos tipos de *gating*. Las transiciones entre los estados completamente abierto y cerrado son lentas y requieren décimas de segundos y pueden ser seguidas de múltiples subestados. Las transiciones al sub-estado son rápidas (<2 ms) **(7)**. La conductancia de canal único de los Px1 HCs en oocitos es 450 pS y se ha propuesto la existencia de diversos subestados **(8-9)**. Los Cx43 HCs se han registrado recientemente en astrocitos corticales en condiciones isquémicas. Estos canales no están presentes en astrocitos corticales KOs

para la Cx43 (6). La apertura de canales con propiedades similares a las descritas para los Px1 HCs no ha sido descrita en astrocitos hasta el momento.

En este capítulo describimos un abordaje técnico novedoso para evaluar las propiedades electrofisiológicas de los HCs en células HeLa y cultivos de astrocitos espinales. Mediante el uso de la doble fijación de voltaje demostramos que la conductancia de canal único de los Px1 HCs en los parches fue inesperadamente baja (25-50 pS) en relación a los datos previamente reportados por otros autores. Las aperturas de los Px1 HCs y los Cx43 HCs (200 pS) fueron infrecuentes en astrocitos espinales control. Los Px1 HCs y los Cx43 HCs se encontraron en astrocitos activados por un tratamiento de 7 h con FGF-1. Los datos demuestran que ambos HCs se pueden diferenciar a nivel de canal único, en términos de conductancia y probabilidad de apertura.

III.3- Resultados

Registros de conductancia unitaria de los Px1 HCs en células HeLa

La figura 1 muestra las corrientes obtenidas en células HeLa parental y aquellas que expresan la Px1 con el c-terminal unido al de la YFP (Px1-YFP). Luego de la estimulación con 2 rampas consecutivas de ± 100 mV y 2 s de duración, las corrientes en configuración *whole cell* fueron 10 veces mayores en HeLa Px1-YFP que en las parental (Fig. 1, A - C). Mediante este método no pudimos obtener resolución de canal único para estas corrientes. Decidimos entonces utilizar el método de doble fijación de voltaje, en donde una pipeta se dispuso en la configuración de *cell attach* para registrar la actividad de canal único, y la otra se utilizó en *whole cell* para fijar el voltaje de membrana y aplicar el estímulo. En células parentales, la estimulación con una rampa a través de la pipeta en *whole cell*, indujo corrientes de canal único a V_m negativo, de una conductancia de 25-50 pS, solo en una baja proporción de registros (< 20%). Estas corrientes se registraron con la pipeta en configuración de *cell attach* (Fig. 2A). En contraste, registramos eventos con esta conductancia unitaria, en un alto porcentaje de los registros en las células HeLa Px1-YFP (80%) (Fig. 2B). Cuando la membrana en las células HeLa Px1 es despolarizada, existe un considerable incremento en la corriente entrante (~ 4), aunque a V_m positivo no existió resolución de canal único (Fig. 2B).

Una actividad similar se obtuvo en experimentos en donde la pipeta bajo la configuración en *cell attach* tenía una alta concentración de calcio (2 mM). Esto descarta que las Cxs expresadas endógenamente en las células HeLa hayan mediado estas corrientes (Fig. 2C).

Cuando el V_m se mantuvo constante a +60 mV durante un pulso de ~ 10 s, las corrientes basales se incrementaron por la despolarización de la membrana, 10 - 15 pA, lo que corresponde a una

conductancia de membrana en el parche de 160 - 250 pS. En estas condiciones de registro fue posible visualizar eventos de canal único de 25 - 40 pS (**Fig 3 B, C**).

Los Px1 HCs median la corriente de canal único en células HeLa-YFP: validación farmacológica y mediante el uso de siRNA contra la Px1

Como las conductancias de canal único registradas en células HeLa Px1-YFP fueron menores que lo esperado (ver **(8)**), determinamos si los Px1 HCs median estas corrientes. Para esto, la expresión de Px1 se redujo transfectando las células HeLa con una secuencia de siRNA contra la Px1 humana (siRNA Px1) (**Fig 4A**). En células HeLa transfectadas con una secuencia de siRNA negativa (*silencer sequence, Invitrogen*), la estimulación con una rampa de 2 s y \pm 100 mV produjo la apertura de (hemi) canales con las mismas propiedades de las ilustradas en la Fig. 2. Esta actividad estuvo ausente en células transfectadas con siRNA Px1 (**Fig. 4C**).

Corroboramos estos datos mediante un criterio farmacológico, en donde aplicamos a la pipeta en configuración de *cell attach*, 0.1 mM CBX o 1 mM probenecid, dos antagonistas de los Px1 HCs. En estas condiciones, las células estimuladas con una rampa como la mencionada anteriormente (**Fig. 5 A - C**) no mostraron apertura de canales (n = 10). Estos datos demuestran que estas corrientes son mediadas por los Px1 HCs.

Las propiedades electrofisiológicas de los Cx43 HCs en células HeLa que expresan la Cx43 con el C-terminal unido a proteínas fluorescentes tales como eGFP han sido descritas por Contreras y col., (2003) (**7**).

Hemicanales formados de Px1 y Cx43 en astrocitos espinales

Registros electrofisiológicos como aquellos obtenidos en células HeLa (**7**) no han sido detectados en astrocitos en condiciones fisiológicas, probablemente porque la densidad de canales o la probabilidad de apertura de los Cx43 HCs es baja. No obstante, la actividad unitaria de los Cx43 HCs se ha demostrado en astrocitos durante condiciones inflamatorias y de isquemia (**6**). Canales de gran conductancia (200 - 400 pS), presuntivos de los Px1 HCs, se han registrado en neuronas sujetas a isquemia en rodajas de hipocampo (**10**). La actividad unitaria de los Px1 HCs no ha sido demostrada en astrocitos hasta el momento.

Hemicanales con propiedades similares a las que describimos anteriormente en células HeLa Px1-YFP (**Figs. 1 - 4**) se registraron en ocasiones en astrocitos espinales control (**Figs. 6 y 7**). Los Cx43 HCs no se registraron en astrocitos control. Como mencionamos en el capítulo II, luego de 7 h de

tratamiento de los astrocitos con FGF-1, la permeabilidad de membrana es incrementada, lo que coincidió con un aumento en la actividad de canal único de los Cx43 HCs y Px1 HCs (**Figs. 6 y 7**). Hemicanales con una conductancia unitaria de 200 pS se observaron en los astrocitos tratados con FGF-1 durante 7 h pero estos estuvieron ausentes en astrocitos obtenidos de la médula espinal de ratones knock out para la Cx43 (Cx43 KO) control o tratados con FGF-1 (**Fig. 7**).

Los Px1 HCs se registraron además en parches obtenidos de astrocitos Cx43 KO control o tratados con 7 h FGF-1 (**Figs. 7 y 8**). Estos canales se bloquearon mediante la aplicación de 100 μ M CBX en la solución de registro (**Fig. 8**). Los astrocitos en cultivo expresan principalmente Cx43 y además Cx26 (Cx30 es expresada en el tejido adulto). Con un anticuerpo no comercial, el cual fue previamente caracterizado hemos reportamos previamente que los astrocitos espinales en cultivo expresan Cx45 (**11**). No obstante, no hemos detectado inmunorreactividad en la misma población de células cuando utilizamos un anticuerpo comercial contra el c-terminal de la Cx45 (Invitrogen). Una marca de tipo puntiforme (*punctas*) y otra difusa se detecto en células HeLa transfectadas con cDNA para la Cx45 (control positivo) y muy bajo nivel de marca difusa se encontró en células parentales (**Fig. 9**). Por lo tanto, concluimos que la Cx45 no es expresada en cultivos de astrocitos espinales. La corrección acerca de este dato previo es relevante, ya que descarta que los Cx45 HCs, cuya conductancia es ~50 pS (**12**) puedan haber mediado estas corrientes unitarias.

III.4- Conclusiones

En este capítulo demostramos que los hemicanales formados de Px1 son funcionales y pueden ser diferenciados a nivel de canal único de los Cx43 HCs en astrocitos obtenidos de cultivos primarios de la médula espinal de rata o ratón.

Desde el punto de vista electrofisiológico, los Px1 HCs difieren de los Cx43 HCs en varios aspectos. En condiciones de registro simétricas y no simétricas la conductancia de canal único de los Px1 HCs en parches obtenidos en la configuración *cell attach* fue 25 - 50 pS (V_m se controló por una segunda pipeta en la configuración *whole cell*). Utilizando solo una pipeta en la configuración *whole cell*, Contreras et al., (2003) describieron las propiedades de canal único de los Cx43 HCs; las corrientes fueron lineales con respecto al V_m y de un valor de 220 pS (**7**) (no hemos registrado estos canales en parches en la configuración *cell attach* en células HeLa Cx43-CFP). Por otro lado, la actividad de los Px1 HCs en los parches, i.e., el cociente entre el tiempo medio de apertura de los Px1 HCs dividido el tiempo de registro, es claramente mayor que en los Cx43 HCs. Debido a la carencia de datos que permitan establecer el número de canales por parche, no podemos comparar la probabilidad de apertura de ambos HCs. No obstante nosotros pensamos que la fracción de Px1 HCs abiertos es

considerablemente incrementada a V_m positivo (x4), aunque este punto es difícil de cuantificar porque la resolución de canal único se hace pobre cuando la célula es despolarizada. Dado que los Cx43 HCs no se detectaron en los parches en células HeLa Cx43-CFP (o eGFP), la P_o de los Cx43 HCs debería ser más baja que la de los Px1 HCs (ver **(11)**, por una estimación de la fracción de canales abiertos en una placa de *gap junction*).

Se ha descrito que la conductancia de los Px1 HCs en oocitos es 450 pS y varios subestados pueden estar presentes **(8-9)**. Mediante el empleo de registros *whole cell* no hemos encontrado eventos de canal único en células HeLa Px1-YFP, aunque las corrientes macroscópicas fueron 10 veces mayores que en las células parentales. Cuando una de las pipetas estuvo en *cell attach* y la otra en *whole cell* para fijar el V_m no detectamos canales de 400 - 500 pS en las células HeLa Px1-YFP o en astrocitos espinales. Estas últimas expresan Px1 y captan colorantes, y la transfección de siRNA contra la Px1 además reduce la captación de colorante y la entrada de calcio en astrocitos (ver capítulos II y IV). La posibilidad de que la fusión de la YFP con el C-terminal de la Px1 afecte la conductancia de canal único es improbable, porque hemos registrado canales similares en cultivos primarios de astrocitos que expresan la Px1 salvaje. Estas corrientes estuvieron ausentes luego de reducir la expresión de Px1 mediante la transfección de células HeLa Px1-YFP con siRNA. La sensibilidad de estos canales a probenecid o carbenoxolona sugiere además, que estas corrientes de 25 - 50 pS fueron mediadas por los Px1 HCs. Una actividad de similar rango de conductancia (40 - 60 pS) ha sido descrita en células HeLa que expresan la Cx45 **(12)**, aunque como mostramos en la Fig. 11 nosotros pensamos que los astrocitos espinales no expresan Cx45 y en nuestros registros en células HeLa Px1-YFP los HCs no se cierran mediante hiperpolarización de la membrana, y las corrientes no son sensibles a la concentración de calcio externa, por lo que parece improbable que hayan sido mediadas por los Cx45 HCs. Una posibilidad es que estos (hemi) canales correspondan a un sub-estado del principal estado de los Px1 HCs (450 pS), el cual ha sido reportado previamente. Otra explicación alternativa es que la conductancia de canal único de los Px1 HCs sea regulada por los P2X₇R, los cuales son endógenamente expresados en cultivos de astrocitos espinales y células HeLa (dato no mostrado). Interacciones físicas de baja afinidad podrían participar del incremento en la permeabilidad de membrana a colorantes luego de la estimulación con ATP. Estas interacciones ocurren entre el dominio SH3 rico en prolina del C-terminal de los P2X₇R y las quinasas de tirosina src y el C-terminal de la Px1 **(13)**. La transfección con el ADNc para P2X₇R en células HEK que expresan la Px1 redujo considerablemente la captación basal de Yo-Pro mediada por Px1 (ver Fig 3. en **(14)**). Esta regulación de la permeabilidad de membrana podría involucrar la interacción a través del C-terminal de la Px1 y los P2X₇R **(13, 15)** y no debería depender de la apertura del P2X₇R dado que el

bloqueo de este canal reduce la permeabilidad a los colorantes mediada por los Px1 HCs solo luego de la estimulación con ATP (**ver capítulo II**). Eliminar el gen de los P2X₇R o usar quimeras del receptor sin el C- terminal podrían clarificar este punto en estudios futuros.

Mecanismos que incrementan la probabilidad de apertura (P_o) de los HCs en astrocitos espinales. La permeabilidad de membrana mediada por la apertura de Px1 HCs y Cx43 HCs aumenta durante condiciones inflamatorias (por Cx43 HCs ver (16), por Px1 HCs ver (1)) y de estimulación con FGF-1 (**capítulo II**). Hemos registrado los HCs en astrocitos espinales sujetos a estimulación inflamatoria con FGF-1. Los mecanismos que aumentan la P_o de los Px1 HCs dependen de cambios en la [Ca⁺²]_i. El FGF-1 incrementa la [Ca⁺²]_i en astrocitos espinales, lo que se asocia con una activación de corta latencia de la PLC, la cual promueve la liberación de calcio de los almacenes intracelulares y probablemente liberación vesicular de ATP. Este mecanismo será discutido en detalle en el capítulo IV.

La actividad de los Cx43 HCs es incrementada por mecanismos alternativos a los Px1 HCs, aunque tienen en común que dependen mayormente del ATP liberado (**ver capítulo II**). Una posibilidad consiste en que un incremento en la [Ca⁺²]_i local podría activar la CaMk y mediar el aumento en la P_o. La activación de la CaMk incrementa la P_o de los canales de *uniones en hendidura*, como se ha propuesto para las sinapsis eléctricas mixtas en las *club endings* de las célula Mauthner (**17**) o de los Cx43 HCs en células HeLa y de glioma (**18**)(**19**).

Otra posibilidad es que los cambios en el metabolismo de los astrocitos como consecuencia de la activación a largo plazo con diferentes toxinas, citoquinas tales como FGF-1, y mediadores inflamatorios como el ATP, afectaran el metabolismo oxidativo de la glucosa inhibiendo la respiración mitocondrial (**20-21**). El compromiso de la función mitocondrial y el estrés del retículo endoplásmico en condiciones inflamatorias, como las inducidas por FGF-1, inducen la movilización de calcio desde los sitios de almacenamiento intracelular hacia el citosol, lo cual activa quinasas intracelulares asociadas al estrés, tales como las quinasas activadas por mitógenos (p38 MAPk) (**22-23**). La activación de las p38 MAPk incrementan la P_o de los Cx43 HCs en astrocitos corticales o células de glioma (**24-25**) y podría ejercer los mismos efectos en astrocitos espinales.

III.5- Referencias

1. Macvicar BA and Thompson RJ (2010) Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci* 33:93-102.
2. Kelmanson IV et al., (2002) Altering electrical connections in the nervous system of the pteropod mollusc *Clione limacina* by neuronal injections of gap junction mRNA. *Eur. J. Neurosci.* 16:2475-2476.
3. Contreras JE et al., (2002) Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:495-500.
4. Pascual O et al., (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310:113-116.
5. Wang X et al., (2004) P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med.* 10:821-827.
6. Lin JH et al ., (2008) A central role of connexin 43 in hypoxic preconditioning. *J Neurosci.* 28:681-695.
7. Contreras JE, Saez JC, Bukauskas FF, & Bennett MVL (2003) Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100:11388-11393.
8. Bao L, Locovei S, & Dahl G (2004) Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.* 572:65-68.
9. Qiu F, Dahl G (2009) A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:250-255.
10. Thompson RJ et al., (2006) Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science* 312:924-927.
11. Garré JM, Bennett MVL (2009) Gap junctions as electrical synapses. *Springer, New York* In: THE STICKY SYNAPSE - CELL ADHESION MOLECULES AND THEIR ROLE IN SYNAPSE FORMATION AND MAINTENANCE (Hortsch & Umemori eds):chapter 21.
12. Valiunas V (2002) Biophysical properties of connexin-45 gap junction hemichannels studied in vertebrate cells. *J. Gen. Physiol.* 119:147-164.
13. Iglesias R et al., (2008) P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol* 295:752-760.
14. Pelegrin P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071-5082.
15. North R (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 82:1013-1067.

16. Orellana JA et al., (2009) Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 11:369-399.
17. Pereda AE et al. (1998) Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II mediates simultaneous enhancement of gap-junctional conductance and glutamatergic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22):13272-13277.
18. Schalper KA et al. (2008) Connexin hemichannel composition determines the FGF-1-induced membrane permeability and free [Ca²⁺]_i responses. *Mol Biol Cell* 19:3501-3513.
19. De Vuyst E et al., (2009) Ca(2+) regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium*. 46:176-187.
20. Bolaños JP and Almeida A (2006) Modulation of astroglial energy metabolism by nitric oxide. *Antioxid Redox Signal*. 8:955-965.
21. Gavillet M, Allaman I, Magistretti PJ (2008) Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia* 56:975-989.
22. Kozawa O, Tokuda H, Matsuno H, Uematsu T (1999) Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in basic fibroblast growth factor-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *J Cell Biochem*. 74:479-485.
23. Tokuda H, Hirade K, Wang X, Oiso Y, Kozawa O. (2003) Involvement of SAPK/JNK in basic fibroblast growth factor-induced vascular endothelial growth factor release in osteoblasts. *J Endocrinol*. 177:101-107.
24. Retamal MA et al., (2007) Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J Neurosci*. 27:13781-92 .
25. De Vuyst E, et al., (2009) Ca(2+) regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium*. 46:176-187.

Fig. 1

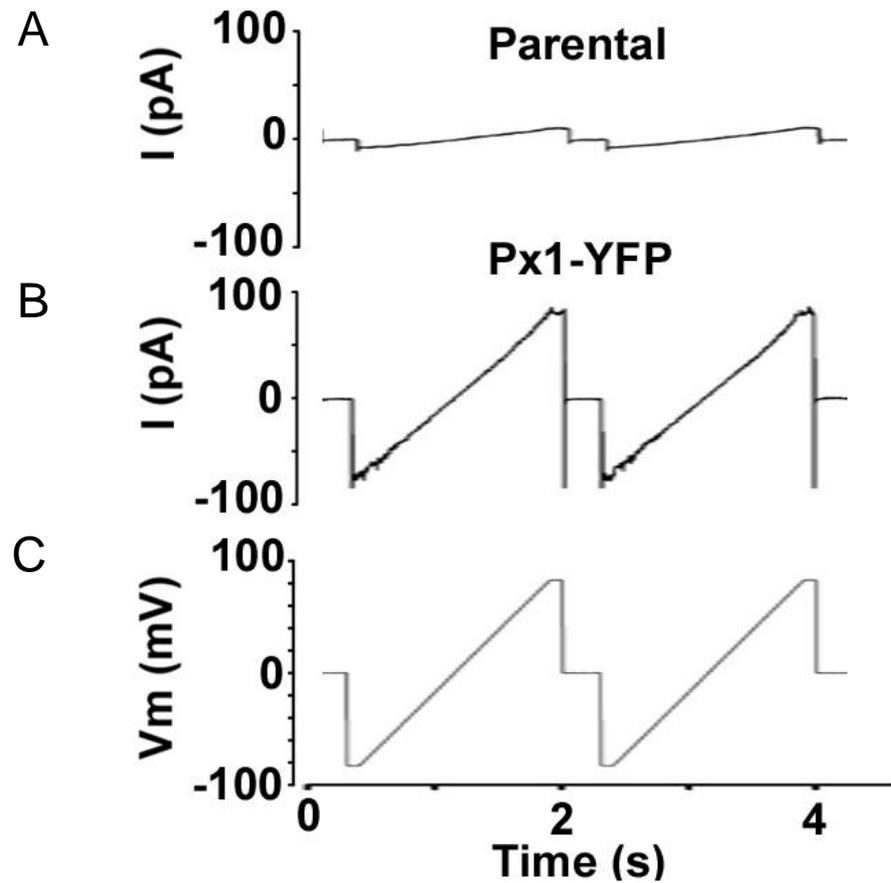


Figura 1. **Corrientes de *Whole cell* en células HeLa Px1-YFP.** (A-C) 2 rampas consecutivas de ± 80 mV, y 2 s de duración (C) aplicadas a las células parental no produjeron corrientes de tipo HC (A). El mismo estímulo produjo un incremento en las corrientes macroscópicas cuando se aplicó a las células Px1-YFP (B).

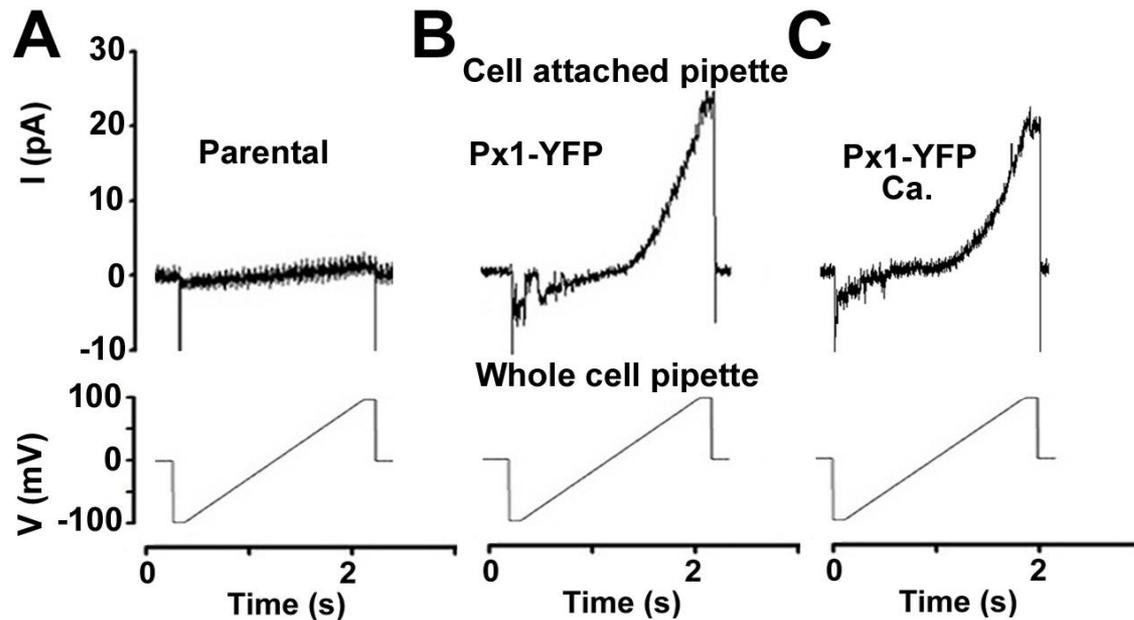


Figura 2. **Corrientes de canal único en células HeLa registradas mediante doble clampeo de voltaje en donde una pipeta se utilizó en la configuración de cell attach y la otra en whole cell para fijar el V_m .** Una solución interna (de baja concentración de calcio) se agregó a las dos pipetas. **(A)** La aplicación de una rampa de $-/+ 100$ mV, y 2 duración a las células parental no produjo la apertura de HC. **(B)** El mismo estímulo aplicado a las células Px1-YFP incrementó las corrientes a (+) y (-) V_m . A (-) V_m un canal de ~ 40 pS es abierto. Las corrientes fueron más grandes a voltajes de membrana positivos (c. 4X), aunque los canales no se pueden resolver con claridad. **(C)** En este caso los registros se realizaron con solución externa en la pipeta bajo configuración en *cell attach* y una solución interna en la pipeta en *whole cell*.

Solución externa: (en mM, NaCl (140), KCl (4), CaCl₂ (1.8), MgCl₂ (1), HEPES (5), glucose (5), pyruvate (2)) ; solución interna (en mM, 10 NaAsp, 140 KCl, 0.2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 2 MgATP, 5 HEPES (pH 7.3), 2 EGTA , 5 mM tetraetilamonio-Cl.

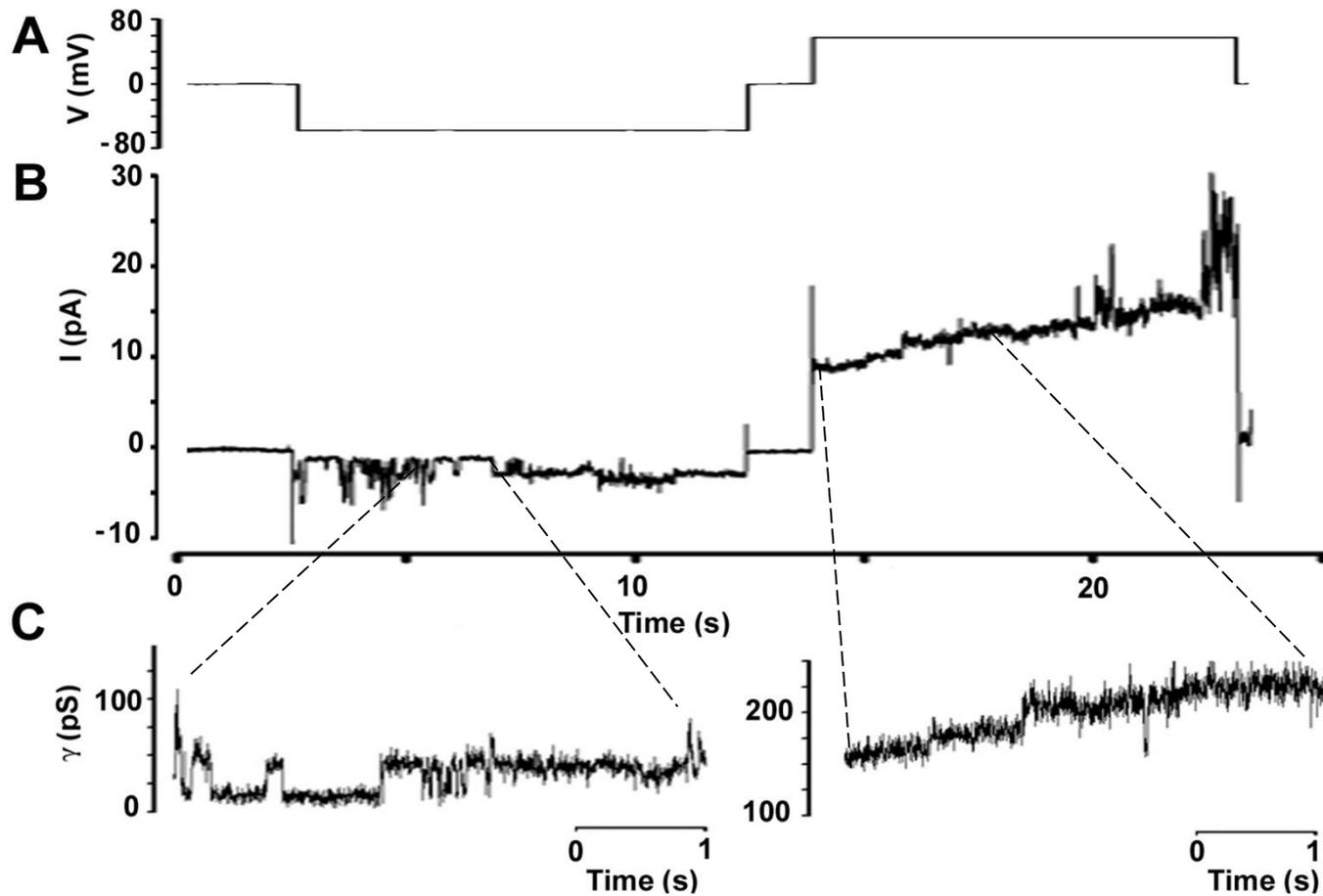


Figura 3. **Los Px1 HC se abren con una baja conductancia en células HeLa.** Registro de canal único en células HeLa Px1-YFP en donde se realizó doble clampeo de voltaje. **(A,B)** El protocolo de clampeo de voltaje se muestra en (A). El estímulo de voltaje fue la diferencia entre el V en *whole cell* y *cell attach* pipeta. Las corrientes en el parche a voltajes negativos o positivos se muestran en (B). **(C)** Las conductancia de canal único en el parche cuando el V fue fijado a $-/+ 60$ mV. La conductancia fue 25-50 pS a voltajes negativos y positivos. El primer HC se abrió luego de 2s de una estimulación a -60 mV.

A (-) siRNA siRNA Px1

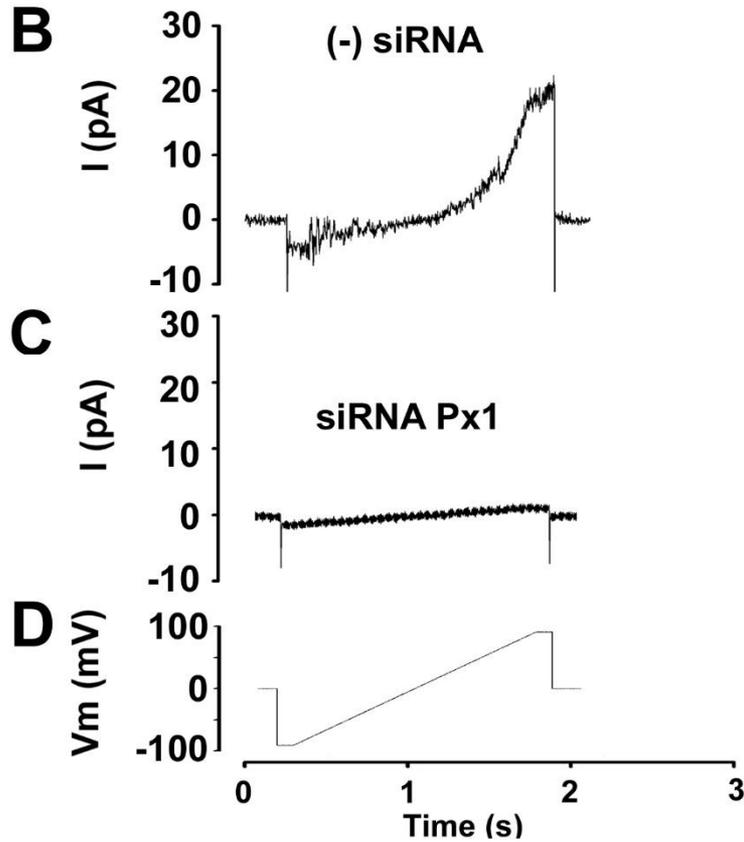
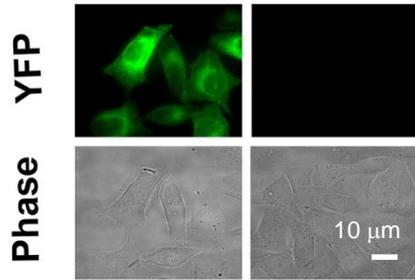


Figura 4. La transfección de la células HeLa Px1-YFP con una secuencia de siRNA contra la Px1 (siRNA Px1) previno la apertura de corrientes de tipo HC. (A) Imágenes de fluorescencia y contraste de fase de las células HeLa Px1-YFP luego de 48 h of de realizada la transfección con una secuencia negativa control (left), o con siRNA Px1 (siRNA Px1). (B, C) 1 rampa de 2s, \pm 100mV (D) produjo la apertura de HCs en el parche de células control (B) pero no en células transfectadas con siRNA Px1 (C).

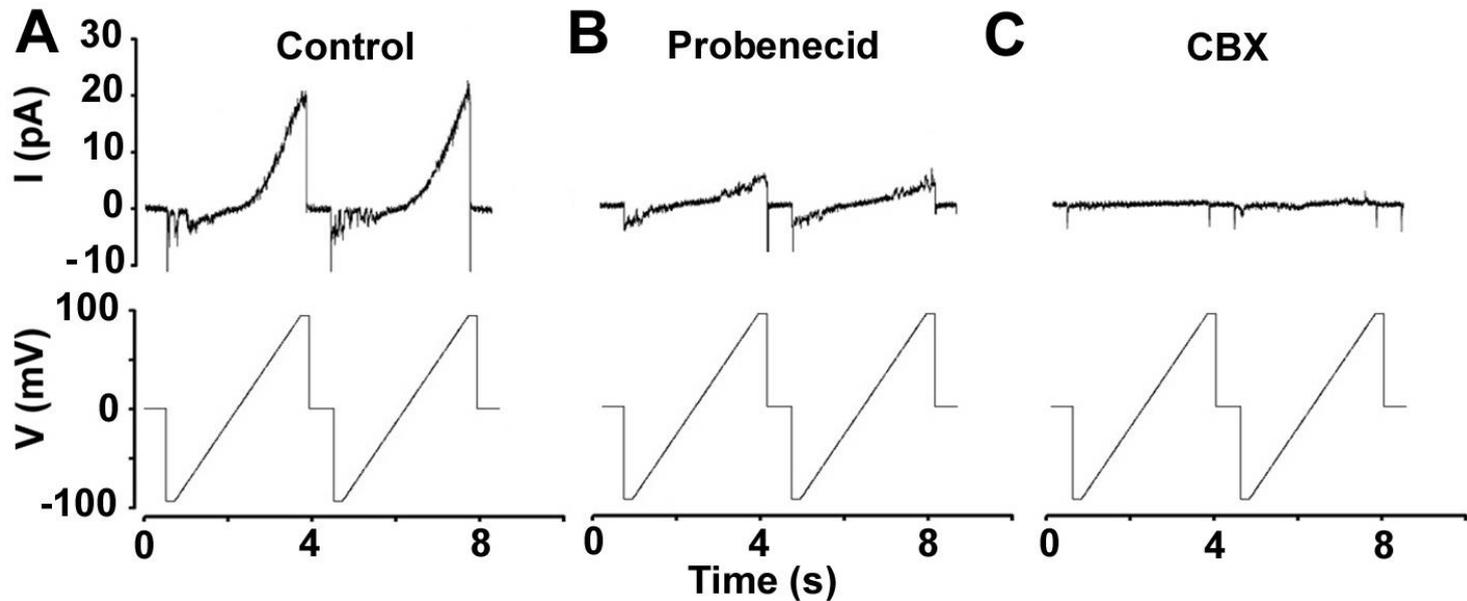


Figura 5. **Las corrientes de canal único en células HeLa Px1-YFP son sensibles a los antagonistas de HC. (A-G)** La estimulación con dos rampas de 2s, -/+ 100 mv produce la apertura de Px1 HC (A) a voltajes negativos y positivos. La apertura de HC se previno cuando 0.7 mM de Probenecid (B) (n=3 patches) y 0.150 mM CBX (C) (n=8 patches) se agregaron a la pipeta en *cell attach*.

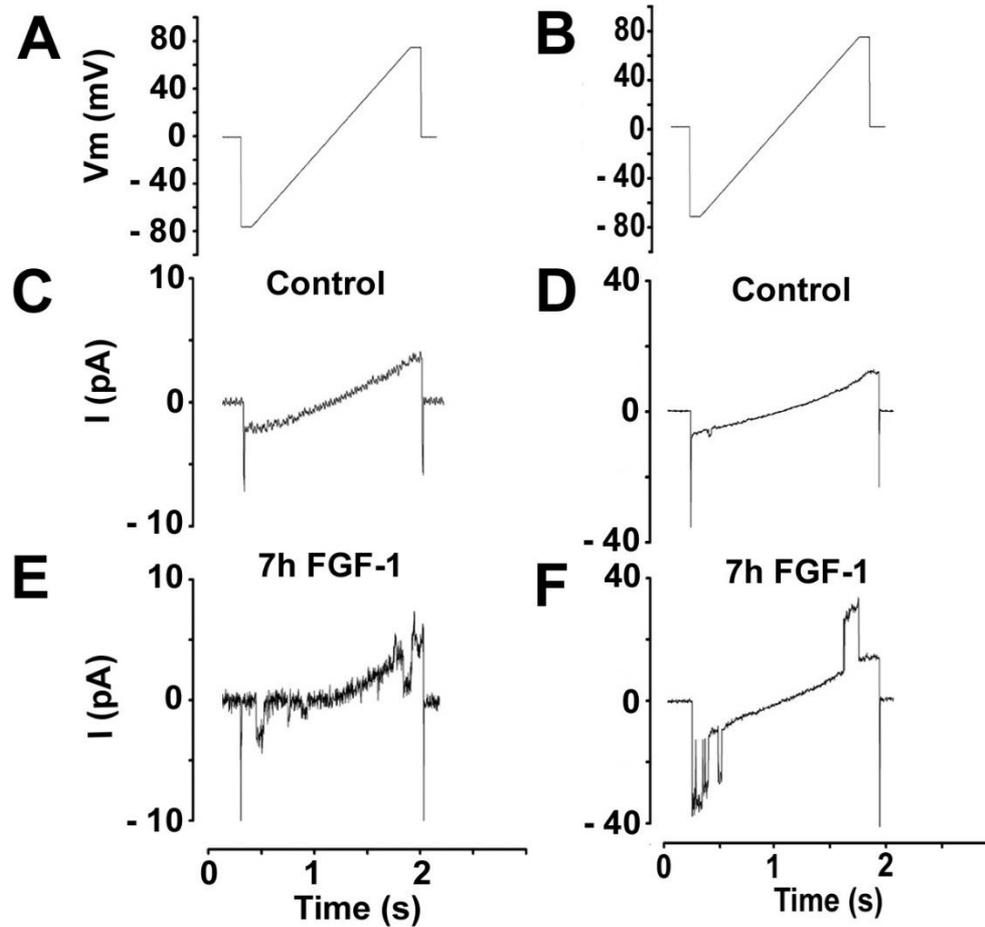


Figura 6. **Hemicanales en astrocitos espinales.** (A,B) La estimulación se realizó con una rampa de 2 s, y ± 100 mV. En astrocitos espinales control (C,D) o tratados durante 7h con FGF-1 (E,F) la estimulación con una 1 rampa produce la apertura de canales con propiedades similares a las obtenidas en células HeLa Px1-YFP cells (E) y HeLa Cx43-CFP (F).

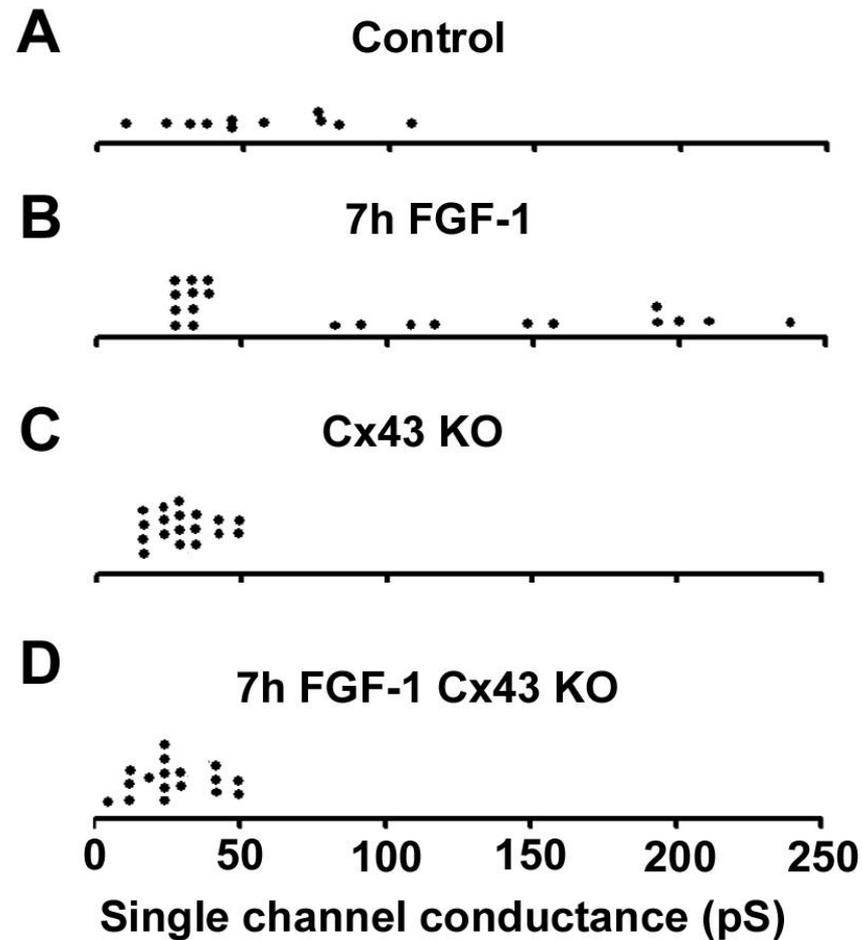


Figura 7. **Distribución de la conductancia de canal único en astrocitos derivados de la médula espinal de ratón.** Una pipeta se utilizó en *cell attach* para registrar los canales y otra en *whole cell* para fijar el voltaje a -60 o -80 mV. (A) Los astrocitos control se distribuyen a conductancias entre 10 y 100 pS. (B) Luego de 7h FGF-1 tratamiento, los eventos de canal único son agrupados en 25-50 pS y dispersados entre 80-250 pS. (C, D) La distribución de canal único en astrocitos espinales KO para Cx43 es agrupada en 25-50 pS en control (C) o células tratadas con FGF-1 (D)

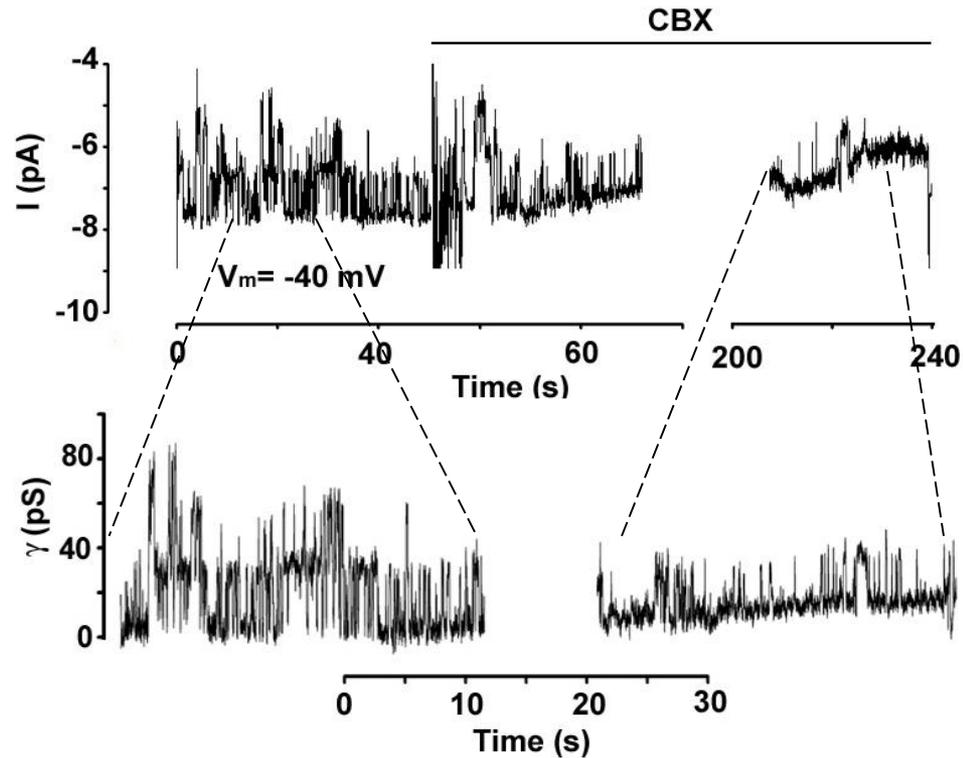


Figura 8. Px1 HCs registrados en astrocitos espinales derivados de ratones KO para Cx43.

(A) La probabilidad de apertura de los (hemi) canales en los parches obtenidos en células KO para Cx43 durante un estímulo de -40 mV se redujo mediante la perfusión con 0.15 mM CBX. (B) La conductancia de los HCs fue 40 pS (A). La CBX no cambió la conductancia del canal pero disminuyó su actividad.

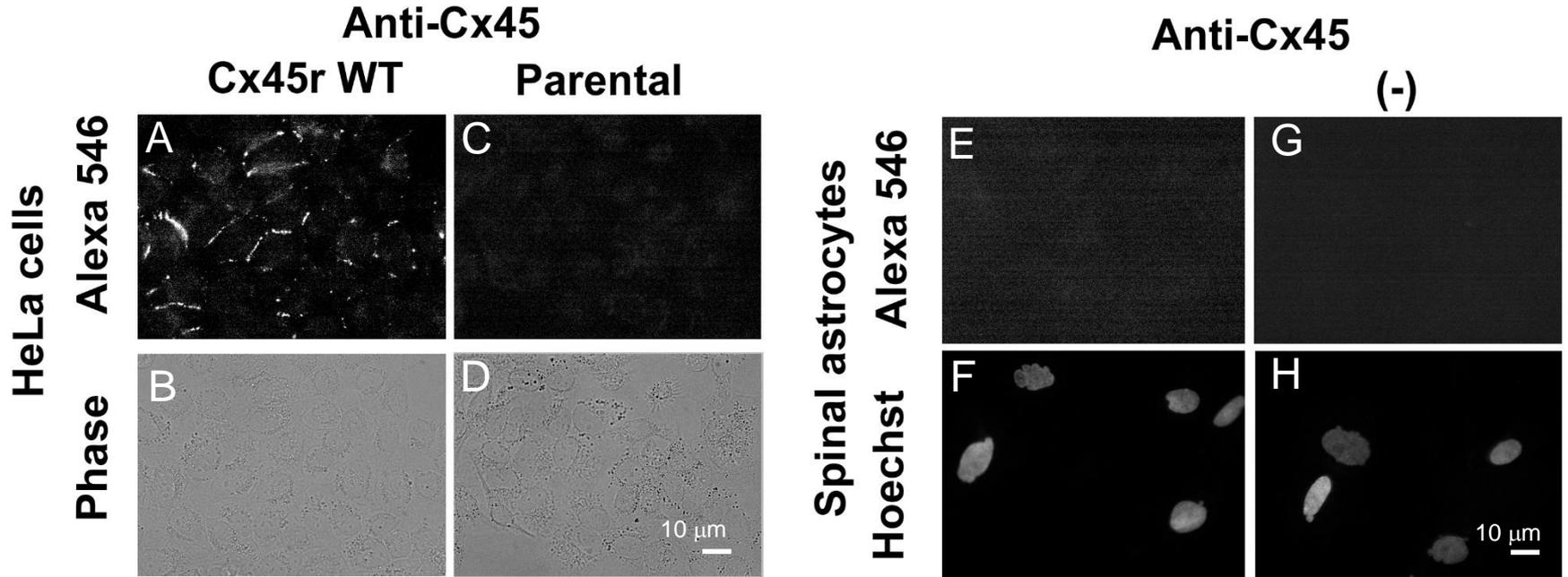


Figura 9. Los astrocitos espinales cultivados no expresan Cx45. (A, D) Micrografías de contraste de fase y fluorescencia en células HeLa que expresan la Cx45 de rata (A, B) y en células parental (C, D). El Anti-Cx45 se marcó con un anticuerpo secundario conjugado a un colorante Alexa 546. (E-H) Micrografías para la tinción de Hoechst y Alexa 546 en astrocitos espinales incubados con (E, F) o sin anti-Cx45 (G,H)

Capítulo IV

El incremento en la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) inducido por el FGF-1 en astrocitos espinales es mediado por la activación de la PLC, la activación de receptores purinérgicos y la apertura de hemicanales

IV.1- Resumen

Los niveles de FGF-1 y ATP incrementan como consecuencia del traumatismo de la médula espinal. Estos factores pueden regular el proceso inflamatorio en la médula espinal mediante la modulación de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) en astrocitos y microglia. En este capítulo describimos como en cultivos de astrocitos espinales, la secreción de ATP inducida por FGF-1, incrementa rápidamente (~ 5 min) la permeabilidad de membrana (P_m) mediante la apertura de los P2XR y Px1 HCs. 7 h horas más tarde los Cx43 HCs se vuelven funcionales. En menos de 2 minutos, el FGF-1 incrementó transitoriamente la $[Ca^{2+}]_i$. Estos cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ precedieron los cambios en la permeabilidad de la membrana al Etd⁺. El rápido incremento inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ cayó para alcanzar una fase de plateau o meseta que coincide en el tiempo con el aumento en la captación de Etd⁺. La fase de plateau y el incremento en la permeabilidad de membrana al Etd⁺ dependieron de la secreción de ATP, la posterior activación de receptores purinérgicos y la apertura de los Px1 HCs. Un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ además, se obtuvo al activar los receptores purinérgicos con ATP exógeno en lugar de FGF-1. El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la captación inducido por FGF-1 o ATP se previno mediante el tratamiento de los astrocitos con thapsigargin, la cual vacía los sitios de almacenamiento intracelular de calcio. La activación de la Fosfolipasa C (PLC) y la subsecuente producción de IP₃ mediaron el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la apertura de los Px1 HCs. No observamos oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ con tratamientos menores a 1 h con FGF-1. No obstante, oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ aparecieron luego de tratamientos de 7 h con FGF-1. La liberación de ATP durante el periodo de 7 h operó de un modo regenerativo, de manera tal que mantuvo elevada la permeabilidad de membrana al Etd⁺ y calcio. Las oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ estuvieron ausentes luego del tratamiento de los astrocitos con apirasa, una ecto-nucleotidasa que hidroliza el ATP. La inhibición de la expresión de Px1 con siRNA y el uso de astrocitos Cx43 KO o el pretratamiento con thapsigargin además, previno la aparición de las oscilaciones.

Estos datos sugieren que activación de la PLC por el FGF-1, induce la liberación de calcio desde el ER y secreción de ATP, la apertura de P2XR y los Px1 HCs. La liberación de ATP es regenerativa y auto-sostenida durante 7 h de tratamiento con FGF-1 debido a la apertura de los Px1 HCs y los Cx43 HCs. Los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ por FGF-1 pueden regular el patrón de secreción de

importantes mediadores inflamatorios y la expresión de genes en astrocitos en el curso de patologías espinales.

IV.2- Introducción

Los astrocitos poseen una forma de excitabilidad que se basa en variaciones de la concentración intracelular de calcio o $[Ca^{2+}]_i$ **(1)**. La señalización intracelular mediada por cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ ha sido descrita frecuentemente como variaciones en dos dimensiones, ondas de calcio las cuales se propagan radialmente desde la región de origen, u oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ dentro de una célula **(2)**. Los astrocitos estimulados mecánica o químicamente pueden mostrar ambas, las cuales han sido demostradas *in vitro* e *in vivo* **(3 - 4)**.

En el sistema nervioso central las ondas de calcio pueden acompañar la así denominada *spreading depression* (una despolarización en neuronas y glia que deprime la actividad eléctrica) observada luego del *stroke* o traumatismo del cerebro **(y (2) y (5))**. Las ondas de calcio han sido implicadas además en el procesamiento de información en dendritas **(see (6))**. Las oscilaciones de calcio participan en la descodificación de la información celular necesaria para la diferenciación neuronal **(7)**, optimización **(8)** o el incremento en la eficiencia y especificidad de la expresión de genes **(9)** así como en la regulación de la actividad de kinasas sensibles a calcio involucradas en la respuesta inmune natural (CDPk) **(10)**, la CAMk, y la PKC **(2)**.

Algunos modelos han sido propuestos para explicar las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$. Inicialmente se pensó que la difusión intracelular de inositol tri-fosfato (IP_3) a través de las uniones en hendidura mediaba este proceso **(2)**. Luego, fue aceptado que el ATP extracelular participa activamente de la propagación de ondas de $[Ca^{2+}]_i$ **(11)**. El ATP al activar sus receptores en la membrana promueve la liberación de calcio desde el ER y aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ **(12)**. El transitorio incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ se propaga de forma autócrina de un modo regenerativo **(11) (13)** y a través de diferentes microdominios **(14)**.

En el curso de enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica y la enfermedad de Alzheimer, la pérdida en la homeostasis de la $[Ca^{2+}]_i$ puede inducir estrés en el ER, exacerbar la liberación de ATP desde los astrocitos, y provocar disfunción en la unidad neuro-glia vascular **(15)**. El ATP activa las microglías, y estas producen mediadores pro-inflamatorios que provocan una disfunción en la irrigación sanguínea y la deprivación de factores neurotróficos. Estos eventos pueden provocar gliosis reactiva y neurodegeneración. Diferentes citoquinas y factores de crecimiento elevan su expresión durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y luego de un traumatismo (ver **(16)**) acerca de la enfermedad de Alzheimer, **(17)** para Parkinson, **(18)** sobre la injuria de médula espinal). Oscilaciones de calcio de pequeña amplitud y baja frecuencia (0.1-1

oscilaciones / min) se han detectado en ratones transgénicos que desarrollan Alzheimer **(19)** o en cultivos de astrocitos corticales expuestos al beta Amiloide **(20)** y la pérdida en la homeostasis del $[Ca^{2+}]_i$ ha sido implicada en el progreso de la ALS **(21)**. Aunque los mecanismos por los cuales el ATP es liberado durante la activación de los astrocitos son pobremente comprendidos. Los astrocitos expresan todos los elementos de la maquinaria necesaria para secretar ATP **(22 - 23)** (y ver **(24)** por un debate acerca de la liberación vesicular en astrocitos), así como hemicanales y P2X₇R **(25-27)** los cuales pueden actuar en ausencia de liberación vesicular (**ver capítulo II**). La liberación de ATP desde astrocitos en cultivo puede entonces ser mediante vesículas y/o a través de hemicanales **(28-30)**. Se ha demostrado que los Cx43 HCs son permeables al ATP y pueden mediar la liberación de esta purina desde los astrocitos durante la isquemia **(29)**. Los P2X₇R son canales iónicos permeables a calcio con conductancias unitarias de ~10 -15 pS **(31)** y potencialmente podrían mediar la liberación de ATP en células inmunes activadas **(32)**. Los Px1 HCs se abren mediante la activación de los P2X₇R y constituye otra posible vía de liberación de ATP **(33)**, aunque los Px1 HCs exhiben en oocitos y células sanguíneas conductancias unitarias de ~500 pS como **(34-35)** estos no han sido detectados en astrocitos o células HeLa Px1-YFP, lo que nos hace reconsiderar la existencia de “poros” de gran conductancia formados de Px1 en estas células. No obstante en estas células la Px1 media captación de Etd⁺ y parece mediar la liberación de ATP (**ver capítulos II y III**)

Los P2X₇R y los HCs son activados durante condiciones inflamatorias **(18, 36)** y por el FGF-1 (Capítulo II). La acumulación extracelular de ATP observada luego de la injuria de la médula espinal **(37)** es mediada por la activación de FGFR (**ver capítulo II**) pero los mecanismos por los cuales el FGF-1 y el ATP aumentan la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos espinales no han sido descritos en cultivo. Aquí demostramos que los astrocitos espinales tratados con FGF-1 incrementan la $[Ca^{2+}]_i$ y la permeabilidad al Etd⁺ por una vía común de señalización intracelular. La activación de la PLC por el FGFR induce la liberación de calcio desde el ER, la secreción de ATP y la apertura de los Px1 HCs. La liberación de ATP opera de forma regenerativa, y luego de 7 h de tratamiento con FGF-1, la probabilidad de apertura de los Cx43 HCs es incrementada, lo que induce oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$. Las oscilaciones de calcio estuvieron ausentes en astrocitos transfectados con siRNA contra la Px1 y en aquellos que no expresan Cx43 (-/-). Estas fueron sensibles a la concentración externa de calcio y al vaciamiento de los sitios de almacenamiento intracelular de calcio, ER, sugiriendo un influjo de calcio a través hemicanales que podría inducir liberación de calcio desde el ER. Concluimos que la liberación de calcio desde el ER promueve la secreción ATP y en minutos la apertura de los Px1 HCs. Horas más tarde los Cx43 HCs contribuyen en la inducción de oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$. Los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ mediados por los HCs son característicos de los astrocitos en diversas patologías espinales.

IV.3- Resultados

El FGF-1 incrementa la concentración de calcio intracelular en astrocitos espinales

La estimulación de astrocitos espinales en cultivo con FGF-1 produce la oligomerización de sus receptores, autofosforilación (en min) y subsecuente internalización y translocación de los mismos al núcleo en horas **(38)**.

El FGF-1 incrementó (en < 5 min) la $[Ca^{2+}]_i$. El rápido incremento inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ llegó a su máximo valor en 2.13 ± 0.15 ($p < 0.001$, $n=4$) veces el nivel basal (antes del tratamiento) y cayó para alcanzar una fase de plateau de 1.4 ± 0.05 ($p < 0.05$, $n = 4$) veces la $[Ca^{2+}]_i$ basal (**Fig 1 A**). La apirasa (2 μ M) (APY) redujo la $[Ca^{2+}]_i$ al nivel control e inhibió la fase de plateau (**Fig 1 B**). Estos datos sugieren una acción parácrina del ATP. La APY además redujo la $[Ca^{2+}]_i$ en el valor pico de la respuesta inicial a FGF-1 (1.85 ± 0.11 , $p < 0.05$ vs FGF-1 solo, $n=4$). El pretratamiento de los astrocitos con 200 μ M carbenoxolona (CBX) o la reducción de la expresión de P_{x1} con siRNA (siRNAP_{x1}) (**Fig 1 C-D**) generó un efecto similar a la APY (para CBX, 1.66 ± 0.1 , $p < 0.05$ vs FGF-1 solo, 1.01 ± 0.07 $p > 0.05$ vs el control; y para el siRNA 1.61 ± 0.1 $p < 0.05$ vs FGF-1 solo, 1.15 ± 0.03 , $p > 0.05$ vs control, pico y plateau, respectivamente). Estos datos sugieren que los P_{x1} HCs activados por los receptores purinérgicos (**(39-40), ver capítulo II**), median la fase de plateau en respuesta al ATP liberado. El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ dependió de la liberación de Ca^{2+} desde el ER como se demostró mediante el pretratamiento de los astrocitos con 1 μ M de thapsigargin (1 ± 0.1 , 0.9 ± 0.1 , pico y plateau respectivamente, $p > 0.05$ vs control, $n=4$). Es de notar que la thapsigargin incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ basal como es de esperar de un antagonista de las bombas serca, las cuales vacían los reservorios de calcio intracelular (**Fig 1 E**).

El ATP como el FGF-1 puede incrementar la concentración de $[Ca^{2+}]_i$. Los astrocitos espinales se trataron con 1 mM de ATP por diferentes períodos de tiempo. El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el ATP fue más rápido que el obtenido con FGF-1. Los valores máximos (en el pico) fueron similares en todos los tiempos de tratamiento con ATP (0.5 a 10 min) (**Fig. 2A y 2B**) ($T_{0.5 \text{ min}} = 1.7 \pm 0.08$, $p < 0.001$; $T_{1 \text{ min}} = 1.52 \pm 0.02$, $p < 0.001$; $T_{5 \text{ min}} = 1.75 \pm 0.1$, $p < 0.001$; $T_{10 \text{ min}} = 1.82 \pm 0.13$, $p < 0.001$; los datos se normalizaron al nivel basal, $n=6$).

Cuando la duración del tratamiento es más prolongada la $[Ca^{2+}]_i$ durante el plateau incrementó progresivamente ($T_{0.5 \text{ min}} = 1.09 \pm 0.007$, y $p < 0.05$; $T_{1 \text{ min}} = 1.09 \pm 0.02$, y $p < 0.05$; $T_{5 \text{ min}} = 1.25 \pm 0.12$, y $p < 0.05$; $T_{10 \text{ min}} = 1.46 \pm 0.11$, y $p < 0.001$, los datos se normalizaron al nivel basal, $n=6$) (**Fig 2A y 2B**).

Los astrocitos transfectados con siRNA P_{x1} o la secuencia control de siRNA negativa, mostraron valores en el pico en la $[Ca^{2+}]_i$ que no fueron significativamente diferentes (2.3 ± 0.2 , $p > 0.05$, $n=3$) con

los de los astrocitos pre-tratados con 50 μM de Reactive Blue 2, RB2 (2.25 ± 0.30 , $p < 0.001$ $n=5$) (antagonista de P2X2R, P2X4R, y P2YR) o 10 μM de Brilliant Blue G, BBG (1.7 ± 0.35 , $p < 0.05$ vs ATP alone, $n=5$). No obstante, los valores en el pico de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta al ATP fueron más pequeños que en los anteriores en astrocitos pretratados con 50 μM del antagonista no selectivo de los P2X, PPADS (1.25 ± 0.001 , $p < 0.01$ vs ATP solo, $n=3$) (**Fig. 2C y 2D**).

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el plateau se redujo en astrocitos transfectados con siRNAPx1 (1.1 ± 0.05 , $p > 0.05$, $n=5$), BBG (1.01 ± 0.05 , $p > 0.05$, $n=4$), PPADS (1 ± 0.011 , $p > 0.05$, $n=3$) y RB2 (1.25 ± 0.02 $p < 0.05$, $n=3$). Los tres antagonistas combinados (50 μM PPADS + 10 μM BBG + 50 μM RB2) redujeron en gran proporción la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el pico y en el plateau (pico, 1.3 ± 0.15 $p < 0.05$, $n=3$, plateau 1 ± 0.05 , $p < 0.05$, $n=3$) (**Fig 2C, D**).

El aumento en la permeabilidad de membrana al Etd⁺ inducido por el FGF-1 es mediado por la activación de la PLC y la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico

La permeabilidad de membrana al Etd⁺ incrementó luego del tratamiento con FGF-1 con una latencia de ~5 min en el 50 ± 5 % de las células evaluadas (**Fig. 3A y F**). Este incremento se previno por el tratamiento de los astrocitos con 2 μM / ml de APY y la reducción de la expresión de Px1 mediante el uso de siRNA (**Fig. 3B, C, n=10, FGF-1 vs control $p < 0.01$, y APY o siRNA vs FGF-1, $p < 0.01$**). La inducción de la captación de Etd⁺ inducida por el FGF-1 se inhibió por 200 μM de CBX, la cual bloquea los Px1 HCs y los Cx43 HCs (**Fig 1D**) ($n=3$). El heptanol, un inhibidor de los Cx43 HCs, no afectó la captación de Etd⁺ (**Fig 3 E**). En astrocitos tratados con 1 μM de thapsigargin solo un 3 ± 2 % de las células respondieron al FGF-1 incrementando la captación (**Fig.4B** $p < 0.01$ vs FGF-1, $n=4$). En células tratadas con 1 μM bapta-AM ninguna célula respondió al FGF-1 (**Fig. 4C**). En astrocitos espinales tratados con el U73122 (4 μM), un inhibidor de la PLC, o su derivado inactivo U73343, (4 μM), el FGF-1 incrementa la captación de Etd⁺ en 15 ± 5 % y 50 ± 1 % de la células evaluadas, respectivamente (**Fig. 4D y E**). El FGF-1 elevó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en astrocitos espinales tratados con U73122 (4 μM), pero no lo hizo cuando las células se trataron con U73343 (4 μM) (dato no mostrado).

Los astrocitos espinales activados con FGF-1 presentan oscilaciones de calcio mediadas por ATP

En astrocitos control, encontramos fluctuaciones en la concentración de calcio (oscilaciones) de pequeña amplitud (A) y baja frecuencia (F) ($A = 0.11 \pm 0.05$; $F = 0.03 \pm 0.02$ / min, $n=8$) (**Fig. 5A**). Estas no fueron afectadas por 2 μM /ml de APY o el inhibidor de las ecto-nucleotidasas ARL67156 (200 μM) (**Fig. 5B y C**). La frecuencia de las oscilaciones se incrementó luego de un tratamiento de 7h con FGF-

1 ($F= 0.2 \pm 0.04$ /min, $n=8$); sin cambios en la amplitud ($A= 0.11 \pm 0.03$) (**Fig.5E**). El tratamiento combinado de FGF-1 y apirasa durante un periodo de 7 h redujó significativamente la frecuencia de las oscilaciones en la $[Ca]_i$ ($F=0.008$ /min, $p>0.05$, $n=4$) (**Fig. 5F**). El ARL67156 (200 μ M), no cambi6 la amplitud de las oscilaciones aunque increment6 la frecuencia en un 65% en astrocitos espinales tratados 7h con FGF-1 ($F=0.33 \pm 0.06$ /min, $n=3$) (**Fig. 5G**).

El ATP liberado por los astrocitos espinales mantiene elevada la permeabilidad de membrana al Etd⁺ e induce oscilaciones de calcio

Para evaluar si la liberaci6n de ATP durante la activaci6n de astrocitos espinales con FGF-1 opera de un modo regenerativo tal que mantiene elevada la permeabilidad de membrana, medimos la permeabilidad al Etd⁺ luego de 7 h de iniciado un tratamiento con FGF-1 por un periodo de, 0.5 h, 2 h y 4 h. Un tratamiento de media hora con FGF-1, no produce un incremento en la captaci6n Etd⁺ cuando esta se evalu6 a las 7 h. Por lo tanto el incremento en la permeabilidad de la membrana inducido por FGF-1 en ~5 min se revierte luego 6.5 h de lavar el FGF (**see Fig. 3**). Cuando el tratamiento con FGF-1 tard6 2 h o 4 h, la captaci6n, medida a las 7 h, se increment6 2 y 3 veces respectivamente (2.2 ± 0.2 , 2.8 ± 0.25). Esto no fue significativamente diferente del valor que reportamos para tratamientos de 7 h con FGF-1 (**Fig. 6 A-D** y **capítulo II**). La aplicaci6n de 2 μ / ml apirasa durante todo el per6odo de 7 h redujo este incremento (**Fig. 6D**). Luego usamos el mismo protocolo de tratamiento con FGF-1 para medir la $[Ca^{2+}]_i$. Un tratamiento con FGF-1 durante 0.5 h no elev6 la $[Ca^{2+}]_i$ a las 7 h (0.5 h, $F= 0.13 \pm 0.06$ /min). La $[Ca^{2+}]_i$ y la frecuencia se elevaron luego de 2 h o 4 h ($F=0.30 \pm 0.095$ /min y $F=0.30 \pm 0.090$ /min, $p>0.05$ vs control) con respecto al valor control (0.03 ± 0.01 /min) (**Fig. 6**). Estas oscilaciones fueron inhibidas por el tratamiento con APY, sugiriendo que estuvieron mediadas por la liberaci6n de ATP.

Las oscilaciones de calcio inducidas por el FGF-1 se previenen mediante la reducci6n en la expresi6n de Px1 con siRNA o la delec6n del gen de la Cx43

La reducci6n en la expresi6n de Px1 previene la aparici6n de oscilaciones luego del tratamiento de los cultivos de astrocitos espinales de rata con FGF-1 por 7 h (**Fig. 7A-E**). En cultivos de astrocitos obtenidos de ratones wild type, un tratamiento de 7 h con FGF-1 increment6 la frecuencia de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ ($F= 0.18 \pm 0.03$ /min, $n=3$) . Estas oscilaciones estuvieron ausentes en los astrocitos (-/-) para Cx43 tratados con FGF-1 por 7 h (**Fig. 7F-G**). Con estos datos podemos asumir que la Cx43 y los Px1 HCs median la entrada de calcio a la c6lula y la liberaci6n de ATP, lo cual favorece la generaci6n de las oscilaciones de calcio.

Para investigar si la entrada de calcio a través de los HCs pueden inducir la liberación desde los sitios de almacenamiento intracelular, los astrocitos espinales se trataron con thapsigargin (1 μ M) por 5 min. La thapsigargin inhibe las oscilaciones de calcio (**Fig 8 A-D**). Estas oscilaciones además, estuvieron ausentes cuando los registros se realizaron en una solución fisiológica (Tyrode) con baja concentración de calcio (\sim 10 μ M) (**Fig 8 E-H**). Estos datos sugieren que la entrada de calcio mediada por los Px1 HCs y los Cx43 HCs en astrocitos espinales tratados con 7 h FGF-1 induce la liberación de calcio desde el ER.

IV.4- Conclusiones

En este capítulo demostramos que en cultivos de astrocitos espinales, la activación de la PLC, por la activación del FGFR promueve la liberación de calcio desde los sitios de almacenamiento intracelular (ER) y activa, con una latencia de pocos minutos, a los receptores purinérgicos y los Px1 HCs. Como vimos en el capítulo II, horas más tarde, la probabilidad de apertura de los Cx43 HCs es incrementada. Esto permite la liberación de más ATP, la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ y la aparición de oscilaciones.

Nuestros datos demuestran que la exposición de los astrocitos a FGF-1 por pocos minutos incrementa el nivel basal de la $[Ca^{2+}]_i$ y la liberación ATP. El ATP activa receptores purinérgicos y los Px1 HCs (**(39-40) ver capítulo**). La inferencia de que los Px1 HCs median este proceso está basada en los datos que demuestran que la CBX o la reducción de la expresión de Px1 con siRNA previenen el incremento en la permeabilidad de membrana inducido por el FGF-1. El incremento inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por FGF-1 fue independiente de la liberación de ATP, y dependieron la liberación de calcio desde el ER. Esta conclusión se desprende de los siguientes hechos: en astrocitos tratados con apirasa existió un pequeño incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ que fue inducido por FGF-1 y fue transitorio, sin vislumbrarse una fase de plateau; y que el BAPTA-AM y la thapsigargin además inhibieron el incremento en la permeabilidad de membrana al Etd⁺ inducido por FGF-1.

Los astrocitos espinales responden al ATP de la misma forma que al FGF-1. La respuesta en el pico fue mediada por P2X, con poca contribución de los P2YR y los Px1 HCs, como se sugirió por la carencia de efecto del RB2 (**antagonista de los P2YR**) y siRNA Px1. No obstante la fase de plateau en astrocitos espinales estuvo mediada por los Px1 HCs, probablemente activados por los P2X7R, dado que esta fue inhibida por BBG y apirasa, y estuvo ausente en células transfectadas con siRNA Px1. Los P2YR pueden haber tenido alguna contribución en esta fase dado que RB2 redujo la fase de plateau aunque no la eliminó completamente. El RB2 puede haber inhibido otros receptores como P2X2R, P2X4R, P2X5R (ver Garré et al., paper adjunto).

Los FGFR están acoplados a la PLC γ (41), la cual incrementa la producción de IP₃ e induce liberación de calcio desde el ER. La activación de la PLC γ establece una conexión funcional entre el FGFR y la permeabilización de membrana y los cambios en la [Ca²⁺]_i. De acuerdo con esto último, los incrementos en la permeabilidad de membrana al Etd⁺ y en la [Ca²⁺]_i inducidos por el FGF-1 se inhibieron con el antagonista de la PLC U73122, pero no con su derivado inactivo, el 73343.

Un punto importante a resaltar es que el tratamiento de los astrocitos espinales con thapsigargin no altera la permeabilidad basal al Etd⁺, lo cual sugiere que un incremento en la [Ca²⁺]_i por si mismo no es suficiente para permeabilizar las células. Sin embargo, la liberación de calcio desde sitios de almacenamiento intracelular iniciada por la activación de la PLC podría involucrar a otros factores necesarios para promover la liberación vesicular de ATP (ver el capítulo II) y aumentar la permeabilidad de membrana (Fig. 4). Esto plantea la idea de una organización en microdominios de calcio regulados por el FGFR, la PLC y regiones específicas del ER que promueven la apertura de Px1.

Mecanismos que subyacen el incremento de la permeabilidad al calcio en astrocitos activados por FGF-1. Agentes que producen estrés celular, citoquinas y mediadores inflamatorios pueden afectar el metabolismo de la glucosa en astrocitos mediante la inhibición de la respiración mitocondrial (42-43). La activación de la glicólisis en astrocitos mantiene la concentración intracelular de ATP por encima de los niveles críticos y previene la apoptosis. Esto es diferente en el caso de las neuronas donde la baja actividad glicolítica no puede compensar el daño mitocondrial (43). La inhibición del metabolismo celular y de la cadena respiratoria son acompañadas de un incremento en la actividad de los Cx43 HCs en astrocitos corticales (44) y esto parece depender del estado redox de la célula (45). El incremento en la probabilidad de apertura de los Cx43 HCs aumenta la liberación de ATP desde células isquémicas (29) o células expuestas a tratamientos inflamatorios (chapter II). La elevación de la concentración extracelular de ATP incrementa la [Ca²⁺]_i en astrocitos espinales (Fig 2).

Las oscilaciones de calcio en astrocitos requieren la activación de la PLA o PLC, las cuales incrementan la producción de IP₃ e inducen la liberación de calcio desde sitios de almacenamiento intracelular sin contribución de la entrada de calcio desde el medio extracelular (46). Nuestros datos sugieren que la activación de la PLC, inicialmente media la apertura de los Px1 HCs lo que permitiría la entrada de calcio a la célula. Los astrocitos presentan alta capacidad buffer de calcio en el ER y la mitocondria y las oscilaciones aparecerían cuando los reservorios intracelulares están sobrecargados, como ocurre cuando el metabolismo de estas células se altera durante condiciones inflamatorias. El llenado de los reservorios intracelulares con calcio ajusta sensibilidad de los receptores de IP₃ (46) (47). Nosotros asumimos que la frecuencia de las oscilaciones de [Ca²⁺]_i dependerá de que tan rápido

los almacenes intracelulares se carguen o vacíen. Es así que la entrada de calcio a través de los P2X7R y los HCs, podrá afectar la frecuencia de las oscilaciones como se sugiere de la inspección de las Figs. 5 and 6. Cuando la $[Ca^{2+}]_o$ desciende, la amplitud y la frecuencia de las oscilaciones de calcio en astrocitos espinales disminuye **(48) (46)**.

In vivo e *in vitro*, la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos puede ser sensible a la actividad neuronal (ver **(15)**). El incremento de la actividad en neuronas evoca ondas de calcio en astrocitos las que se propagan hasta alcanzar los terminales astrocitarios e inducen secreción de moléculas vasoactivas **(49-50)**. Estos datos sugieren que los astrocitos pueden ser componentes activos de la función sináptica y el procesamiento de señales parácrinas. Oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ además pueden comprender mecanismos intrínsecos de los astrocitos para codificar información. Las señales de calcio pueden favorecer la diferenciación celular, como se ha propuesto para neuronas **(7)**, e incrementar la eficiencia y especificidad de los genes expresados **(8-9)**. La $[Ca^{2+}]_i$ puede regular importantes sensores de calcio tales como quinasas involucradas en las respuestas inmunes natural, CDPk (innate immune response in plant) (10), o CAMk y PKC **(15)**.

Los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ mediados por receptores purinérgicos y HCs en astrocitos activados pueden regular el progreso de la gliosis reactiva, y la expresión de genes que afecten la diferenciación de precursores gliales.

IV.5- Referencias

1. Zhang Q and Haydon HP (2005) Roles for gliotransmission in the nervous system. *J Neural Transm.* 112:121-125.
2. Nedergaard M, Ramson B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26:523-530.
3. Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.
4. Wang X et al., (2006) Astrocytic Ca^{2+} signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci.* 9:816-823.
5. Ayata C (2010) Cortical spreading depression triggers migraine attack: pro. *Headache.* 50:725-730.
6. Park MK, Choi YM, Kang YK, Petersen OH (2008) The endoplasmic reticulum as an integrator of multiple dendritic events. *Neuroscientist* 14:68-77.
7. Gu X, Spitzer NC (1995) Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca^{2+} transients. *Nature* 375:784-787.

8. Li W, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G, Tsien RY (1998) Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature*. 392:936-941.
9. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392:933-936.
10. Boudsocq M et al., (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* 464:418-422.
11. Guthrie P et al., (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19:520-528.
12. Verkhratsky A and Kettenmann H (1996) Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci.* 19:346-352.
13. Paemeleire K (2000) ATP-dependent astrocyte-endothelial calcium signaling following mechanical damage to a single astrocyte in astrocyte-endothelial co-cultures. *J Neurotrauma* 17:345-358.
14. Arcuino G et al., (2002) Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:9840-9845.
15. Nedergaard M, Rodriguez JJ, Verkhratsky A (2010) Glial calcium and diseases of the nervous system. *Cell Calcium.* 47:140-149.
16. Morales I, Farias G, Maccioni RB (2010) Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation* 17:202-204.
17. Tansey MG, Goldberg MS (2010) Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis.* 37:510-518.
18. Cotrina ML and Nedergaard M (2009) Physiological and pathological functions of P2X7 receptor in the spinal cord. *Purinergic Signal.* 5:223-232.
19. Takano T, Han X, Deane R, Zlokovic B, Nedergaard M (2007) Two-photon imaging of astrocytic Ca²⁺ signaling and the microvasculature in experimental mice models of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1097:40-50.
20. Chow SK, Yu D, Macdonald CL, Buibas M, Silva GA. (2010) Amyloid beta-peptide directly induces spontaneous calcium transients, delayed intercellular calcium waves and gliosis in rat cortical astrocytes. *ASN Neuro* 2:e00026.
21. Grosskreutz J, Van Den Bosch L, Keller BU (2010) Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium.* 47:165-174.
22. Parpura V, Fan Y, Basarsky T, Jahn R, Haydon PG (1995) Expression of synaptobrevin III, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS Lett.* 377:489-492.
23. Pryazhnikov E and Khiroug L (2008) Sub-micromolar increase in [Ca²⁺]_i triggers delayed exocytosis of ATP in cultured astrocytes. *Glia* 56:38-49.

24. Hamilton NB and Attwell D (2010) Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? . *Nat Rev Neurosci.* 11:227-238.
25. Bennett MV, Contreras J, Bukauskas FF, Sáez JC. (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* 26 610-617.
26. Macvicar BA and Thompson RJ (2010) Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci* 33:93-102.
27. Suadicani SO, Brosnan C, Scemes E (2006) P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci.* 26:1378-1385.
28. Coco S et al., (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem.* 278:1354-1362.
29. Kang J et al., (2008) Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci* 28:4702-4711.
30. Cotrina ML et a., (2000) ATP-mediated glia signaling. *Journal of Neuroscience* 20:2835-2844.
31. Riedel T, Schmalzing G, Markwardt F (2007) Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X7 receptor-operated single-channel currents. *Biophys J* 93:846-858.
32. Pellegatti P, Falsoni S, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F (2005) A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol Biol Cell.* 16:3659-3665.
33. Iglesias R et al., (2008) P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol* 295:752-760.
34. Bao L, Locovei S, and Dahl G (2004) Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.* 572:65-68.
35. Locovei S, Wang J, and Dahl G (2006) Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* 580:239-244.
36. Orellana JA et al., (2009) Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 11:369-399.
37. Wang X et al., (2004) P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med.* 10:821-827.
38. Cassina P et al., (2005) Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 93: 38-46.
39. Pelegrin P and Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071-5082.
40. Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett* 581:483-488.
41. Reuss B, Bohlen und Halbach O (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 313:139-157

42. Bolaños JP and Almeida A (2006) Modulation of astroglial energy metabolism by nitric oxide. *Antioxid Redox Signal.* 8:955-965.
43. Gavillet M, Allaman I, Magistretti PJ (2008) Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia* 56:975-989.
44. Contreras JE, *et al.* (2002) Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:495-500.
45. Retamal MA *et al.*, (2006) S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4475-4480.
46. Berridge M (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1793:933-940.
47. Berridge MJ and Irvine RF (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341:197-205.
48. Zeng S, Li B, Zeng S, Chen S (2009) Simulation of spontaneous Ca²⁺ oscillations in astrocytes mediated by voltage-gated calcium channels. *Biophys J* 97:2429-2437.
49. Mulligan SJ and MacVicar B (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431:195-199.
50. Takano T *et al.*, (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci.* . *Nat Neurosci.* 9:260-267.

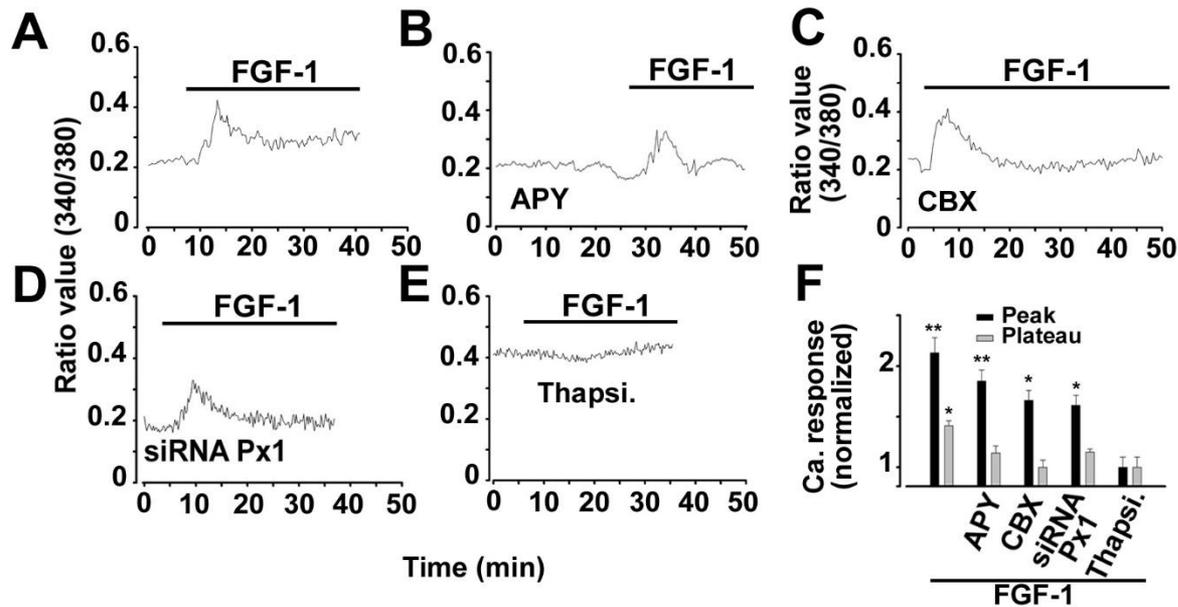


Figura 1. El FGF-1 aumentó la $[Ca^{+2}]_i$ basal en astrocitos espinales. La barras ubicadas en la parte superior de los registros corresponden a la aplicación de 10 ng/ml de FGF-1. (A) El FGF-1 indujo un rápido incremento en la $[Ca^{+2}]_i$ la cual decae a una fase de plateau. (B-D) 10 min pre-tratamiento de las células con 2 mU/ml APY (B), 200 μM carbenoxolona (CBX)(C), o la transfección de los astrocitos durante 24 h con siRNA Px1 (D) inhibió la fase de plateau pero no el pico. (E) El pre-tratamiento con thapsigargin (1 μM) previno el incremento en la $[Ca^{+2}]_i$. (F) Cuantificación de los cambios de la $[Ca^{+2}]_i$ en respuesta a FGF-1 (*p<0.05, **p<0.01).

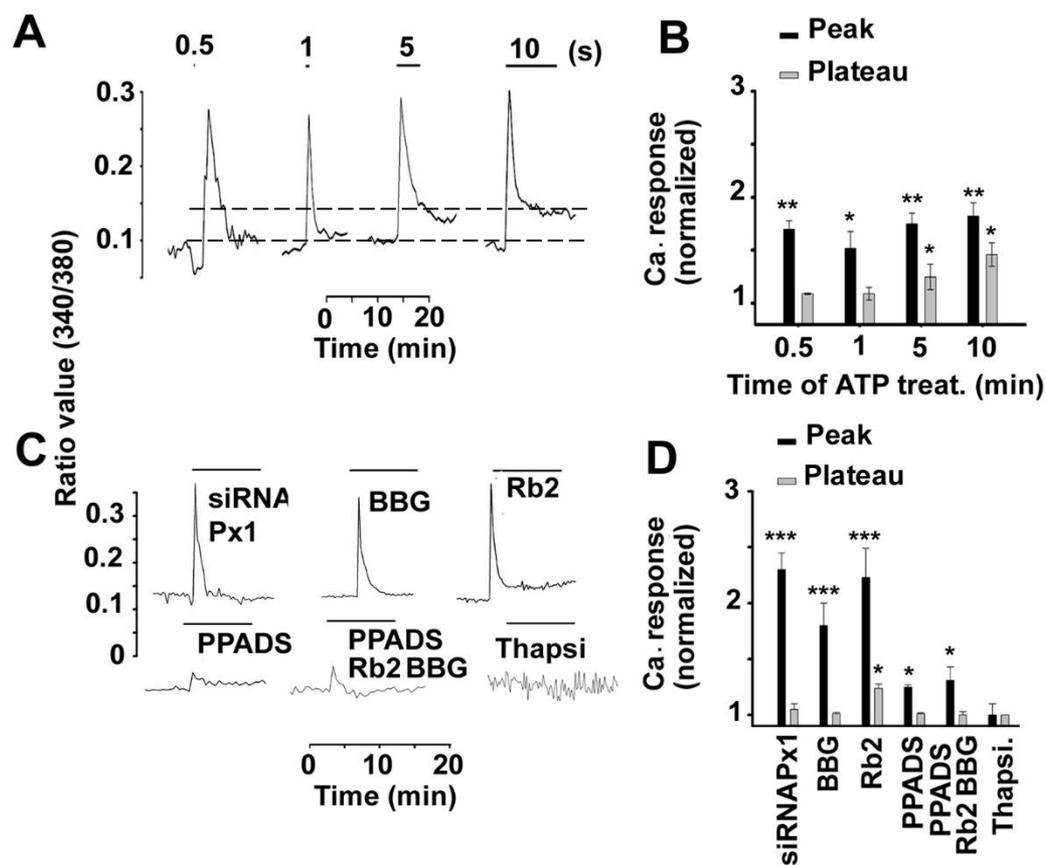


Figura 2. (A-D) El ATP incrementó el flujo de calcio a través de los P2XR y los Px1 HCs. (A) Astrocitos espinales tratados con 1 mM de ATP durante 0.5 min o 1 min mostraron la misma $[Ca^{+2}]_i$ en el pico y pequeñas fases de plateau. Las células tratadas con 1 mM ATP durante 5 o 10 min presentaron un rápido incremento en la $[Ca^{+2}]_i$ y fase de plateau. (B) Cuantificación de los cambios en la $[Ca^{+2}]_i$ en respuesta al ATP aplicado por diferentes períodos; la respuesta se midió en el pico (barras negras) y en la fase de plateau (barras grises). (C) La $[Ca^{+2}]_i$ medida en células tratadas durante 10 min con 1 mM ATP, luego de la transfección (24 h) con siRNAPx1, en la presencia de 5 mM Brilliant Blue (BBG), 50 mM Reactive Blue-2 (Rb2), 50 mM PPADS, or BBG (5 mM) + PPADS (50 mM) + Rb2 (mM 50) y 1 mM Thapsigargin (Thapsi). Las barras sobre los registros denotan la aplicación de ATP. La respuesta en el pico es principalmente mediada por P2XR (inhibición por PPADS), y el plateau por Px1 HCs (inhibición por siRNA) activados por P2X₇R. (D) Cuantificación de los cambios en la $[Ca^{+2}]_i$ en respuesta al tratamiento con 1mM de ATP durante 10 min. Las respuestas en B y D se normalizaron al nivel basal (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

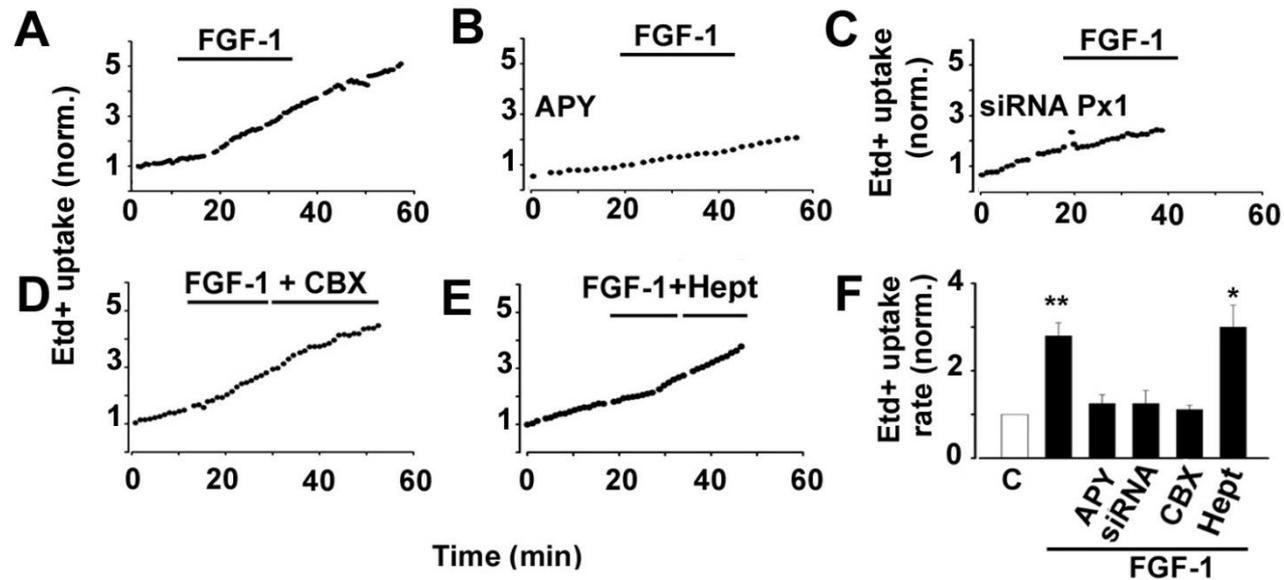


Figura 3. **La estimulación de los astrocitos espinales con FGF-1 indujo la apertura de los Px1 HCs.** (A) La permeabilidad de membrana al Etd⁺ aumentó en menos de 5 min luego del tratamiento con FGF-1. (B, C) En una célula tratada con apirasa (2 mU/ml) (B) o en otra donde la expresión de Px1 se inhibió mediante la transfección con siRNA Px1 (C), la permeabilidad de membrana no fue afectada por el FGF-1. (D, E) El incremento en la permeabilidad de membrana inducida por FGF-1 se inhibió por CBX (D), un antagonista de los HCs, pero no con 1 mM Heptanol (Hept) (E). (F) Cuantificación de diferentes experimentos en A-D. (*p<0.05, **p<0.01).

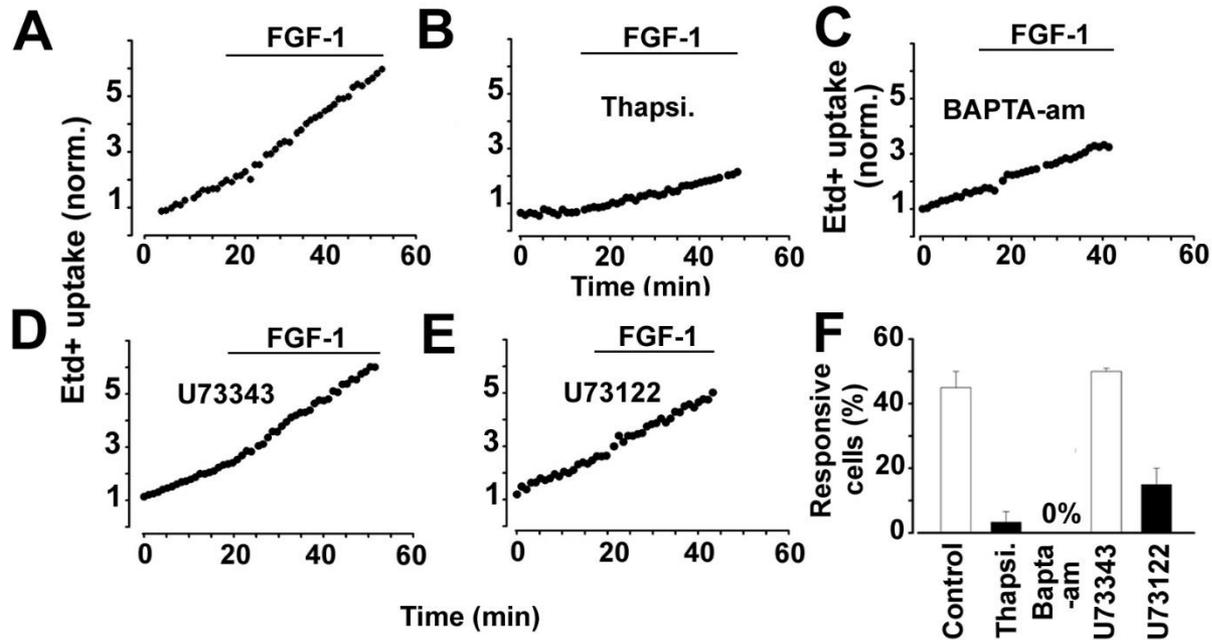


Figura 4. El incremento en la permeabilidad al Etd+ inducido por FGF-1 dependió de la activación de la PLC y la liberación de calcio desde los sitios de almacenamiento intracelular (ER). (A-C) La permeabilidad de membrana es incrementada por el tratamiento con FGF-1 en astrocitos espinales control (A) pero no en aquellas células pre-tratadas con con 1 μ M de thapsigargin (Thapsi.) (B) o BAPTA-AM (C). (D, E) El FGF-1 incrementó la permeabilidad en una célula tratada con el compuesto inactivo U73343 (4 μ M) (D) pero no en una célula tratada con el inhibidor de la PLC, U73122 (4 μ M). (F) Cuantificación del número de células (%) que incrementaron la permeabilidad de membrana ante el tratamiento con FGF-1 en situación control, o en células tratadas con Thapsi., Bapta-AM, U73343 y U73122.

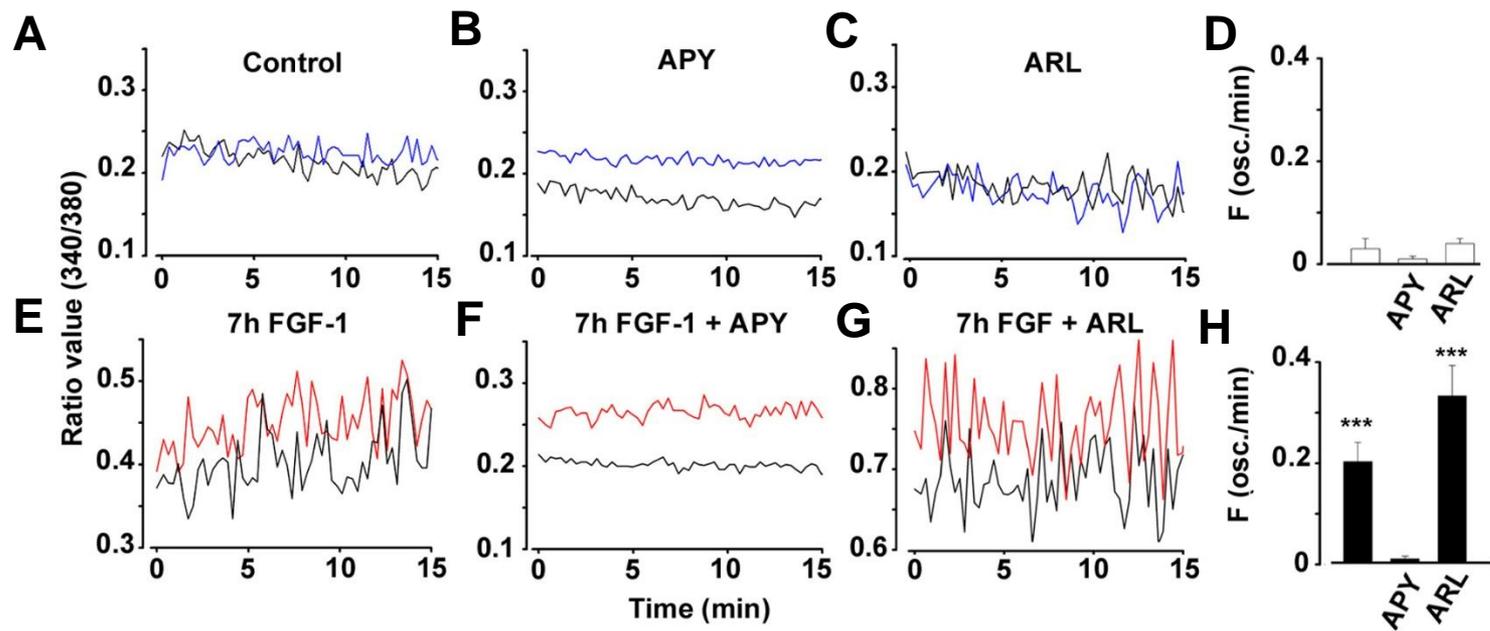


Figura 5. **El tratamiento de astrocitos espinales con 7 h FGF indujo oscilaciones de calcio mediadas por ATP (A-C).** La $[Ca^{+2}]_i$ en dos astrocitos control (A) no fue afectada por apirasa (B) y el inhibidor de las ecto-nucleotidasas ARL67156 (ARL) (200 mM) (C). Cuantificación de la frecuencia (F) de las oscilaciones de calcio mostradas en A, B y C (D). El tratamiento con FGF-1 durante 7 h aumenta la frecuencia de las oscilaciones de calcio (E); estas oscilaciones fueron inhibidas por apirasa (F). La amplitud de las oscilaciones de calcio se incrementó por ARL67156 (G). Notar el rango de valores en el cociente ratiométrico (ratio) en E y G.

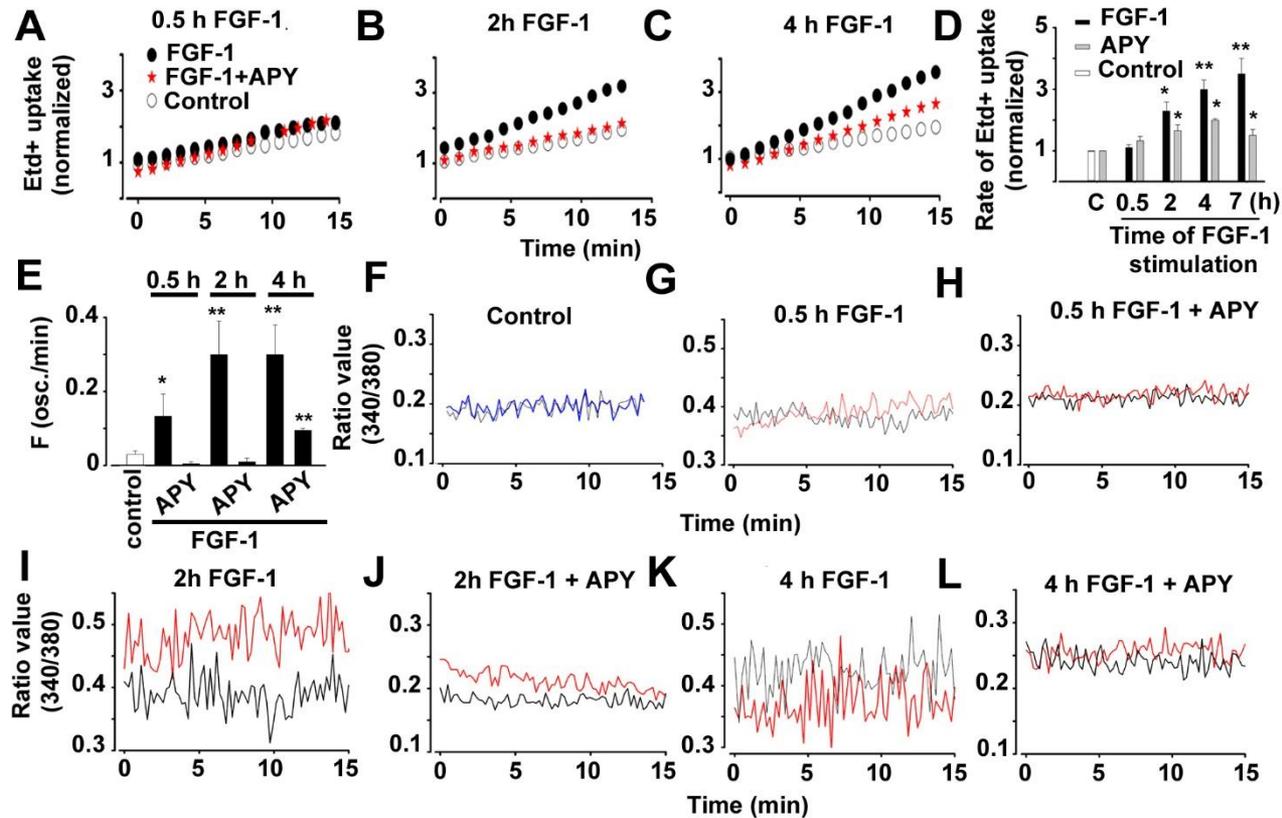


Figura 6. El ATP opera en un bucle de retroalimentación positiva que mantiene elevada la permeabilidad al Etd+ e induce oscilaciones de calcio en astrocitos espinales. (A-D) La captación de Etd+ en astrocitos espinales se evaluó luego de 7 h de iniciar diferentes tratamientos con FGF-1 durante 0.5, 2 o 4 h. (A) El tratamiento con FGF-1 durante 0.5 h no aumentó la permeabilidad de membrana luego de 7 h. (B, C) La estimulación con FGF-1 por 2 h (B) o 4 h (C) aumentó la captación luego de 7 h; el efecto se redujo por apirasa (APY). (D) Se muestra la tasa de la captación de Etd+ a diferentes tiempos de tratamiento con FGF-1 (E-L) Registros de la $[Ca^{+2}]_i$ en astrocitos tratados con FGF-1 con el mismo protocolo utilizado en A-D. Las oscilaciones de calcio persistieron luego de lavar el FGF-1, y se inhibieron por apirasa. (E) La frecuencia de las oscilaciones de calcio incrementó en función del tiempo de tratamiento con FGF-1. Se muestran las células control (F) o tratadas con FGF-1 solo o en la presencia de 2 μ /ml de APY en los tiempos indicados (G-L).

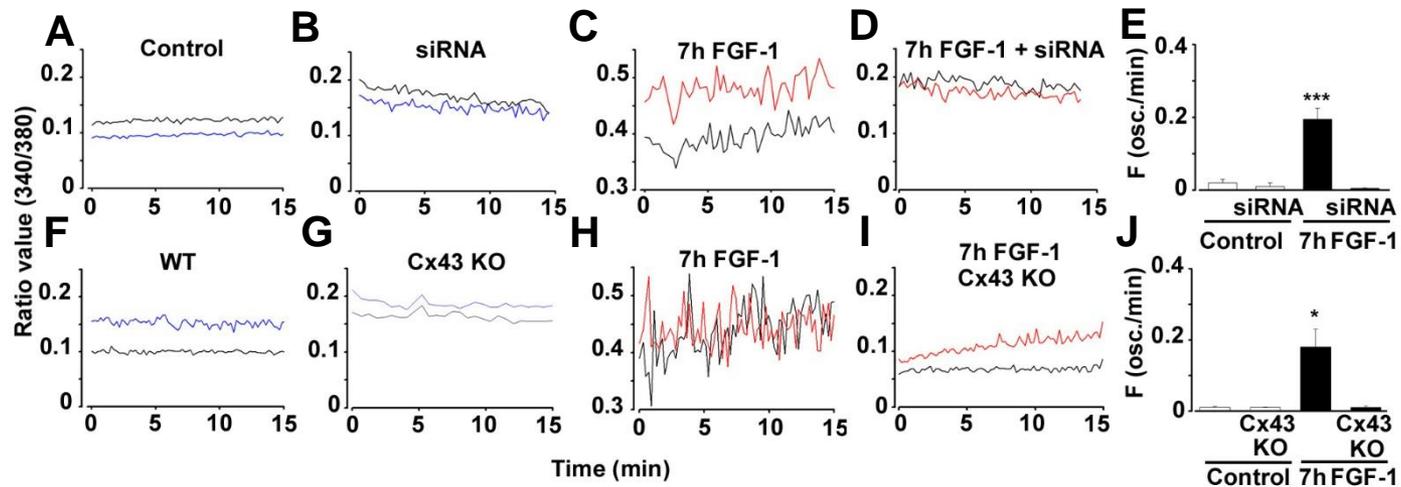


Figura 7. La reducción en la expresión de Px1 o la delección del gen que codifica para la Cx43 previno las oscilaciones de calcio inducidas por FGF-1.

Astrocytes de rata control (A) o transfectados 24 h con siRNA Px1 (B) y ratones salvajes (WT) (F) o KO Cx43 (G) no presentan oscilaciones de calcio. El tratamiento de estas células durante 7 h con FGF-1 indujo oscilaciones de calcio en astrocytes de rata y ratón (C, H). Las oscilaciones de calcio estuvieron ausentes en astrocytes de rata transfectados con siRNA Px1 (D) o en Cx43 KO de ratón (I). El gráfico de barras muestra la frecuencia, F, en astrocytes espinales de rata (E) y de ratón (J).

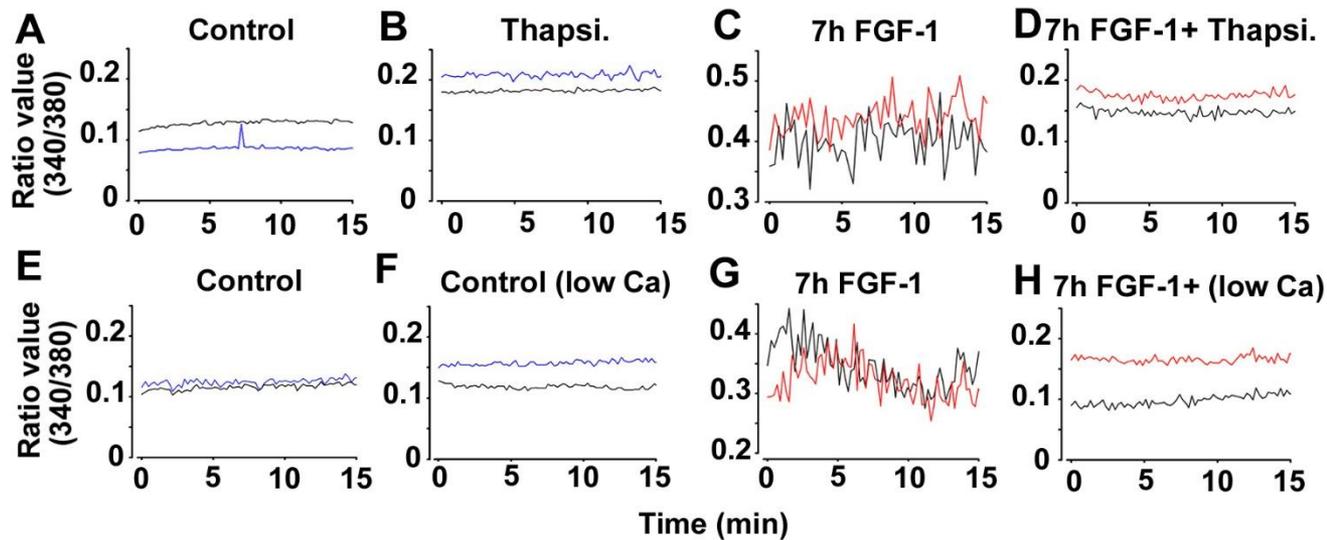


Figura 8. **Las oscilaciones en la $[Ca^{+2}]_i$ inducidas por el FGF-1 dependen de la liberación de calcio desde los sitios de almacenamiento intracelular y son sensibles a la concentración extracelular de calcio.** La inhibición de las bombas de calcio, Serca, inhibe las oscilaciones de calcio inducidas por FGF-1. Los astrocitos espinales de rata control (**A**, **E**), tratados con 1 mM thapsigargin (**B**), o en un solución extracelular con baja concentración de calcio (~10 mM) no presentan oscilaciones de calcio; el tratamiento de estas células con 7 h FGF-1 indujo oscilaciones (**C**, **G**) las cuales se inhiben por 1 mM thapsigargin (**D**) o mediante el uso de una solución extracelular de baja concentración de calcio (**H**).

Conclusiones y perspectivas

En esta tesis demostramos que el FGF-1 induce la liberación de ATP en cultivos de astrocitos y abre los Px1 HCs y los Cx43 HCs. El FGF-1 además, reduce la permeabilidad mediada por uniones en hendidura. Este fenómeno puede tener relevancia *in vivo*; ya que durante el traumatismo de la médula espinal, el FGF-1 es liberado y media la liberación de ATP. Basado en los datos obtenidos en cultivos de células, propongo que el ATP es liberado inicialmente a través de vesículas. Este proceso se vuelve regenerativo en el momento que el ATP activa los P2X₇R y estos promueven la apertura de los Px1 HCs. Luego, la apertura de Cx43 HCs contribuye a incrementar aún más la liberación de ATP. La respuesta inflamatoria inducida por el FGF-1 podría estar restringida a la médula espinal, ya que el FGF-1 no permeabiliza los astrocitos corticales en cultivos. Dado que los P2X₇R previenen la neurodegeneración secundaria luego del trauma de médula espinal, estamos estudiando si un efecto benéfico comparable puede obtenerse mediante el bloqueo de los FGFR.

La coexistencia y funcionalidad de los Px1 HCs y los Cx43 HCs se confirmó en cultivos de astrocitos obtenidos de la médula espinal de rata o ratón. Introducimos una novedosa técnica, en donde aplicamos la doble fijación de voltaje utilizada para estudiar las propiedades de las uniones en hendidura en pares de células, a hemicanales en células aisladas en cultivo. Una pipeta se utilizó en la configuración de *cell attach* para registrar la actividad del canal, y la otra en whole cell para fijar el V_m y estimular la célula. Este método permite registrar canales únicos desde células aisladas con la resolución de los parches de *cell attach*, y reduce los errores en las mediciones de las conductancias de canal único. En estas condiciones de registro, los Px1 HCs y los Cx43 HCs se diferenciaron a nivel del canal único por sus conductancias, P_o , y sensibilidad a los antagonistas de las uniones en hendidura. Los Px1 HCs mostraron una conductancia de canal única inesperadamente baja (25-50 pS).

En la última parte de esta tesis hemos estudiado de que manera variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ pueden mediar la permeabilización inicial de los astrocitos inducida por el FGF-1. La activación de la PLC por el FGFR es un primer paso que promueve la liberación de calcio desde sitios de almacenamiento intracelular, lo cual activa, con una latencia de minutos, a los receptores purinérgicos y los Px1 HCs. La activación de los receptores purinérgicos y la apertura de los Px1 HCs depende de las acciones parácrinas del ATP, y requieren del complejo proteico SNARE/SNAP-25. Proponemos que la generación de IP₃ y la liberación de calcio como señales generadas luego de la activación de la PLC promueven la liberación de ATP probablemente a través las vesículas. El

proceso de liberación de ATP opera en un bucle regenerativo mediante la apertura de P2X₇R y Px1 HCs. Horas más tarde, la probabilidad de apertura de los Cx43 HCs se incrementa, lo que permite una mayor liberación de ATP e incremento en la [Ca⁺²]_i. Luego de 7 h con FGF-1 la [Ca⁺²]_i oscila. Estas oscilaciones dependen de la liberación de ATP y requieren de la expresión de Px1 y Cx43. En esta tesis no hemos estudiado los mecanismos que abren a los Cx43 HCs en astrocitos en detalle, pero mencionamos trabajos en células que expresan la Cx43, en donde el FGF-1 o el FGF-2 pueden incrementar la permeabilización por una vía que depende de CaM quinasas o MAP38 como se discutió en los capítulos III y IV. Ambos mecanismos dependen de la movilización de calcio desde sitios de almacenamiento intracelular. La pérdida en la homeostasis de la [Ca⁺²]_i como consecuencia de la reactividad de los astrocitos puede regular la apertura de los Cx43 HCs. La evidencia en lo que tiene que ver con la regulación de los Cx43 HCs por la [Ca⁺²]_i intracelular es ambigua y necesita ser evaluada cuidadosamente en el futuro.

Agradecimientos:

Quiero agradecer a: el Dr. Michael V.L. Bennett por la invitación para desarrollar mi proyecto de tesis en el Albert Einstein College of Medicine y por aceptar dirigir esta tesis, a la Dra. Verónica Abudara por todos los comentarios y correcciones, al Dr. Feliskas Bukauskas por enseñarme valiosas técnicas de laboratorio y a la Dra. Maiken Nedergaard por la colaboración en lo que respecta a la investigación acerca del traumatismo de médula espinal.