





Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) Área Biología

# Rol de los conexones y los panexones de los pericitos hipocampales en el intercambio a través de la barrera hematoencefálica

Estudiante. MSc. Sandra Mai Morente Orientadora. Dra. Verónica Abudara

Laboratorio de Comunicación Celular Departamento de Fisiología Facultad de Medicina Universidad de la República

<u>Tribunal</u> Dres. Gustavo Brum, Juan Carlos Sáez y Paola Contreras

<u>Comisión Asesora y de Seguimiento</u> Dres. Gustavo Brum, Silvia Olivera y Nathalia Vitureira

Montevideo, Agosto del 2022

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis se la dedico a mi familia en especial a los más chiquitos, Mati, Joaco, Feli, Santi, Cata y Alfonso. A mi pareja Alberto por su soporte y apoyo durante este período de luces y sombras.

A mis padres que siempre están al firme para apoyar, escuchar y contener cada etapa. A Paty por todo!

A Verónica mi tutora por el acompañamiento, sus enseñanzas, su confianza, su ayuda y apoyo durante la realización de esta tesis y en la vida misma.

A mi amiga Matilde por tantos años de acompañamiento mutuo.

Al Beto que me escucha y me aconseja.

A Mariana por enseñarme a utilizar el microscopio confocal, por su ayuda en los experimentos con la cámara de perfusión. Por su tiempo y su escucha cuando es necesario.

A Gustavo por su confianza en el uso del microscopio, por el asesoramiento en medidas de calcio y en los experimentos en cámara de perfusión.

A mis compañeros de laboratorio, Juan, Virginia y Victoria.

A Eugenia por la colaboración en los experimentos de cultivos celulares, y a Fabiana en los experimentos de retinas aisladas.

A Andrés por recibirnos y ayudarnos en el empleo de los microscopios del Clemente.

A los integrantes de URBE en especial a Florencia por el seguimiento de las colonias de los ratones, y a Marcelo y a Mariela por la realización de las inyecciones retro-orbitales.

A Luis por su gestión con los residuos biológicos y los tanques de gases.

A Pata Lagos y su grupo por el tráfico de piques para las inmunos y por la gestión del hielo seco.

A los integrantes del tribunal por aceptar corregir la tesis.

# **APOYOS Y FINANCIACIÓN**

Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina (UdelaR), por el apoyo institucional recibido.

Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII): Sistema Nacional de Becas (Beca Doctoral Año 2016) y al Sistema Nacional de Investigadores (Candidato a Investigador Año 2020).

Comisión Académica de Postgrado- UdelaR Beca de Finalización de Doctorado (año 2019).

PEDECIBA financiación de alícuotas, fondo "Curso en el Extranjero" (año 2019) y subsidio a estudiantes afectados por la pandemia Covid-19 PEDECIBA- ANII.

Comisión Sectorial de Investigación Científica (CISC- UdelaR) por la financiación de los proyectos I+D (años 2015 y 2020) y de Iniciación a la Investigación (año 2021), a la ANII por la financiación del proyecto Fondo Clemente Estable (año 2017).







# ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
1. Barrera Hematoencefálica, Unión Neurovascular y Pericitos	
1.1- Barrera hematoencefálica y Unión neurovascular	4
1.2- Componentes de la BHE: endotelio, membrana basal y pericitos	6
1.3- Funciones de los pericitos en condiciones fisiológicas	9
1.4- Circulación cerebral y regulación del flujo sanguíneo cerebrovascular	10
1.5- Moduladores del tono contráctil pericitario	16
2. Las conexinas y las panexinas en la unión neurovascular	
2.1- Estructura y función de los canales formados por conexinas y por panexinas	19
2.2- Funciones de señalización de los conexones y los panexones	27
2.3- Canales de conexinas y panexinas en la unión neurovascular	29
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	
2.1. Hipótesis de trabajo	38
2.2. Objetivo general	38
2.3. Objetivos Específicos	38
3. MATERIALES y MÉTODOS	
3.1- Animales	41
3.2- Consideraciones éticas	42
3.3- Reactivos y sales	43
3.4- Gases	45
3.5- Obtención de rodajas agudas de hipocampo	45
3.6- Identificación de los pericitos con TO-PRO <sup>TM</sup> -3 Iodide ( $624/661$ ) en rodajas de hipocampo	46

3.7- Técnicas de inmunofluorescencia	47
3.8- Marcaje de los vasos sanguíneos	49
3.9- Técnica de captación de Etd <sup>+</sup> en rodajas agudas de hipocampo	50
3.10- Captación de Etd <sup>+</sup> por los pericitos hipocampales en ratones despiertos en condiciones de comportamiento libre	52
3.11- Evaluación del rol de los panexones en la regulación del calibre capilar	53
3.12- Obtención de imágenes mediante microscopia confocal y análisis de resultados	53
3.13- Test de Reconocimiento de objetos novedosos (NOR Test)	57
3.14- Representación de resultados y análisis estadístico	58

## 4. RESULTADOS OBTENIDOS

4.1- Identificación de pericitos cerebrales con el fluoróforo TO-PRO-3 Iodide (642/661) 59

4.2- Los pericitos pericapilares del hipocampo captan el trazador Etd<sup>+</sup> en condiciones de reposo a través de canales de gran poro 60

4.3- En condiciones basales, los panexones median el ingreso de Etd<sup>+</sup> a los pericitos pericapilares en rodajas agudas de hipocampo 63

4.4- Los pericitos hipocampales captan Etd<sup>+</sup> a través de panexones funcionales en ratones despiertos en condiciones de comportamiento libre (ensayo in vivo) 68

4.5- La liberación de ATP endógeno sustenta el intercambio mediado por canales de Px1 entre los pericitos y su microentorno en condiciones basales 70

4.6- En condiciones basales, la activación de receptores purinérgicos ionotrópicos  $P2X_7$  y metabotrópicos  $P2Y_6$  subyace el intercambio pericitario con el entorno vía panexones 71

4.7- La activación de receptores glutamatérgicos (AMPA y NMDA) se asocia a una disminución del intercambio pericito - fluido cerebral por el cierre de panexones 76

4.8- Los agentes vasoconstrictores ATP y norepinefrina generan un aumento del intercambio de los pericitos con el entorno por apertura de canales de gran poro formados de Px1 80

4.9- Los agentes vasodilatadores Acetilcolina y PGE<sub>2</sub> generan disminución del intercambio de los pericitos con el entorno mediante el cierre de panexones 84

4.10- La modulación del diámetro capilar cerebral por el neurotransmisor glutamato y por los agentes vasoactivos (ATP, norepinefrina y acetilcolina) requiere de la expresión funcional de panexones pericitarios 86

4.11- Ensayo de reconocimiento de objeto novedoso(Test NOR) 94

## 5. DISCUSIÓN

5. 1- Los pericitos se identifican con el marcador nuclear fluorescente TO-PRO-3 Iodide (642/661)

5.2- En condiciones basales, los pericitos expresan panexones funcionales que median una vía de intercambio con el microentorno, siendo el mediador ATP y la activación de los receptores  $P2X_7 y$  $P2Y_6$  fundamentales para esta transferencia 101

5.3- La activación de receptores glutamatérgicos y los agentes vasodilatadores disminuyen el intercambio de los pericitos con el microentorno por el cierre de canales de Px1, efecto que se asocia a dilatación capilar 104

5.4- Los agentes vasoconstrictores ATP y NE incrementan la permeabilidad de la membrana pericitaria por activación de panexones, generando contracción capilar 109

5.5- Los panexones pericitarios se encuentran implicados en los procesos de aprendizaje y memoria en el animal vivo 115

6. CONCLUSIÓN	117
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
8. ANEXO 1	
8.1- Componentes de la BHE: endotelio y membrana basal	140

8.2- La relación de los pericitos con las células vecinas: endotelio y astrocitos 141

8.3- Resultados Suplementarios: Inmuno-fluorescencia para la conexina 43 y el receptor P2X<sub>7</sub>
en pericitos
143

8.4- Publicaciones derivadas de esta tesis	144
--	-----

97

98

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Esquema de la Unidad Neurovascular	5
Figura 2- Representación esquemática de los pericitos en diferentes niveles del lecho capilar	7
Figura 3- Estructura y organización de conexinas y panexinas, formando canales transmembrana: conexones y panexones	23
Figura 4- Mecanismos de activación y liberación de ATP por conexones y panexones	26
Figura 5- Mecanismos parácrino y autócrino de liberación de ATP inducida por ATP	29
Figura 6- Validación de la medición del calibre capilar interno con campo claro o contraste interferencia diferencial (DIC) y con fluorescencia	de 56
Figura 7- Los pericitos pericapilares de las rodajas agudas de hipocampo captan el trazador Etd <sup>+</sup> en condiciones basales	62
Figura 8- Los panexones median el ingreso de Etd <sup>+</sup> a los pericitos desde el medio extracelular en rodajas agudas de hipocampo	65
Figura 9- Expresión de panexinal en pericitos (P), endotelio (E) y neuronas (N) de la capa CA1 en rodajas de hipocampo provenientes de cepas de ratones salvajes (WT), ratones controles de los condicionales (Panx1 <sup>fl/fl</sup> CRE <sup>-</sup> ), ratones condicionales para panexinal en pericitos (Panx1 <sup>fl/fl</sup> CRE <sup>+</sup> ) y ratones knockout totales para panexinal (KO Panx1 <sup>-/-</sup> )	67
Figura 10- Los pericitos del hipocampo incorporan el trazador Etd <sup>+</sup> desde el torrente sanguír mediante panexones en condiciones <i>in vivo</i> .	neo 69
Figura 11- El intercambio mediado por panexones entre los pericitos y su entorno en condicion basales, requiere de la liberación de ATP endógeno y la activación de receptores purinérgio ionotrópicos $P2X_7$ ( $P2X_7r$ ) y metabotrópicos $P2Y_6$ ( $P2Y_6r$ )	nes cos 73
Figura 12- El neurotransmisor excitatorio glutamato, a través de la activación de los receptor NMDA y AMPA, genera una disminución del intercambio de los pericitos con el medio extracelu mediado por panexones	res 1lar 78
Figura 13- El agente vasoconstrictor ATP activa panexones pericitarios en rodajas agudas de hipocampo	81
Figura 14-El vasoconstrictor noradrenalina (NE) aumenta la captación de Etd <sup>+</sup> por los pericipericapilares a través de panexones de manera concentración dependiente	itos 83
Figura 15- Los agentes vasodilatadores Acetilcolina (ACh) y Prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) inducen u disminución de la permeabilidad de la membrana pericitaria mediada por el cierre de panexones	una 85
Figura 16- Los panexones pericitarios median las variaciones del diámetro capilar inducidas por	

el neurotransmisor glutamato

Figura 17- Los panexones pericitarios median las variaciones del diámetro capilar inducidas por los agentes vaso-activos ACh, NE y ATP 91

Figura 18- El ATP modula el calibre capilar en rodajas agudas hipocampales derivadas de ratones controles de los condicionales (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>-</sup>) tratados con tamoxifeno 93

Figura 19- La expresión de la Px1 en los pericitos es necesaria para el reconocimiento de objeto novedoso (NOR-Test) 95

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1- Información sobre los reactivos y las sales que se emplearon en esta tesis	43
Tabla 2- Información sobre los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmuno- marcaje	48
Tabla 3- Coeficiente de captación de $Etd^+$ por los pericitos (Media ± S.E.M.) en presencia de los inhibidores genéricos y específicos de los panexones, conexones y uniones gap	66
Tabla 4- Coeficiente de captación de Etd <sup>+</sup> por los pericitos (Media ± S.E.M.) en presencia de apirasa e inhibidores genéricos de receptores purinérgicos	74
Tabla 5- Coeficiente de captación de Etd <sup>+</sup> por los pericitos (Media $\pm$ S.E.M.) en presencia de inhibidores específicos de receptores purinérgicos de tipo P2X <sub>7</sub>	74
Tabla 6- Coeficiente de captación de Etd <sup>+</sup> por los pericitos (Media $\pm$ S.E.M.) en presencia de un inhibidor específico de los receptores purinérgicos de tipo P2Y <sub>6</sub>	75
Tabla 7- Coeficiente de captación de Etd <sup>+</sup> por los pericitos (Media ± S.E.M.) en presencia de los agonistas de los receptores glutamatérgicos excitatorios: glutamato, NMDA y AMPA	79
Tabla 8-Coeficiente de captación de Etd <sup>+</sup> por los pericitos (Media ± S.E.M.) en presencia de los antagonistas de los receptores glutamatérgicos excitatorios	79
Tabla 9- Coeficiente de captación de $Etd^+$ por los pericitos (Media ± S.E.M.) en presencia de dosis crecientes del agente vasoactivo ATP	82
Tabla 10- Coeficiente de captación de $Etd^+$ por los pericitos (Media ± S.E.M.) en presencia de múltiples dosis del agente vasoconstrictor norepinefrina	83
Tabla 11- Coeficiente de captación de $Etd^+$ por los pericitos (Media $\pm$ S.E.M.) en presencia del agente vasodilatador acetilcolina	86
Tabla 12- Coeficiente de captación de $Etd^+$ por los pericitos (Media $\pm$ S.E.M.) en presencia del agente vasodilatador prostaglandina $E_2$	86
Tabla 13- Medida del diámetro capilar (Media ± S.E.M) a distintas distancias desde el centro	
del pericito en ratones salvajes en condición control y en presencia de glutamato	89
Tabla 14- Medida del diámetro capilar (Media ± S.E.M) a distintas distancias desde el centro	

del pericito en ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>fl/fl</sup>/CRE<sup>+</sup>) en condición control y en presencia de glutamato

Tabla 15- Variación del diámetro capilar (Media  $\pm$  S.E.M) a 15µm del soma pericitario y en la región adyacente al centro del pericito (0-5µm) del mismo, en ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>fl/fl</sup>/CRE<sup>+</sup>) en condición control y en presencia de glutamato 89

Tabla 16- Medida del diámetro capilar (Media  $\pm$  S.E.M) a distintas distancias desde el centro delpericito en ratones salvajes en condición control y en presencia de agentes vasoactivos92

Tabla 17- Medida del diámetro capilar (Media  $\pm$  S.E.M) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones condicionales para la Px1 pericitaria condición control y en presencia de agentes vasoactivos 92

Tabla 18- Variación del diámetro capilar (Media  $\pm$  S.E.M) a 15µm del soma pericitario y en la región adyacente al centro del pericito (0-5µm) del mismo, en ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>fl/fl</sup>/CRE<sup>+</sup>) en condición control y en presencia de ACh, NE y ATP 92

Tabla 19- Medida del diámetro capilar (Media  $\pm$  S.E.M) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones controles de los condicionales para la Px1 pericitaria, en condición control y en presencia de ATP 93

Tabla 20- Índice de discriminación de un objeto familiar o novedoso (Media  $\pm$  S.E.M) en ratonescontroles de los condicionales para la Px1 y ratones condicionales de la Px1 pericitaria95

## **ABREVIACIONES**

α-SMA- Actina del músculo liso ACh-Acetilcolina ACSF- Solución de líquido cefalorraquídeo artificial Actina F (F-actina)- Actina filamentosa AMPA- Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico Apy- Enzima apirasa ATP- Adenosín 5'-trifosfato BHE- Barrera Hematoencefálica Cx- Conexina Etd<sup>+</sup>- Bromuro de Etidio FS- Flujo Sanguíneo FSC- Flujo Sanguíneo Cerebral Glut-Glutamato ko Panx o Px (Panx1 -/-)- ratón knock out total/global para la panexinal NE- Norepinefrina o Noradrenalina NG2- Proteoglicano neuronal-glial condroitín sulfato 2 NMDA- N-metil-D-aspartamo NO- Óxido Nítrico Panx o Px- Panexina Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>- Ratón condicional para la panexina1 pericitaria Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre- Ratón control del condicional para la panexina1 pericitaria PDGFR-β- Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas PGE<sub>2</sub>- Prostanglandina E<sub>2</sub> SNC- Sistema Nervioso Central SN- Sistema Nervioso UNV- Unión Neurovascular

### RESUMEN

En el cerebro, los pericitos pericapilares actúan como iniciadores del acoplamiento neurovascular y reguladores del diámetro capilar en respuesta a la actividad neuronal. Acorde a estas funciones, los pericitos expresan proteínas contráctiles y responden a un gran número de moléculas vasoactivas y neuro-glio-transmisores. Los canales de membrana formados por conexinas (conexones) y panexinas (panexones) emergen como vías dinámicas para la interacción neuro-glio-vascular. Estos canales poseen un gran poro central que permite el ingreso de iones y trazadores, y la liberación de ATP. El mediador ATP regula el estado funcional de los pericitos mediante activación de receptores purinérgicos catiónicos P2X y/o metabotrópicos P2Y, generando aumento de calcio intrapericitario. En otros tipos celulares, los purino-receptores activan la apertura de los panexones. A la fecha no se ha reportado la existencia de canales de gran poro formados de conexinas y/o panexinas funcionales en los pericitos.

Esta tesis propone que los pericitos expresan conexones y/o panexones funcionales quienes, al sensar cambios en las necesidades neuro-metabólicas responderían regulando su estado funcional. Esto resultaría en variaciones en la liberación de ATP al medio externo, en el nivel de calcio intrapericitario y del tono contráctil pericitario que desencadenarían ajustes del calibre capilar, del flujo sanguíneo y de la permeabilidad de la barrera hematoencefalica a nivel de la microvasculatura.

Los objetivos de esta tesis consistieron en: (1) desarrollar una metodología de identificación y caracterización de los pericitos en el árbol capilar del hipocampo del ratón, (2) determinar si los pericitos pericapilares expresan canales de gran poro funcionales y establecer su naturaleza molecular, (3) identificar los mediadores y las vías de regulación de estos canales en condiciones basales, (4) determinar si la funcionalidad de los canales de gran poro de los pericitos se modula por el neurotransmisor excitatorio glutamato y (5) por agentes vasodilatadores y constrictores, (6) establecer las implicancias de estos canales pericitarios sobre la regulación del calibre capilar y (7) sobre la performance cognitiva. Para responder estas interrogantes, se realizaron ensayos de captación de colorantes, aproximaciones farmacológicas, genéticas (mediante el empleo de ratones *knock-out* totales y condicionales para la Px1), funcionales, imagenológicas, detecciones inmunes y ensayos de reconocimiento de objetos novedosos.

Inicialmente, demostramos que el fluoróforo TO-PRO-3 (642/661) actúa como un marcador específico de los pericitos del sistema nervioso cuando se aplicó en tejido vivo. La especificidad del TO-PRO-3 por los pericitos se confirmó frente a los marcadores clásicos de la membrana pericitaria NG2 y PDGFrB, y la sonda NeuroTrace (500/525). El ingreso de TO-PRO-3 a los pericitos fue independiente de conexones y/o panexones, pero resultó altamente sensible a la temperatura sugiriendo que su incorporación podría estar mediada por transporte activo y mostró saturación. Además, un subgrupo de pericitos marcados con TO-PRO-3 expresó la proteína α-SMA indicativo de su capacidad contráctil. Por otra parte, determinamos que los pericitos pericapilares del hipocampo de ratón expresaron canales de gran poro formados por Px1, denominados panexones. En situación basal, los panexones pericitarios se encontraron funcionales mediando una vía de intercambio entre los pericitos y el medio extracelular cerebral tanto en condiciones de vida libre (in vivo) como en las rodajas agudas de hipocampo (ex vivo). El mantenimiento del intercambio pericitario mediado por panexones, dependió del ATP extracelular y de la activación de los receptores pericitarios purinérgicos ionotrópico P2X<sub>7</sub> y metabotrópico P2Y<sub>6</sub>. El neurotransmisor glutamato y el agente vasodilatador acetilcolina (ACh), disminuyeron el intercambio de los pericitos mediado por panexones efecto que se asoció con un aumento del calibre capilar (vaso-relajación). La disminución de la actividad de los panexones pericitarios en presencia de glutamato fue dependiente de la concentración y requirió de la activación de los receptores de tipo AMPA y NMDA y de un tipo celular diferente al pericito. Los agentes vasoconstrictores ATP y norepinefrina (NE), generaron un aumento del intercambio de los pericitos con el medio externo por activación de panexones que se acompañó de una disminución del calibre capilar (vaso-constricción). El incremento de la funcionalidad de los panexones pericitarios por el ATP fue concentración-dependiente presentando un máximo (0.1mM) para luego disminuir ( $\geq 0.15$ mM). El efecto de la NE también fue concentración-dependiente presentando saturación a concentraciones mayores a 0.015mM. La regulación del calibre capilar por el glutamato y de los agentes vasoactivos (ACh, NE y ATP) requirió de la expresión pericitaria de canales de panexina (Px1) funcionales. Finalmente, determinamos que los panexones pericitarios fueron fundamentales para el reconocimiento de objetos novedosos por el animal vivo.

En conjunto, esta tesis presenta un mecanismo novedoso de señalización autócrina/parácrina donde los panexones funcionales y los receptores purinérgicos pericitarios son vías activas en condiciones basales. Los panexones pericitarios emergen como reguladores neuro-metabólicos para acoplar variaciones del diámetro capilar con la activación neuronal, en presencia de los agentes vasoactivos y durante la ejecución de procesos cognitivos. Futuros ensayos serán necesarios para elucidar las implicancias funcionales de los panexones pericitarios en el animal vivo en el control de la resistencia microvascular, el flujo sanguíneo capilar cerebral, y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en condiciones fisiológicas y patológicas. En condiciones patológicas del sistema nervioso central, los panexones pericitarios pueden abrirse o cerrarse, promoviendo contracción/dilatación capilar; en la red capilar esto podría impactar en el intercambio a través de la barrera hematoencefálica y en la viabilidad del cerebro donde la Px1 pericitaria tendría tanto un rol deletéreo como neuro-protector.

# **INTRODUCCIÓN**

#### 1. Barrera hematoencefálica, unión neurovascular y pericitos

#### 1.1- Barrera hematoencefálica, Unión neurovascular

El control preciso de la composición del entorno neural y del microambiente iónico es fundamental para la homeostasis neural y la señalización neuronal (Abbott et al., 1992). El microambiente neural es regulado por la barrera hematoencefálica (BHE), una barrera de difusión esencial para el normal funcionamiento del Sistema Nervioso Central (SNC) (Ballabh et al., 2004). La BHE juega un papel clave en el control del intercambio de sustancias entre la circulación y el parénquima cerebral (Brown et al., 2019). Específicamente, su función principal es regular el pasaje de nutrientes, metabolitos, iones, neurotransmisores, macromoléculas, proteínas, sustancias químicas y neurotóxicas, fármacos, y patógenos (Bonkowski et al., 2011; Brown et al., 2016). La BHE se coloca centralmente dentro de la unidad neuro-vascular (UNV) en los capilares cerebrales y a lo largo del eje arterio-venoso en la interfaz entre la sangre y el cerebro (Sweeney et al.,2019). La BHE está presente en los capilares de casi todas las regiones del cerebro, excepto en núcleos específicos adyacentes al tercer y cuarto ventrículo, órganos circunventriculares, área postrema, eminencia media, neurohipófisis, glándula pineal, órgano subfornical y lámina terminalis (Abbott et al., 2010; Ballabh et al., 2004; Sweeney et al., 2016). Las células endoteliales, la membrana basal y los pericitos (embebidos la membrana basal) constituyen los componentes anatómicos de la BHE (Ballabh et al., 2004; Bonkowski et al., 2011; Hamilton, 2010). La BHE, más que una barrera pasiva es un complejo metabólico activo, con múltiples bombas, transportadores, receptores de neurotransmisores y citoquinas (Ballabh et al, 2004). Las propiedades de la BHE que permiten regular el traspaso de sustancias se pueden agrupar en: 1-barreras físicas, formadas por uniones estrechas entre las células endoteliales que impiden el flujo a través de la hendidura intercelular y la vía paracelular, 2- mecanismos de transporte específicos, que mantienen el intercambio y el flujo de solutos; y 3-barreras metabólicas, que permiten la transferencia de nutrientes tales como el oxígeno y la glucosa al cerebro desde la sangre, y de dióxido de carbono desde el cerebro al plasma (Abbott et al., 1992) o de otras moléculas que deben ser metabolizadas (Abbott et al., 2010; Daneman & Prat, 2015).

La BHE forma parte de la UNV (tal como se esquematiza en la Figura 1). Esta estructura tiene un rol muy importante en el mantenimiento y el control de la función cerebral, particularmente en la regulación del flujo sanguíneo cerebral (FSC) y en la formación de la BHE (Brown et al., 2019). Las células de la UNV se adaptan a los cambios del entorno y toman decisiones para mantener la homeostasis y promover la sobrevida del tejido (Armulik et al., 2011; Bonkowski et al., 2011). La UNV comprende: las células endoteliales, las células perivasculares murales [pericitos en los capilares cerebrales, vénulas y arteriolas precapilares y células de músculo liso vascular (VSMC) en arteriolas, arterias pequeñas y venas], las células gliales [astrocitos, microglía y oligodendrocitos], neuronas e interneuronas (Brown et al., 2019; McConnell et al., 2017; Sweeney et al., 2016).



Figura 1- Esquema de la Unidad neurovascular. (A) A nivel arteriolar se observan anillos de músculo liso rodeando las arteriolas, en cambio, en los capilares los pericitos envían procesos a lo largo y ancho de la microvasculatura sin cubrirla totalmente. (B) Los pericitos se adosan a la parte externa de las células endoteliales y se separan de estas y del parénquima por la membrana basal. Los pies astrocitarios y las terminales nerviosas se asocian íntimamente con los capilares formando la UNV. Adaptado de (Hamilton et al.,2010).

#### 1.2-Componentes de la BHE: endotelio, membrana basal y pericitos

A continuación, se desarrolla una descripción detallada de los pericitos, células de interés de esta tesis. En el Anexo 1 se describen las células endoteliales, la membrana basal y la relación de los pericitos con las células vecinas.

#### Los pericitos

Los pericitos fueron descritos por su morfología como una población de células aisladas fusiformes pericapilares por el científico francés Rouget en 1873, por lo que se denominaron como células de Rouget (Rouget C., 1873; Armulik et al., 2011; Bonkowski et al., 2011; Krueger & Bechmann, 2010). En el desarrollo embrionario se originan a partir de células madre mensenquimales y células de la cresta neural derivadas del neuroectodermo (Bonkowski et al, 2011; Krueger et al, 2010). En los capilares del sistema nervioso central, los pericitos están embebidos en una doble membrana basal (MB) (Armulik et al., 2011; Bonkowski et al., 2011; Mathiisen et al., 2010), entre las células endoteliales, los pies astrocitarios y las neuronas parenquimatosas (Armulik et al, 2011; Bonkowski et al, 2011; Krueger & Bechmann, 2010). Los pericitos presentan un soma fusiforme con un núcleo predominantemente central; desde el soma se originan proyecciones citoplasmáticas primarias (Armulik et al., 2011, Bonkowski et al., 2011) que se extienden longitudinalmente sobre la superficie del tubo endotelial de la pared abluminal capilar (Figura 2; y paper anexo Mai-Morente et al., 2021). En los puntos de ramificación capilar que comúnmente albergan al soma pericitario, los procesos primarios a menudo se disponen a lo largo de cada rama confiriendo una forma celular de "Y". A partir de las proyecciones primarias se generan prolongaciones secundarias perpendiculares a las primarias más delgadas que rodean circunferencialmente los capilares (Armulik et al., 2011; Bonkowski et al., 2011; Díaz-Flores et al., 2009; Hartmann et al., 2015). Se han descrito tres tipos diferentes de pericitos de acuerdo a, su localización, su función y la expresión de la proteína contráctil actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA), a saber: (1) precapilares (peri-arteriolares), (2) capilares (lecho-medio) y (3) post-capilares (venulares) (Figura 2). Los pericitos próximos a las arteriolas y vénulas presentan mayor expresión de  $\alpha$ -SMA y mayor cantidad de procesos circunferenciales (secundarios); se los ha vinculado con la regulación del flujo sanguíneo cerebrovascular debido a su capacidad contráctil (Alarcon-Martinez et al., 2018; Attwell et al., 2010; Bandopadhyay et al., 2001; Bell et al., 2010; Fernández-Klett & Priller, 2015; Grant et al., 2019; Hamilton, 2010; Hartmann et al., 2015; Hartmann et al., 2021; Hill et al., 2015; Nehls & Drenckhahn, 1991). En el lecho medio capilar donde se produce el intercambio de gases y de metabolitos a través de la BHE, los pericitos expresan menor (o nula) cantidad de α-SMA que los pericitos peri-arteriolares (Alarcon-Martinez et al., 2018; Bandopadhyay et al., 2001; Kamouchi et al., 2004; Lebeux & Willemot, 1978), y algunos reportes niegan la expresión de esta proteína contráctil (Damisah et al., 2017; Grant et al., 2019; Grutzendler & Nedergaard, 2019; Hill et al., 2015; Hill & Grutzendler, 2019; Tong et al., 2021). A nivel precapilar, Hartmann et al., describieron células híbridas "músculo liso-pericito" que colindaban con los pericitos de la malla capilar. Los cuerpos celulares ovoides de las células híbridas son similares a los de los pericitos clásicos del lecho capilar (Hartmann et al., 2015; Hartmann et al., 2021). En la Figura 2 se esquematizan los distintos tipos de pericitos según su posición en el árbol vascular (Attwell et al., 2016; Hartmann et al., 2015).



Figura 2- Representación esquemática de los pericitos en diferentes niveles del lecho capilar. A nivel arterial se esquematiza la presencia de células musculares lisas (SMC), en las arteriolas células híbridas (SMC-pericitos), a nivel capilar y venular post-capilar se describe la presencia de pericitos y a nivel venoso SMC. Adaptado de Hartmann et al., 2015 y Attwell et al., 2015.

La densidad pericitaria varía en cada órgano dependiendo de las propiedades de la barrera endotelial (cerebro>hígado>músculo) y del recambio de células endoteliales (mayor cobertura de pericitos en células con menor recambio) (Armulik et al., 2011). Si bien los pericitos están presentes en la mayoría de los tejidos del organismo, se estima que su densidad es mayor en la retina y en el cerebro respecto de los otros órganos (Frank et al., 1987; Shepro & Morel, 1993). Datos recientes muestran que el nivel de cobertura capilar por los pericitos en el cerebro depende de su morfología, sus prolongaciones y del territorio vascular siendo máximo (95%) para pericitos precapilares y mínimo (51%) para pericitos en la red de capilares de pequeño diámetro (Attwell et al., 2016; Dalkara & Alarcon-Martinez, 2015; Grant et al., 2019).

Identificación pericitaria

Para investigar las funciones de los pericitos en condiciones fisiológicas y patológicas su identificación es fundamental; a la fecha el reconocimiento de estas células murales continúa siendo objeto de estudio. Clásicamente, los pericitos se reconocen mediante inmunomarcaje según la expresión de los antígenos de superficie el proteoglicano neuroglial condroitín sulfato 2 (NG2) y el receptor beta del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFrβ) (Hartmann et al., 2015; Lindahl et al., 1997; Ozerdem & Stallcup, 2003; Smyth et al., 2018). Sin embargo, los antígenos PDGFrβ y NG2 no son totalmente específicos pues se expresan también en las células del músculo liso vascular y en las líneas progenitoras de oligodendrocitos (He et al., 2016; Nishiyama et al., 2009). La desmina y la aminopeptidasa N (CD13), constituyen marcadores pericitarios que también se expresan en las células vasculares (Armulik et al., 2010; Jung et al., 2018; Smyth et al., 2018). En el futuro, la identificación de genes exclusivamente expresados por los pericitos podría dar claves para diferenciar pericitos de las células de músculo liso vascular (Bondjers et al., 2006; Chasseigneaux et al., 2018; He et al., 2016; Vanlandewijck et al., 2018). En los últimos años, se ha extendido el uso de líneas de ratones transgénicos que permiten la visualización de los pericitos por la expresión de marcadores fluorescentes asociados a los promotores de los genes del NG2 y del PDGFrß, en condiciones ex vivo e in vivo (Hartmann et al., 2015; Jung et al., 2018; Mishra et al., 2014). Sin embargo, el costo del mantenimiento de las colonias constituye una desventaja para su empleo generalizado, fundamentalmente en aquellos estudios que emplean varias cepas de ratones transgénicos. Por otra parte, en el año 2017 se describió que la sonda fluorescente NeuroTrace (500/525) (empleada habitualmente para identificar neuronas en el tejido fijado) es selectivamente incorporada por los pericitos capilares cerebrales cuando se administra in vivo; además, este fluoróforo no marca las VSMCs (Damisah et al., 2017). Estudios previos de Lacar et al., determinaron que el fluoróforo nuclear TOPRO-3 Iodide (642/661), también es selectivamente captado por los pericitos perivasculares de la zona subventricular postnatal cuando se aplica a rodajas vivas de cerebro, permitiendo realizar estudios imagenológicos en pericitos vivos (Lacar et al., 2012). El TOPRO-3 es un monómero de carbo-cianina con mayor afinidad por el ADN que por el ARN y se utiliza habitualmente en preparaciones fijadas para marcación nuclear y para cuantificar el contenido relativo de DNA (De Mazière et al., 1996; Suzuki et al., 1997; Van Hooijdonk et al., 1994). La identificación y la caracterización de pericitos marcados por TOPRO-3 en rodajas agudas de hipocampo fue el primer objetivo de esta tesis dando origen a las publicaciones que se anexan (Mai-Morente et al., 2020; Mai-Morente et al., 2021).

#### 1.3- Funciones de los pericitos en condiciones fisiológicas

Se han determinado múltiples funciones para los pericitos en el cerebro (Sweeney et al., 2016) dentro de las que se encuentran: 1- angiogénesis y neovascularización: los pericitos intervienen en la migración, el crecimiento y el desarrollo de las células endoteliales (Gaengel et al., 2009) dirigiendo la migración endotelial ("sprouting") para formar nuevos vasos y estabilizar la pared vascular (Ribatti et al., 2011). A nivel capilar, además de controlar el ciclo celular de las células endoteliales, los pericitos contribuyen directamente en la formación de la membrana basal que envuelve al endotelio y a los pericitos (Song et al., 2005), 2- diferenciación y mantenimiento de la BHE: mediante la liberación de factores de señalización los pericitos regulan el número de uniones estrechas entre las células endoteliales y dirigen la polarización de los pies astrocitarios. La reducción en el número de pericitos causa una pérdida de estas uniones entre las células endoteliales lo que lleva a una mayor permeabilidad de la BHE (Sengillo et al., 2013). Además, los pericitos controlan el movimiento de sustancias entre el torrente sanguíneo y el parénquima cerebral (Ma et al., 2018; Armulik et al., 2011; Brown et al., 2019; Dalkara et al., 2011; Hamilton, 2010); 3actividad neuroinflamatoria: si bien la primera línea de defensa en el SNC es llevada a cabo por microglía, astrocitos y leucocitos infiltrados, se ha determinado que los pericitos son capaces de fagocitar células, responder a moléculas inflamatorias y citoquinas, actuar como células presentadoras de antígenos y reclutar y promover la extravasación de células inmunes hacia el parénquima cerebral (Jansson et al., 2014; Rustenhoven et al., 2016); 4-diferenciación celular: los pericitos son considerados células madres mesenquimales que actúan como células pluripotenciales, y se diferencian en múltiples tipos celulares, tales como angioblastos, progenitores neurales, células vasculares, células neuronales, gliales y microglía (Dore-Duffy, 2008; Nakagomi et al., 2015; Özen et al., 2012; Farahani et al., 2019); 5- regulación del flujo sanguíneo capilar y de la microcirculación capilar. Esta función de los pericitos se describe con mayor detalle en las próximas secciones de esta tesis.

#### 1.4- Circulación cerebral y regulación del flujo sanguíneo cerebrovascular

#### Reseña anatómica del sistema vascular

El sistema vascular está compuesto por diferentes segmentos incluyendo arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas. En el cerebro, grandes arterias piales transcurren paralelas a la superficie cortical, las mismas presentan múltiples capas de células del músculo liso vascular. La membrana basal endotelial separa al endotelio de las capas de SMCV que están envueltas por la pía. A este nivel los pies terminales astrocitarios forman la glía limitante y entre ella y la pía se genera un espacio llamado de Virchow-Robin. Las arterias piales se ramifican en forma perpendicular en arteriolas penetrantes, las cuales ingresan al parénquima cerebral; en las arteriolas penetrantes una única capa de VSMC envuelve al endotelio (Sweeney et al., 2016). Estas arteriolas parenquimatosas se ramifican en la red capilar y ascienden formando las vías venulares que desembocan en las venas piales. La microvasculatura consiste en la red capilar localizada entre las arteriolas y las vénulas, y juega un papel central en el control del suministro de sangre y, por lo tanto, de nutrientes a los tejidos (Blinder et al., 2010). Los capilares constituyen microvasos de menos de 10 micras de diámetro, que no presentan una capa continua de músculo liso; están rodeados por pericitos los cuales envían procesos a lo largo y ancho de la microvasculatura sin cubrirla totalmente y son los responsables de regular el diámetro capilar (Hamilton et al., 2010, Hall et al., 2014). A nivel capilar, los pericitos y las células endoteliales comparten membrana basal y exhiben diferentes tipos de conexiones celulares (ver Anexo-1). Tanto la pared de los vasos arteriolares como capilares están cubiertos por pies astrocitarios y reciben inervación neuronal (Sweeney et al., 2016).

#### Hiperemia funcional y acoplamiento neurovascular

El SNC que constituye el 2% de la masa corporal, presenta una demanda metabólica continua. Esta demanda es mantenida por el flujo sanguíneo cerebral (FSC) que representa el 15% del gasto cardíaco total. Se estima que el 20% de la energía en reposo corporal (~20% del consumo de  $O_2$  y ~ 25% de la utilización de glucosa) se destina para nutrir el cerebro y fundamentalmente para revertir los flujos iónicos y restaurar la generación de potenciales sinápticos y de acción durante la actividad neuronal (Attwell & Laughlin, 2001; Muoio et al., 2014; Nippert et al., 2018). Evolutivamente, los

mecanismos de autorregulación garantizan una perfusión continua en el SNC (Nippert et al.,2018). La autorregulación se define como el conjunto de procesos homeostáticos que conserva el tono vascular macroscópico (Iadecola, 1993). De esta forma se mantiene constante el flujo sanguíneo cerebral en un rango variable de presiones garantizando un adecuado suministro de oxígeno y nutrientes (Armstead, 2016; Duchemin et al., 2012; Nippert et al., 2018). En el individuo humano adulto estos rangos operan entre los 50-150 mm Hg para la presión de perfusión cerebral o entre 60-160 mm Hg para la presión arterial media (Armstead, 2016).

Cuando aumenta la actividad en una zona cerebral, el flujo sanguíneo (FS) local en esa región se eleva para incrementar el aporte de glucosa y oxígeno a estas zonas activas del SNC que experimentan un aumento de la demanda metabólica. Este aumento del flujo sanguíneo local en respuesta a la actividad neuronal (que ocurre en el rango de segundos) se denomina hiperemia funcional (Nippert et al., 2018) y fue descrita inicialmente en 1890 por Roy y Sherrington. En las zonas cerebrales menos activas o "en reposo", el FS es menor que en las áreas activas. A este acoplamiento entre la actividad neuronal y el flujo sanguíneo, se lo conoce como acoplamiento neuro-vascular (Filosa, 2010; Filosa et al., 2016; Gordon et al., 2008; Muoio et al., 2014). En este sentido, aumentos o disminuciones en el FS se acompañan de incrementos o decrementos en el metabolismo de oxígeno (metabolismo oxidativo) y en el consumo de glucosa; el acoplamiento entre estos y la actividad sináptica se conoce como acoplamiento neuro-metabólico. Las variaciones son proporcionales para el FS y el consumo de glucosa, pero no para el consumo del oxígeno que es menor en relación con los primeros. La estrecha relación entre la variación en la utilización de glucosa y el FS se encuentra en la base de las técnicas imagenológicas funcionales tales como la tomografía por emisión de positrones (PET) (Sokoloff et al., 1977), mientras que, variaciones en los niveles de oxigenación de hemoglobina cerebral subyacen la imagenología por resonancia magnética funcional (fMRI) (Raichle, 1998).

En resumen, la actividad neuronal regula el flujo sanguíneo cerebral para adecuar el aporte de oxígeno y glucosa a las necesidades metabólicas. La hiperemia funcional debe involucrar al menos tres eventos con precisión espacial que permitan la discriminación del sitio activo de su vecino que se encuentra en reposo: 1) detección de cambios locales, 2) transmisión de señales vasoactivas a lo largo del árbol vascular de suministro, que culmina en 3) una respuesta vasomotora que dirige la sangre a la zona activa (Kovacs-Oller et al., 2020b). Clásicamente, se postula que los vasos pre-

capilares y post-capilares controlan la dirección y la velocidad del flujo sanguíneo, mientras que a nivel capilar se produce la filtración y el intercambio de nutrientes y metabolitos. El balance del tono vascular de las arteriolas pre-capilares y vénulas post-capilares son los principales determinantes de la hemodinámica capilar. Los mecanismos de la actividad vasomotora en respuesta a factores centrales y locales, especialmente en la zona de intercambio capilar donde subyacen los pericitos de la microcirculación es en gran medida desconocida (Burdyga & Borysova., 2014).

#### Regulación del flujo sanguíneo a nivel arteriolar

Diversas evidencias establecen que la hiperemia funcional es regulada a nivel arteriolar. De acuerdo a esta concepción, la actividad neuronal aumenta el FS arteriolar principalmente por liberación de (a) moléculas vasoactivas y (b) neuro-glio-transmisores, en particular el glutamato. Clásicamente, se postula que son los astrocitos las células mediadoras que acoplan la actividad neural al tono arteriolar (Gordon et al., 2008, 2011; Metea & Newman, 2007; Mulligan & MacVicar, 2004; Takano et al., 2006). Los astrocitos son células multifuncionales que juegan un rol en el mantenimiento de la homeostasis cerebral, ubicándose entre las neuronas y las arterias cerebrales coordinando sus actividades (Anderson & Nedergaard, 2003; Filosa & Iddings, 2013; Koehler et al., 2006; Zonta, Angulo, et al., 2003; Zonta, Sebelin, et al., 2003). Los astrocitos se caracterizan por provectar procesos (Bushong et al., 2004) que contactan a cientos de neuronas (Ventura & Harris, 1999) y por expresar receptores funcionales para neurotransmisores (como el glutamato) (Koehler et al., 2006; Porter & McCarthy, 1997; Takano et al., 2006; Zonta, Sebelin, et al., 2003); los astrocitos presentan especializaciones denominadas pies que envuelven la red vascular (Anderson & Nedergaard, 2003; Iadecola, 2017; Koehler et al., 2006; Mathiisen et al., 2010). La disminución de la resistencia arteriolar subyace al incremento del flujo sanguíneo durante la actividad neuronal. En este escenario, la modulación del nivel de Ca2+ intra-astrocitario posee un rol en el ajuste del diámetro de las arteriolas pre-capilares (Gordon et al., 2008, 2011; Metea & Newman, 2007; Mulligan & MacVicar, 2004; Takano et al., 2006). Canónicamente, las neuronas liberan glutamato en la hendidura sináptica que activa receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu) presentes en los procesos astrocitarios, induciendo liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos internos por aumento del inositol 1,3,4 trifosfato (IP<sub>3</sub>); la onda de  $Ca^{2+}$  se propaga hacia los pies astrocitarios, donde activa la fosfolipasa  $A_2$ induciendo liberación de agentes derivados del ácido araquidónico (ácido epoxyeicosatrienoico (EETs) y prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), resultando en una vasodilatación arteriolar (Takano et al., 2006,

Mishra et al., 2014; 2016; Filosa et al., 2016). Estudios que utilizan ratones *knockout* para el receptor glutamatérgico metabotrópico 5 (mGluR<sub>3</sub>) y para el receptor 2 del IP<sub>3</sub> han demostrado que la activación neural también genera vasodilatación por otras vías (Otsu et al., 2015). En consonancia con esto, se ha demostrado que la señalización purinérgica de la glía limitante dilata las arteriolas piales cuando se induce activación neuronal (Xu et al., 2008). La activación de receptores purinérgicos gliales por el ATP contribuye a aumentar el Ca<sup>2+</sup> intra-astrocitario y la respuesta vasodilatadora (Xu et al., 2008; Mishra et al., 2016). El ATP se puede liberar hacia el espacio entre los pies astrocitarios y las arteriolas por hemicanales (de conexina 30 o de 43) o por panexones; la hidrólisis del ATP a adenosina por ecto-ATPasas potencia y coordina la respuesta vasodilatadora inducida por las ondas de Ca<sup>2+</sup> astrocitarias e induce vasodilatación mediante receptores de adenosina de tipo A<sub>2</sub> de las células del músculo liso vascular de las arteriolas (Muñoz et al., 2018). No solamente el glutamato y el ATP son capaces de generar señalización astrocitaria de Ca<sup>2+</sup> y vasodilatación, otros neurotrasmisores como: la acetilcolina (ACh), el ácido gama amino butírico (GABA), la somastostatina, y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) también inducen estas respuestas (Koehler et al., 2009; Li et al., 2003; Stout et al., 2002; Straub et al., 2006)

Por otra parte, la liberación de ácido araquidónico por los astrocitos conduce a constricción vascular a través de la producción de ácido 20-hidroxieicosatetraenoico (20-HETE) (Metea & Newman, 2006; Mulligan & MacVicar, 2004). Esta aparente controversia de la respuesta desencadenada por señales del Ca<sup>2+</sup> astrocitario (vasodilatación vs. vasoconstricción) podría deberse a variaciones en la concentración del ion K<sup>+</sup> entre los pies astrocitarios y el endotelio; de este modo el nivel de K<sup>+</sup> extracelular controla el estado vasomotor arteriolar de manera bi-modal induciendo vasodilatación o vasoconstricción (Girouard et al., 2010). En los pies astrocitarios el aumento de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intrastrocitario [Ca<sup>2+</sup>]i durante el acoplamiento neurovascular, desencadena la apertura de los canales de potasio activados por Ca<sup>2+</sup> (BKCa) que conduce a la liberación del ion K<sup>+</sup> en el espacio perivasculare inferiores a 20mM activan canales Kir (rectificador interno de K<sup>+</sup>) ubicados en el músculo liso vascular (Filosa et al., 2006; Girouard et al., 2010), conduciendo a su hiperpolarización y en consecuencia induciendo vasodilatación. Sin embargo, aumentos mayores en la concentración extracelular de K<sup>+</sup> (> 20mM) eliminan el gradiente electroquímico de K<sup>+</sup> hacia la célula muscular lisa y producen despolarización celular y constricción vascular (Girouard et al., 2010). Por otra parte, se ha determinado que la activación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) en interneuronas es capaz de generar vasodilatación arteriolar mediada por la liberación de oxido nítrico (Mishra et al., 2016), por las interneuronas que expresan la enzima óxido nítrico sintasa (nNOS) (Cauli et al., 2004; Jaglin et al., 2012; Li et al., 2003; Metea & Newman, 2006). El NO en los astrocitos activa hemicanales de Cx43 y canales de potasio dependientes de Ca<sup>2+</sup>. Los hemicanales abiertos proporcionan vías para el ingreso de Ca<sup>2+</sup> y pueden participar en los mecanismos vasodilatadores permitiendo la liberación eficiente del vasodilatador PGE<sub>2</sub> (Munoz & Figueroa, 2019).

#### Regulación del flujo sanguíneo por los pericitos a nivel capilar

Estudios recientes proponen al capilar y a los pericitos en el centro de la regulación del flujo sanguíneo cerebral (Peppiatt et al., 2006; Attwell et al., 2010; Hall et al., 2014, Fernandez-Klett et al., 2015). Sin embargo, el rol pericitario en la hiperemia y en el acoplamiento neurovascular se mantiene en debate y es motivo de crecientes investigaciones en los últimos años (Attwell et al., 2016; Fernández-Klett et al., 2010; Grutzendler & Nedergaard, 2019; Hall et al., 2014; Hill et al., 2015; Kisler et al., 2017, 2020; Mishra et al., 2016; Nelson et al., 2020; Peppiatt et al., 2006). La disfunción y la pérdida de los pericitos contráctiles se asocia con alteraciones de la microvasculatura y del suministro de energía a las neuronas en condiciones patológicas tales como isquemia (Kisler et al., 2017; Montagne et al., 2018; Nikolakopoulou et al., 2019; Yemisci et al., 2009) y el Alzheimer (Hamilton, 2010; Montagne et al., 2016, 2018; Nortley et al., 2019).

#### Pericitos y acoplamiento neurovascular

Los pericitos poseen múltiples propiedades que los hacen compatibles con su participación en la regulación del FS, como expresar proteínas contráctiles y responder a un gran número de moléculas vasoactivas, y neuro- y glio-transmisores modificando su tono contráctil (Lebeux, 1978; Alarcon-Martinez et al., 2018; Attwell et al., 2010; Bandopadhyay et al., 2001; Bell et al., 2010; Fernández-Klett & Priller, 2015; Grant et al., 2019; Hamilton, 2010; Hartmann et al., 2015; Hartmann et al., 2021; Hill et al., 2015; Nehls & Drenckhahn, 1991). Estas propiedades le permiten a los pericitos modular su tono, el diámetro capilar y el FSC (Kawamura et al., 2003; Peppiatt et al., 2006; Lacar et al., 2012; Hall et al., 2014; Mishra et al., 2016; Kisler et al., 2017; Isasi et al., 2019; Nortley et al., 2019; Kisler et al., 2020; Nelson et al., 2020; Hartmann et al., 2021; Ivanova et al., 2021). Aunque el

rol de los pericitos del lecho medio capilar en la regulación del FS sigue en debate (Alarcon-Martinez et al., 2018; 2020; Fernández-Klett et al., 2010; Hill et al., 2015), se acepta que los pericitos pre-capilares a nivel arteriolar expresan  $\alpha$ -SMA y regulan el flujo sanguíneo cerebral (Hill et al., 2015; Hartmann et al., 2021). Sin embargo, los pericitos del lecho medio-capilar presentan muy bajos o indetectables niveles de  $\alpha$ -SMA y para su inmuno-determinación es necesario mantener su estado filamentoso (Alarcon-Martinez et al., 2018). Este hecho así como la expresión de proteínas contráctiles alternativas a la  $\alpha$ -SMA y su impacto en la función contráctil pericitaria, se plantearán extensamente en la discusión.

Múltiples evidencias proponen el rol activo de los pericitos en el acoplamiento neurovascular (Peppiatt et al., 2006; Attwell et al., 2010; Hall et al., 2014, Fernandez-Klett et al., 2015) tanto en preparados ex vivo tales como retinas aisladas o rodajas cerebrales y cerebelares (Peppiatt et al., 2006; Attwell et al., 2010; Lacar et al., 2012; Hall et al., 2014, Fernandez-Klett et al., 2015; Ivanova y col 2017, 2019) como en estudios in vivo de microscopía multifotónica (Hall et al., 2014, Ivanova y col 2017, 2019; Nelson y col 2020, Hartmann et al., 2021). Los pericitos se ubican en la interfaz neuro-vascular, un sitio privilegiado para monitorear la actividad neural y generar ajustes del FS según las necesidades metabólicas (Peppiatt et al., 2006; Attwell et al., 2010; Hall et al., 2014, Fernandez-Klett et al., 2015) y son los primeros elementos regulatorios en relajarse activamente generando dilatación capilar y aumento del FS en condiciones fisiológicas tanto ex vivo e in vivo (Peppiatt et al., 2006; Attwell et al., 2010; Hall et al., 2014; Fernandez-Klett et al., 2015, Cai et al., 2019). Esta concepción es apoyada por las siguientes observaciones: (a) las neuronas activas se encuentran más cercanas a los pericitos (8 a 23 µm) que a las arteriolas (70 a 160 µm), (b) el intercambio metabólico ocurre en la microvasculatura capilar (Lovick et al., 1999) y (c) los pericitos envían señales a las arteriolas para que se dilaten (Peppiatt et al., 2006; Attwell et al., 2010; Hall et al., 2014; Fernandez-Klett et al., 2015; Cai et al., 2019). En este sentido se ha reportado en experimentos in vivo que durante la activación de la corteza somato-sensorial los capilares inician la dilatación la cual luego se propaga hacia los capilares pre-arteriolares y luego hacia las arteriolas piales (Cai et al., 2019). Estos resultados son consistentes con reportes que determinaron que la relajación pericitaria in vivo es anterior a la de las células del músculo liso arteriolar (Hall et al., 2014). Además, los glóbulos rojos tienden a deformar las paredes de los capilares cuando pasan a través de los capilares, estos cambios generarían contracción/relajación de los procesos de los

pericitos afectando el FS por cambios de la rigidez vascular y alteración del intercambio de nutrientes en el tejido incluso a FS constante (Attwell, 2015).

Por otra parte, otros estudios muestran que la actividad neuronal produce dilatación capilar, pero que dicha relajación es dependiente en gran medida de la señal de Ca<sup>2+</sup> en los astrocitos y de la liberación de PGE<sub>2</sub> siendo los astrocitos los primeros elementos en controlar el FSC (Mishra et al., 2016). Así mismo mediante estudios de optogenética, se determinó que las células musculares lisas, pero no los pericitos regulan el tono de los vasos después de la estimulación lumínica efecto asociado a corrientes de Ca<sup>2+</sup> que son detectables solo en las arteriolas y no en los capilares. La dilatación capilar en respuesta a los estímulos neuronales no fue sustancial en estos estudios concluyendo que los pericitos no contribuyen a la regulación de las respuestas del FSC (Hill et al., 2015).

#### 1.5- Moduladores del tono contráctil pericitario

Los pericitos pericapilares son los únicos moduladores del calibre capilar; al contraerse o relajarse, ellos ajustan el diámetro capilar (vaso-constricción o vaso-relajación respectivamente) y regulan el FS en la microcirculación y así el intercambio hematoencefálico (disminuciones/aumentos respectivamente).

# Durante la actividad cerebral, se liberan agentes vasodilatadores que reducen el tono contráctil de los pericitos resultando en aumento del calibre capilar

La actividad neuronal (Hall et al., 2014; Hamilton et al., 2010; Peppiat et al., 2006), el neurotransmisor glutamato (Hall et al., 2014; Peppiat et al., 2006) y los agentes vasodilatadores acetilcolina (Wu et al., 2003), óxido nítrico (Hall et al., 2014; Sakagami et al., 2001), PGE<sub>2</sub> (Hall et al., 2014) y adenosina (Matsugi et al., 1997a,b) inhiben el tono pericitario generando relajación capilar. El glutamato, principal neurotransmisor (NT) excitatorio del cerebro, es mediador del acoplamiento neuro-vascular; dicho NT activa receptores neuronales NMDA y AMPA que subyacen procesos de plasticidad sináptica en el hipocampo asociados con la memoria y el aprendizaje (Hall et al., 2014; Peppiatt C & Attwell D., 2004; Simandle et al., 2005; Wendling et al., 1996). El glutamato no posee efectos directos sobre pericitos (Hall et al., 2014; Peppiat et al., 2006; Simandle et al., 2005; Wendling et al., 1996). En el cerebelo, el glutamato exógeno dilata capilares mediante PGE<sub>2</sub>

en presencia de óxido nítrico (Peppiat et al., 2006). Los vasodilatadores liberados durante la actividad cerebral pueden acoplar la actividad neuronal a variaciones de la microcirculación local.

# Los pericitos se contraen por agentes y factores que estimulan su tono contráctil e inducen vasoconstricción capilar

Estudios pioneros ex vivo realizados por Peppiatt y col., demostraron mediante electrofisiología que los pericitos de la retina son capaces de contraerse y generar resistencia al pasaje de eritrocitos en los capilares (Peppiatt et al., 2006). Se han caracterizado múltiples factores y agentes capaces de aumentar el tono contráctil pericitario y de provocar contracción capilar entre los cuales mencionamos el ATP y el UTP (Kawamura et al., 2003; Peppiatt et al., 2006, Lacar et al., 2012, Cai et al., 2018, Ivanova et al., 2017), la despolarización, y la noradrenalina o norepinefrina (NE) (Peppiatt y col 2006, Hall y col 2014). Para el caso del ATP y del UTP, la contracción de los pericitos capilares puede ser mediada por la activación de receptores purinérgicos metabotrópicos (Lacar et al., 2012; Cai et al., 2018, Ivanova et al., 2019, Kovacs-Oller et al., 2020 a,b) particularmente P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> (Lacar et al., 2012). Moléculas liberadas por el endotelio como endotelina-1 (ET-1) (Borysova & Burdyga, 2015; Chakravarthy et al., 1992, 1997; Korte et al., 2020; Nortley et al., 2019; Ramachandran et al., 1993), tromboxano A<sub>2</sub> (Fernández-Klett et al., 2010, Mishra et al., 2016) y angiotensina II (Matsugi et al., 1997a; Kawamura et al., 2004), evocan contracción capilar mediada por pericitos aumentando así la resistencia al FS. La ET<sub>1</sub> es un potente vasoconstrictor endógeno liberado por las células endoteliales que aumenta el tono pericitario y la resistencia vascular cerebrales (Zambach et al., 2020) por acción parácrina sobre receptores de tipo A (ET<sub>A</sub>) (Davenport et al., 2016). Diversas situaciones patológicas del cerebro se acompañan de un aumento de la síntesis endotelial de ET<sub>1</sub> (Nortley et al., 2019; Zambach et al., 2020).

#### El Ca<sup>2+</sup> intracelular: vía final común para regular el tono contráctil pericitario

El tono contráctil de los pericitos es modulado mediante variaciones en sus niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]i) (Wu et al., 2003; Peppiatt et al., 2006; Attwell et al., 2010; Hall et al., 2014; Fernández-Klett et al., 2015; Borysova et al., 2013). Así, aumentos en los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> se traducen en aumento de la contracción pericitaria mientras que disminuciones del Ca<sup>2+</sup> pericitario resultan en relajación. En pericitos de microvasos aislados de retina se estableció que la concentración basal de calcio intrapericitario [Ca<sup>2+</sup>]i es 133±3nM (Wu et al., 2003). Señales

vasoconstrictoras mediadas por activación de agonistas de los receptores acoplados a las proteínas G (GPCR) como endotelina-1, vasopresina, angiotensina II, noradrenalina, UTP y ATP generan una liberación transitoria de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares que se asocia a contracción tanto de pericitos como de miocitos arteriolares (Kawamura et al., 2004, Lacar et al., 2012; Borysova et al., 2013, 2015; Cai et al., 2018, Ivanova et al., 2019). Estudios realizados en el uréter muestran una rápida transmisión de señales de Ca<sup>2+</sup> intercelular a lo largo de la microvasculatura desde los capilares hacia las arteriolas (Borysova et al., 2015). En retina, la estimulación eléctrica en los pericitos resulta en su activación y en la propagación de una onda de Ca2+. El aumento de Ca2+ intrapericitario y la vasoconstricción fueron casi instantáneos en los capilares y en las ramas vasculares que conducen hacia la arteria de alimentación, con una menor propagación hacia las venas (Kovacs-Oller et al., 2020 a,b). La propagación de la onda de Ca<sup>2+</sup> y la respuesta vasomotora se basaron en uniones gap entre las células vasculares (Kovacs-Oller et al., 2020 a,b; Alarcon-Martínez, 2020). Resultados similares fueron obtenidos ex vivo en la zona sub-ventricular, donde la estimulación eléctrica de los pericitos generó un incremento de los niveles de Ca<sup>2+</sup> que se propagó por las células perivasculares, este incremento se acompañó de contracción capilar (Lacar et al., 2012). En los pericitos las ondas de  $Ca^{2+}$  se inician en sus procesos para luego propagarse hacia el soma; en presencia de ET-1 la movilización de Ca2+ de los depósitos intracelulares depende de IP3 (Borysova et al., 2013; Norley et al., 2019). En sentido opuesto, el NO disminuye el tono de los pericitos mediante inhibición del influjo de Ca<sup>2+</sup> (Haefliger et al., 1994; Hall et al., 2014; Sakagami et al., 2001; Kovacs-Oller et al., 2020 a,b). Resultados similares fueron reportados en uréteres, donde se determinó que el NO induce relajación de los pericitos por inhibición de las ondas de Ca<sup>2+</sup> mediadas por IP<sub>3</sub> (Borysova et al., 2015).

Hasta aquí se presentaron las evidencias del rol del pericito y su contribución en la hiperemia, el acoplamiento neurovascular y la regulación del FSC. Sin embargo, el rol central de los pericitos en estos procesos y los mecanismos que subyacen el acoplamiento neurovascular y la regulación de la resistencia capilar se encuentran en estudio. Un aumento de la actividad neural requiere de la dilatación capilar para favorecer el intercambio en la microcirculación. Evidencias recientes y en crecimiento proponen a los pericitos como elementos sensores y transmisores de la UNV que vinculan la actividad metabólica neuronal con la microvasculatura para ajustar el aporte de oxígeno y glucosa a los tejidos.

En este escenario nos cuestionamos, ¿Cuáles son los determinantes moleculares de la regulación de la resistencia vascular y del intercambio hematoencefálico a nivel microvascular?. Los canales de membrana formados de Conexinas (Cxs) y Panexinas (Pxs), rutas para la liberación de ATP (regulador de la homeostasis de Ca<sup>2+</sup> intracelular) emergen como vías dinámicas para la interacción neuro-glio-vascular y para la regulación del tono vascular en la salud y la enfermedad. En el próximo capítulo se describen este tipo de canales y se detalla la funcionalidad de los mismos en las distintas células de la UNV.

#### 2. Las conexinas y las panexinas en la unión neurovascular

Las subunidades proteicas de conexinas y panexinas se agrupan formando canales de membrana de poro grande, los cuales han sido vinculados con múltiples procesos celulares. Las conexinas (Cxs) pueden existir bajo dos estados: (1) formando hexámeros como canales únicos no ensamblados (conexones o hemicanales o HC-Cx) en la membrana de no-unión conectando el citosol con el medio extracelular; y (2) formando uniones *gap* o en hendidura donde dos conexones (cada uno aportado por una célula diferente) se ensamblan formando un canal intercelular que comunica los citosoles de dos células adyacentes acoplándolas funcionalmente entre sí (Bennett & Zukin, 2004). En mamíferos, las panexinas (Pxs) se oligomerizan formando canales que operan solo como canales únicos no ensamblados (panexón) (Orellana et al., 2009), tal como se esquematiza en la Figura 3, aunque recientemente se ha reportado la formación de canales de panexina funcionales intercelulares en líneas celulares (Palacios-Prado et al.,2022). En forma de canales únicos no ensamblados en la membrana celular, los conexones y los panexones actúan como rutas de intercambio de iones y moléculas entre el citoplasma y el entorno extracelular mediando vías autócrina y parácrinas de señalización entre los medios intracelular y extracelular (Dahl, 2015; Lapato & Tiwari-Woodruff, 2017; Sácz et al., 2003 a, b).

#### 2.1- Estructura y función de los canales formados por conexinas y panexinas

#### Uniones gap o en Hendidura

Las uniones *gap*, también conocidas como uniones en hendidura o uniones comunicantes, están conformadas por agrupamientos de canales intercelulares que conectan el citoplasma de células

adyacentes entre sí (Bennett & Zukin, 2004). Estas uniones coordinan la actividad de un grupo de células permitiendo la transferencia pasiva de iones, metabolitos, segundos mensajeros de forma bidireccional y manteniendo el balance osmótico lo que resulta en un acoplamiento funcional intercelular (eléctrico, bioquímico, molecular) (Goodenough & Paul, 2003). Mediante microscopía electrónica en secciones ultrafinas de tejidos, las uniones gap aparecen como regiones de contacto estrecho donde las membranas de células adyacentes se encuentran muy próximas entre sí con una separación o "gap" de 2-3 nm (Sáez et al., 2003 b). Las conexinas participan en la formación de los canales de las uniones gap (Bennett & Zukin, 2004; Sáez et al., 2003 b). Luego de su síntesis, las Cxs se oligomerizan en hexámeros en el retículo endoplásmico o en el trans-Golgi formando hemicanales o conexones, los cuales son posteriormente exportados hacia la membrana plasmática de la célula donde se insertan. Una vez que un conexón se inserta en la membrana, se ensambla con otro presente en la membrana de una célula vecina, dando origen a un canal intercelular o en hendidura que comunica el interior de las células entre sí. Estos canales intercelulares se agregan formando diferenciaciones de la membrana denominadas placas de unión (Bennett & Zukin, 2004; Contreras et al., 2004; Decrock et al., 2009; Evans et al., 2006; Laird, 2006; Sáez et al., 2003 a,b). El número de canales en las placas de unión varía enormemente según el tejido, desde unos pocos a más de 200000 como se ha determinado en los discos intercalares cardíacos (Evans et al., 2006). Cada canal es un poro acuoso con un diámetro aproximado de 2nm (Laird, 2006), que permite la difusión pasiva de pequeñas moléculas hidrofílicas de 0.1 a 1.5 kDa tales como: glucosa, glutamato, glutatión, adenosín monofosfato cíclico (AMPc), adenosina trifosfato (ATP), inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), e iones como Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (Decrock et al., 2009). Al presente, más de 20 tipos de Cxs se han clonado en roedores y 21 en humanos (Decrock et al., 2009), cuyas masas moleculares oscilan entre 25 y 56 kDa (Evans et al., 2006). Las conexinas se nombran utilizando la abreviación Cx seguida de su peso molecular en kDa (ej. Conexina 43kDa = Cx43) (Decrock et al., 2009; Sáez et al., 2003 a,b). Las Cxs presentan una distribución diferencial en los tejidos (Goodenough & Paul, 2003), así, por ejemplo, la Cx43 es una proteína de 43-kDa de 382 aminoácidos (Taruno, 2018) ubicuamente expresada en el organismo salvo en neuronas, eritrocitos, fibras del músculo esquelético y espermatozoides (Laird, 2006; Patel et al., 2014). En una misma célula o tejido se puede expresar más de un tipo de Cx (Sáez et al., 2003 b). Los conexones que se forman por oligomerización de seis Cxs se denominan heteroméricos si están compuestos por más de un tipo de Cx y homoméricos cuando están compuestos por solo un tipo de Cx. Cuando los canales intercelulares resultan del ensamblaje de dos

hemicanales de igual composición de Cxs se les denominan **homotípicos**; en cambio, si la composición es distinta se los conoce como **heterotípicos** (ver Figura 3). No todas las Cxs son capaces de formar canales heterotípicos (Bennett & Zukin, 2004; Laird, 2006; Sáez et al., 2003 a). Si los canales son homotípicos o heterotípicos es el mayor determinante que gobierna la conductancia, la permeabilidad y la selectividad para el pasaje de moléculas de señalización a través de la unión *gap* (Evans et al., 2006).

#### Estructura molecular de las Conexinas

Las Cxs son proteínas integrales de membrana que presentan cuatro segmentos transmembrana en configuración  $\alpha$ -hélice de aproximadamente 20 aminoácidos cada uno, unidos por dos dominios extracelulares y uno citoplasmático. Los extremos NH<sub>2</sub> y COOH de la proteína se encuentran en el interior celular (Decrock et al., 2009; Laird, 2006; Sáez et al., 2003 a) (ver Figura 3). La secuencia de aminoácidos de los segmentos transmembrana, extracelular y amino-terminal son altamente conservados. Los dominios extracelulares (EL1 y EL2) tienen 31 y 34 aminoácidos respectivamente, y están covalentemente conectados por tres puentes disulfuro intra-moleculares, que son esenciales para estabilizar la estructura secundaria y para formar las uniones gap. En cambio, la mayor diversidad se encuentra en la región carboxílica, tanto en la secuencia, en el tamaño y en las modificaciones post-traduccionales (Evans et al., 2006; Laird, 2006; Lohman & Isakson, 2014). Esta región de la Cx43 contiene múltiples sitios de fosforilación para quinasas (PKC, MAPK y Src) que regulan su función. La fosfoproteína Cx43 presenta una rápida tasa de renovación y una vida media muy corta de 1-3 horas (Beardslee et al., 1998; Laird et al., 1995). En cambio, la región carboxílica de la Cx26 presenta pocos aminoácidos y no presenta sitios de fosforilación. La región N-terminal de las conexinas consta de 20 aminoácidos altamente conservados que actúa como parte del sensor de voltaje (Evans et al., 2006).

#### Estructura molecular de las Panexinas

Las Panexinas (Pxs) son glicoproteínas de membrana que forman canales con poros de gran tamaño los cuales son rutas para liberar ATP; las Pxs fueron descritas en el año 2000 por Panchín y colaboradores. Presentan una distribución ubicua en el reino animal y el término panexina surge del latín *Pan*- todos y *Nexus*- conexión/unión (Panchin, 2005). Las Pxs son proteínas homólogas a las inexinas que forman las uniones en hendidura en invertebrados (Bennett et al., 2003; Evans et al.,

2006; Goodenough & Paul, 2003; Panchin, 2005; Sáez et al., 2003 a,b). Tanto el genoma de humano como el de ratón contienen genes que codifican para tres tipos de Pxs 1, 2 y 3 (Panchin, 2005), estas presentan pesos moleculares aproximados de 48, 73 y 45 kDa respectivamente. Se ha reportado una amplia variedad en el tamaño de las proteínas para las tres panexinas en humanos, ratones y ratas; esta diversidad se debe a: (a) diferencias en la longitud de la secuencia de los aminoácidos reportados, la cual parece estar dada por "splicing" alternativos de ARN mensajeros que forman la proteína, (b) modificaciones post-traduccionales, y (c) posibles diferencias de expresión (Penuela et al., 2013). Estas proteínas presentan solo un 15% de homología con las Cxs, sin embargo, poseen una organización similar (Figura 3). Estructuralmente, las panexinas presentan cuatro hélices transmembrana unidas por una región intracelular y dos extracelulares. Los dominios N y C terminal se encuentran en el interior celular. Las regiones extracelulares se unen entre sí por dos puentes disulfuro entre residuos de cisteína altamente conservados en el primer loop extracelular, característica similar a la de las inexinas presentes en los invertebrados (Bruzzone et al., 2003; Lohman & Isakson, 2014; Orellana et al., 2011 a; Sáez et al., 2003 b). Las Pxs comparten entre sí aproximadamente 50% de similitud en la secuencia de aminoácidos, fundamentalmente en sus regiones N terminal y transmembrana (Penuela et al., 2013). La mayor variabilidad tanto en la longitud como en la identidad de los aminoácidos se presenta en las colas de la región C terminal (carboxi-terminal). Cabe destacar que la Px2 posee la cola en C más larga, con regiones ricas en prolina e hidrofílicas (Yen & Saier, 2007). Por lo tanto, las colas C terminales pueden presentar sitios únicos de regulación y esto podría ser la base de la divergencia funcional entre diferentes tipos de panexina (Chiu et al., 2017). Canónicamente, la oligomerización de las Pxs 1 y 3 es por medio de hexámeros, en cambio, la Px2 forma heptámeros y octómeros. Sin embargo, datos recientes sugieren que la Px1 se oligomeriza en forma de heptámeros (Gaete et al., 2019; Michalski et al., 2020). La oligomerización de las subunidades de Px1 forma un poro acuoso en el centro del complejo, similar al de los conexones, aunque de un mayor diámetro (> 15 Å). La translocación a la membrana celular de la Px1 forma canales funcionales con propiedades de permeabilidad similar a los conexones (Bruzzone et al., 2003; Lohman & Isakson, 2014; Sáez et al., 2003 b). La Px1 es la de mayor expresión, a nivel del SNC también se ha determinado la presencia de Px1 y Px2, mientras que, la Px3 se ha localizado en piel, cartílago y hueso (Bruzzone et al., 2003; Lohman & Isakson, 2014; Penuela et al., 2013). Clásicamente, las panexinas no forman uniones gap en mamíferos y al parecer existen solo como canales de membrana, por lo que se las denomina canal de Px1 o panexones en vez de hemicanales (Lohman & Isakson, 2014; Sosinsky et al., 2011). Las evidencias reportadas que excluyen la formación de la unión *gap* por las panexinas son las siguientes: (1) su expresión en células que no forman uniones *gap*, como los eritrocitos; (2) la expresión en células polarizadas solo en la membrana apical que no está en contacto con ninguna otra célula y (3) su glicosilación que previene el acoplamiento de los panexones en las membranas celulares opuestas (Dahl, 2015). La N-glicosilación de la Px1 en el segundo segmento extracelular al parecer sería responsable de que no formen estructuras tipo uniones *gap* (Penuela et al., 2014). Sin embargo, reportes recientes indican que la Px1 es capaz de formar uniones en hendidura funcionales intercelulares en células HeLa transfectadas con Px1 humana y en células TC620, las cuales expresan la Px1 humana endógenamente (Palacios-Prado et al., 2022).

La Px1 presenta una vida media mayor que la Cx43, siendo el rango de tiempo en el que la Px1 se mantiene incambiada en la superficie celular de 6 a 21hs. Además, la Px1 y la Px3 poseen una elevada movilidad en la membrana celular y no aparecen agrupadas. Mediante micrografías electrónicas se reveló que la Px1 se localiza uniformemente en la superficie celular ubicada al menos a 20–50 nm de otra membrana celular (Lohman et al., 2012).



Figura 3-Estructura y organización de conexinas y panexinas, formando canales transmembrana: conexones y panexon. Los canales de conexina se pueden unir con hemicanales homotípicos o heterotípicos en células adyacentes formando canales intercelulares o de uniones *gap* para permitir el intercambio de contenidos citoplasmáticos de hasta 1,5 kDa. Los conexones y los panexones forman canales de gran poro en la membrana celular, donde los monómeros de conexinas y panexinas se ensamblan en la membrana celular mediante cuatro dominios transmembrana unidos por un bucle intracelular y dos extracelulares. La cola carboxílica (COOH) y amino (NH2) se disponen hacia el citoplasma, siendo la cola carboxílica el sitio de regulación y fosforilación. Adaptado de Lapato et al., 2018.

#### Permeabilidad y conductancia de los conexones y los panexones

Como ya se mencionó, los conexones y los panexones son canales de membrana de gran poro que forman por sí mismos canales únicos (no ensamblados) (Thompson & MacVicar, 2008) y que median un transporte cooperativo, saturable y característico para cada especie de Cx (Orellana et al., 2011a; Sáez et al., 2020). Los conexones presentan un rango de conductancia entre 7 -350 pS dependiendo del tipo de la conexina involucrada. Los conexones de Cx43 presentan una conductancia de 220 pS, aproximadamente el doble que las uniones gap (Contreras et al., 2003). Clásicamente, se suponía que los conexones en las membranas estaban cerrados en condiciones fisiológicas, y que servían como un grupo de canales de reserva listos para ser ensamblados en las uniones gap de las placas de unión (Cheung et al., 2014; Giaume et al., 2013; Sáez et al., 2020). Debido a que los conexones son canales de gran diámetro poco selectivos y permeables a numerosos iones y moléculas, su apertura en la membrana celular inicialmente se consideró perjudicial, debido a la pérdida de iones y de la integridad citoplasmática además del daño neurotóxico que pudieran ser inducidos por los factores liberados a través de ellos (Evans et al., 2006a; Giaume et al., 2013; Goodenough & Paul, 2003; Orellana et al., 2011 a,b; Sáez,et al., 2003 a,b). Sin embargo, actualmente este concepto ha cambiado, ya que, se considera que en condiciones fisiológicas la apertura de los HC-Cxs está finamente regulada (Giaume et al., 2013; Sáez et al., 2020). Se ha demostrado que la permeabilidad de la membrana dependiente de los hemicanales de la Cx43 se modula mediante una variación en el número de hemicanales en la superficie celular y por mecanismos que controlan la apertura/cierre de los mismos (Giaume et al., 2013). Un aumento en el número de conexones está regulado por los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, mientras que el estado de apertura está dinámicamente modulado por múltiples factores (Vicario et al., 2020).

La Px1 forma canales (panexones) que se abren en la membrana de superficie en varios tipos de células, incluyendo: ovocitos de Xenopus (Bruzzone et al., 2003), células vasculares, endoteliales y musculares lisas (Billaud et al., 2012; Good et al., 2018; Lohman et al., 2012), neuronas piramidales (Thompson & MacVicar, 2008), células HEK293 (Pelegrin & Surprenant, 2006) y astrocitos (Garré et al., 2010; Huang et al., 2007; Iglesias et al., 2009; Scemes et al., 2000; Suadicani et al., 2012). Para el caso de los panexones se ha demostrado que se encuentran abiertos a potenciales de membrana más negativos que los conexones y que, a diferencia de estos últimos, pueden ser completamente funcionales bajo potenciales de membrana en reposo (Bruzzone et al., 2003). Si bien los conexones como los panexones muestran corrientes de membrana crecientes ante

despolarizaciones crecientes, los panexones llegan a corrientes máximas con una cinética más rápida y exhiben conductancias unitarias mayores, menor dependencia al voltaje y estados de subconductancias en comparación con los conexones (Chiu et al., 2017; Dahl, 2015). Se han reportado dos estados conformacionales para los canales de panexina1: a) poros no selectivos de gran conductancia (300-500ps), los cuales son constitutivamente activos y liberan ATP; y b) poros de conductancia intermedia (15-75 ps), con selectividad aniónica selectiva al cloruro e impermeable al ATP que se abren durante la despolarización celular (Chiu et al., 2017; Dahl, 2015; Patel et al., 2014; Taruno, 2018). A través de los panexones abiertos se ha determinado el intercambio de moléculas grandes sin selectividad de carga; en este sentido, colorantes fluorescentes aplicados en la superficie extracelular con carga negativa y positiva son capaces de ingresar a las células (Taruno, 2018). El límite de exclusión exacto para los panexones no ha sido determinado, sin embargo, las moléculas de polietilenglicol de hasta 1.5 kDa ingresan por estos canales. Basado en el gran tamaño del poro y la aparente falta de selectividad, se puede esperar que las moléculas del tamaño del ATP pasen a través de panexones sin obstáculos (Dahl, 2015). Otras moléculas de señalización como el UTP, el glutamato y los ácidos epoxieicos atrienoicos también permean este tipo de canales (Chiu et al., 2017; Dahl, 2015; Patel et al., 2014; Taruno, 2018).

#### Mecanismos de modulación de los conexones y panexones

Se ha reportado que los conexones se activan por múltiples estímulos tales como la desfosforilación, el bajo nivel de Ca<sup>2+</sup> extracelular, el bajo pH (aumento de CO<sub>2</sub>), despolarización de la membrana de gran magnitud, el estrés mecánico, la inhibición metabólica, el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los agentes farmacológicos como las quininas y quinidinas (Figura 4) (Lohman & Isakson, 2014). La probabilidad de apertura de los conexones disminuye por el pH, la fosforilación de los dominios citoplasmáticos, los niveles elevados de Ca<sup>2+</sup> intracelular, los potenciales de membrana negativos, los cationes (Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, La<sup>2+</sup>, Gd<sup>3+</sup>) y los bloqueantes tanto de los conexones como de las uniones *gap* (Contreras et al., 2003; Evans et al., 2006; Goodenough & Paul, 2003; Lohman & Isakson, 2014; Sáez et al., 2003 b; Taruno, 2018; Vicario et al., 2020).

Para el caso de los panexones su apertura puede activarse por la isquemia, la baja tensión de  $O_2$ , el bajo  $Ca^{2+}$  extracelular y el  $Ca^{2+}$  intracelular elevado, los potenciales de membrana negativos, el bajo pH, el estrés hipotónico, la estimulación mecánica, el clivaje del dominio C terminal por caspasas y despolarizaciones en el rango fisiológico (Lohman & Isakson, 2014). Además, de manera
característica y a diferencia de los conexones, la activación de los panexones puede estar acoplada a receptores de membrana (Dahl, 2015; Lohman & Isakson, 2014; Taruno, 2018) como por ejemplo receptores purinérgicos ionotrópicos de tipo P2X<sub>4/7</sub> (Abudara et al., 2014; Garré et al., 2010, 2020; Pelegrin & Surprenant, 2006) y metabotrópicos P2Y<sub>1/26</sub> (Carneiro et al., 2014; Locovei et al., 2006 b; Timóteo et al., 2014), receptores neuronales de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Thompson & MacVicar, 2008) y los receptores adrenérgicos α1 (Begandt et al., 2017; Billaud et al., 2011; De Lalio et al., 2019). En la Figura 4 se resumen algunas de las vías de apertura de los hemicanales de Cxs y de los panexones reportadas (tomado de Lohman et al. 2014). Los neuro-gliotransmisores y los agentes vasoactivos pueden modular el número de conexones/panexones funcionales en la membrana celular, por ejemplo se ha reportado que el NO, mensajero neuronal y endotelial, regula tanto la Cx43 (De Vuyst et al., 2009; Looft-Wilson et al., 2012; Retamal et al., 2006), como la Px1 en varios tipos de células (Johnstone et al., 2012; Lohman et al., 2012; Looft-Wilson et al., 2012; Penuela et al., 2014). El ácido araquidónico también es capaz de modular la Cx43 (De Vuyst et al., 2012; Martínez & Sáez, 1999) y la Px1 (Samuels et al., 2013).



Figura 4- Mecanismos de activación y liberación de ATP por conexones y panexones. Modificado de Lohman et al., 2014, Billaud et al., 2011, Lopez et al., 2021.

### 2.2- Funciones de señalización de los conexones y los panexones

Múltiples estudios reportan distintas funciones para los conexones/panexones en condiciones fisiológicas y patológicas, una descripción exhaustiva de las mismas supera los objetivos de esta tesis. Los panexones y los conexones poseen un rol en la interacción intercelular mediante señalización autócrina y parácrina. Estos canales son capaces de captar desde el entorno segundos mensajeros (Ca<sup>2+</sup>), metabolitos (glucosa, glutatión, ascorbato), y trazadores (Etd<sup>+</sup>, DAPI, YO-PRO-3) (Abudara et al., 2014, 2015; Fabbiani et al., 2020; Garré et al., 2010; Giaume et al., 2013; Rouach et al., 2008; Sáez et al., 2020) y liberar al entorno precursores y moléculas de señalización, incluyendo agentes vasoactivos y neuro y gliotransmisores, tales como NO, NAD<sup>+</sup>, ATP, adenosina, IP<sub>3</sub>, glutamato, PGE2, ácido araquidónico (Giaume et al., 2013; Sáez et al., 2003 a). A continuación, profundizaremos en el rol de los conexones y panexones como vías para la liberación de ATP.

### Señalización autócrina y parácrina mediada por el ATP liberado vía conexones y panexones

Los conexones y los panexones funcionan como vías para la liberación de ATP al medio extracelular, el cual, una vez liberado oficia como mensajero/señalizador que permite la interacción intercelular autócrina y parácrina (Giaume et al., 2013; Orellana et al., 2011a; Sáez et al., 2003 a,b). Se ha establecido que el ATP es un mediador importante en la señalización extracelular, en la comunicación intercelular y durante la neuro-glio-transmisión (Anselmi et al., 2008; Evans et al., 2006; Lohman & Isakson, 2014; Penuela et al., 2013). De hecho, el ATP satisface los criterios para los mediadores extracelulares: producción, liberación, presencia de receptores y eliminación extracelular (Burnstock, 2006; 2007;2008; 2017). En presencia de niveles fisiológicos de Mg<sup>2+</sup> la mayor parte del ATP existe como anión en los compartimientos intracelular y extracelular. El ATP presenta un gradiente de concentración pronunciado a través de la membrana plasmática (concentraciones nano y milimolares en el espacio extracelular y en el citosol, respectivamente), por lo que a potenciales de membrana fisiológicos el gradiente de potencial electroquímico del ATP siempre está dirigido hacia el exterior (Taruno, 2018). La señalización mediada por el ATP está implicada en procesos fisiológicos y es llevada a cabo por activación de receptores purinérgicos presentes en las membranas celulares (Billaud et al., 2012). Los receptores purinérgicos pertenecen a dos tipos de familias y son denominados P1 y P2. Los receptores P1 poseen gran afinidad por el nucleótido adenosina y se encuentran acoplados a proteínas G, su activación modula la acción de la

adenilato ciclasa y los niveles intracelulares de AMPc (Lohman & Isakson, 2014). Los receptores P2 tienen gran afinidad por el ATP y el ADP, están compuestos por dos subfamilias P2Y y P2X. Los receptores P2Y denominados metabotrópicos, poseen 8 isoformas ( $P2Y_{1-8}$ ) y se encuentran asociados a proteínas G. Su activación modula los niveles de AMPc e IP<sub>3</sub> y la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los reservorios intracelulares entre ellos del retículo sacoplásmico. Los receptores P2X o ionotrópicos poseen 7 isoformas ( $P2X_{1-7}$ ) y forman canales catiónicos no selectivos cuya activación regula el potencial de membrana y los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular en respuesta al ATP (Figura 5) (Lohman & Isakson, 2014; Patel et al., 2014). Entre otros, se ha observado liberación de ATP vía hemicanales de Cxs y/o panexones al medio extracelular con activación de P2X<sub>7</sub> en condiciones fisiológicas y patólogicas (Garré et al., 2010; Kang et al., 2008; Thompson, 2006; 2008).

## Liberación de ATP inducida por ATP

Este mecanismo de retroalimentación positiva para la señalización mediada por ATP que involucra canales de Cx43 y Px1 se ha observado en varios tipos celulares tales como astrocitos (Garré et al., 2010; Suadicani et al., 2012), músculo esquelético (Cea et al., 2013; Riquelme et al., 2013), macrófagos (Pelegrin & Surprenant, 2006), células musculares lisas vasculares (Billaud et al., 2011), y neuronas (Schock et al., 2008; Thompson et al., 2006; 2008). La asociación entre receptores purinérgicos y la liberación de ATP dependiente de Px1 y Cxs, genera un sistema de retroalimentación positiva donde la liberación de ATP produce mayor liberación de ATP y activación de los canales P2 los cuales ofician como potenciadores de la señalización, tal como se esquematiza en la Figura 5 (Isakson & Thompson, 2014). Este sistema de retroalimentación positivo opera de la siguiente manera: inicialmente el ATP es liberado al exterior celular por medio de conexones y/o panexones o por exocitosis (vía vesicular). El ATP extracelular actúa como mediador autócrino o parácrino activando receptores purinérgicos (P2X y P2Y). La activación de P2X promueve el ingreso de Ca<sup>2+</sup> a la célula, mientras que la activación de P2Y produce un aumento en los niveles de IP<sub>3</sub> (mediado por la fosfolipasa C) y la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos intracelulares. El aumento de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> activa los canales de Cxs y Pxs de la célula, promoviendo el eflujo de más ATP al exterior celular y la consecuente activación de receptores purinérgicos que induce un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular y activación/apertura de nuevos conexones y panexones generando liberación de más ATP (Isakson & Thompson, 2014; Lohman & Isakson, 2014; Orellana et al., 2011a; Pelegrin & Surprenant, 2006). Si este mecanismo operase en forma descontrolada, los efectos resultarían deletéreos para la célula, por lo que finalmente, cuando los niveles extracelulares de ATP superan un umbral, se activa un sistema de regulación que previene el aumento exacerbado de ATP. Los niveles extracelulares de ATP además se regulan por la degradación del mismo por las ectonucleasas extracelulares (Lohman et al., 2015; Lohman & Isakson, 2014) y por la internalización de los panexones y de receptores purinérgicos como se describe para altas dosis de ATP (Boyce et al., 2015; Boyce & Swayne, 2017) y se detallará en la discusión.



**Figura 5- Mecanismos parácrino y autócrino de liberación de ATP inducida por ATP,** mediado por receptores purinérgicos (P2Y y P2X) y hemicanales de conexina 43 (Cx43 HC) y panexones (Px1 HC). PLC fosfolipasa C, IP3 Inositol trisfofato. Esquema adaptado de Orellana et al., 2011, b.

#### 2.3- Canales de Cxs y Pxs en la unión neurovascular

En condiciones fisiológicas, las células de la UNV actúan como guardianes del SNC, asegurando el mantenimiento de nutrientes e iones, y la eliminación eficiente de metabolitos tóxicos para la célula. Además, las células de la UNV contribuyen en la señalización, y en el rendimiento funcional y homeostático de las células residentes del SNC (Vicario et al., 2020). A la fecha, son pocos los estudios que proponen una comunicación directa entre las células que forman la UNV, pero la evidencia acumulada demuestra una gran coordinación de las funciones de estas células para formar una unidad dinámica. Los resultados crecientes refuerzan la noción de que la UNV consiste en células independientes que pueden interactuar e influenciar a otras células y estructuras (Drewes, 2012). En este entorno multicelular tan complejo, las uniones *gap* y los hemicanales (HC) son actores importantes en la comunicación de conexones y panexones en las funciones cerebrales ha sido

reportada y depende de diversos mecanismos, su apertura al espacio extracelular promueve la regulación directa de la neurotransmisión y la señalización celular (Cheung et al., 2014). Durante los últimos años, evidencias en crecimiento apoyan el rol de los conexones y los panexones como moduladores de procesos fisiológicos en el SNC, tales como el procesamiento de la información visual en la retina (Cenedese et al., 2017; Kamermans et al., 2001; Klaassen et al., 2012), plasticidad sináptica en el hipocampo (Abudara et al., 2018; Cheung et al., 2014; Chever et al., 2014; Rafael et al., 2020), y procesos de memoria y aprendizaje (Prochnow et al., 2012; Stehberg et al., 2012).

#### <u>Neuronas</u>

La expresión de diferentes Cxs en neuronas varía según el estado de desarrollo, el tipo celular y la región del cerebro (Orellana et al., 2009). En todo el SNC, las neuronas muestran una amplia expresión de Cx36 y Cx45; en múltiples estudios se ha determinado que los hemicanales de ambas conexinas son la base de las uniones en hendidura y por lo tanto, de la sinapsis eléctrica (Belluardo et al., 1999; Bennett & Zukin, 2004; Condorelli et al., 1998; Connors & Long, 2004; Contreras et al., 2004; Nagy et al., 2018; O'Brien, 2019; Pereda & Macagno, 2017; Söhl et al., 2005; Zhang & Restrepo, 2002, 2003). La expresión de la Cx57 y la Cx43 se ha detectado en las células horizontales de la retina y en las neuronas del bulbo olfatorio, respectivamente, donde forman uniones gap (Pan et al., 2012; C. Zhang, 2011; C. Zhang & Restrepo, 2003). Existen evidencias de la presencia de conexones funcionales de Cx36 en neuronas; en células cerebelosas granulares en cultivo se observó la liberación de ATP después de la despolarización, la cual fue bloqueada por bloqueantes de Cxs (pero no de Pxs) y por siRNA de la Cx36 (Schock et al., 2008). Los elevados niveles de expresión de Cx36 en interneuronas sugieren que puede funcionar como hemicanales en condiciones fisiopatológicas extremas (Thompson et al., 2008). Las Pxs 1 y 2 se expresan ampliamente en el SNC (Bruzzone et al., 2003; Dvoriantchikova et al., 2012). En neuronas hipocampales sometidas a privación de oxígeno y glucosa se incrementa la apertura de los canales de conductancia individual formados por Px1 (Thompson et al., 2006). Además, la estimulación de los receptores N-metil-Daspartato (NMDA-R) en las neuronas piramidales del hipocampo activa la apertura de canales de Px1 que contribuyen a la actividad epileptiforme convulsiva y la excitotoxicidad (Thompson & MacVicar, 2008; Weilinger et al., 2012).

### Astrocitos

La expresión de las Cxs astrocitarias varía según la región cerebral y el estado de desarrollo (Nagy et al., 2018). En condiciones fisiológicas, los astrocitos de ratas, ratones y humanos expresan abundante Cx30 y Cx43 (Giaume et al., 2010; Kunzelmann et al., 1999; Nagy et al., 1999; Yamamoto et al., 1990). La expresión en los astrocitos de Cx43 ocurre tanto in vitro (Bennett et al., 2003, 2012; Dermietzel et al., 1991; Garré et al., 2010; Giaume et al., 2010; Koulakoff et al., 2008; Kunzelmann et al., 1999) como ex vivo (Abudara et al., 2015; Chever et al., 2014, 2016; Orellana et al., 2011 a,b; Yamamoto et al., 1990). La expresión y la funcionalidad de la Cx43 en astrocitos es modulada por la actividad neuronal y por receptores neuronales (Koulakoff et al., 2008; Rouach et al., 2008). La ablación de la Cx43 reduce el acoplamiento entre los astrocitos del hipocampo en un 50%, mientras que la eliminación de Cx30 y Cx43 lo elimina por completo (Gosejacob et al., 2011). Las uniones en hendidura de Cx43 median la propagación de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> entre células (Cotrina et al., 1998; Langer et al., 2012; Scemes et al., 1998; Wallraff et al., 2006) participando, por lo tanto, en el amortiguamiento del K<sup>+</sup>, el mantenimiento del potencial de la membrana neuronal y en la coordinación de grandes poblaciones de astrocitos; todos estos procesos son críticos para la transmisión sináptica neuronal (Chever et al., 2014, 2016; Pannasch et al., 2011, 2014). Además, las uniones gap de Cx43 proveen una ruta inter-astrocitaria para el tráfico de glucosa y lactato que permite la distribución de metabolitos energéticos desde los vasos sanguíneos hasta neuronas distales (Ball et al., 2007; Rouach et al., 2008). Los astrocitos tradicionalmente fueron descritos como células de soporte del SNC; evidencias actuales determinaron que son moduladores activos de la transmisión y de la plasticidad sináptica. En compañía de las neuronas pre y post-sinápticas, los astrocitos establecen la "sinapsis tripartita" (Araque et al., 1999; Cheung et al., 2014; Perea et al., 2009). En esta estructura funcional, los astrocitos monitorean momento a momento la actividad sináptica por medio de receptores de neurotransmisores presentes en su membrana (Abudara et al., 2018; Anderson & Nedergaard, 2003; Araque et al., 1999; Cheung et al., 2014; Hawkins & Davis, 2005; Koehler et al., 2009; Leybaert, 2005; Orellana et al., 2009; 2011a; Perea et al., 2009). La activación de los receptores dispara una cascada de segundos mensajeros que culmina con la liberación de compuestos neuroactivos de origen glial (gliotransmisores) que potencian o reducen la fuerza sináptica (Araque et al., 1999; Cheung et al., 2014). Los astrocitos en sus pies terminales contactan con los elementos del sistema vascular (Simard et al., 2003), la gliotransmisión astrocitaria a nivel endotelial induce la liberación de factores vasoactivos vinculando las necesidades neurales con la entrega de nutrientes y energía (Magistretti & Allaman, 2015). Los conexones y los panexones emergen como rutas alternativas no vesículares para el eflujo de gliotransmisores parácrinos (Abudara et al., 2018; Stehberg et al., 2012; Vázquez et al., 2015; Walrave et al., 2016), tales como el ATP (Cheung et al., 2014; Huang et al., 2012; Orellana, et al., 2011 a,b; Stout et al., 2002), el glutamato (Cheung et al., 2014; Orellana et al, 2011 b; Stridh et al., 2008; Ye et al., 2003) y la taurina (Stridh et al., 2008; Tachikawa et al., 2020), con potenciales consecuencias para la función cerebral in vivo (Iglesias et al., 2009; Kang et al., 2008; Stout et al., 2002; Stridh et al., 2008; Ye et al., 2003). Concordantemente, se ha demostrado que los astrocitos liberan vía hemicanales de Cx43, prostaglandina E<sub>2</sub> que actúa como un potente vasodilatador arteriolar (Burra & Jiang, 2009; Orellana et al., 2011 a; Siller-Jackson et al., 2008; Ujiie et al., 2003; Zonta et al., 2003 a,b). La eliminación específica de Cx30 y de Cx43 de astrocitos demostró la importancia de ambos tipos de Cxs en la permeabilidad de la BHE. La doble eliminación de Cx43 y Cx30 astrocitaria conduce a hinchazón de los pies de los astrocitos en forma sistémica y una mayor permeabilidad de la BHE (Bennett et al., 2003; Kam et al., 1998). Cuando los cerebros nulos en Cx30/Cx43 fueron sometidos a una presión hidrostática elevada y a "sheer stress" se encontró un incremento en la permeabilidad a la sacarosa y una mayor extravasación (Ezan et al., 2012). Los conexones no son los únicos canales implicados en la señalización autócrina y parácrina astrocitaria. Los astrocitos también liberan ATP y glutamato a través de panexones de Px1. La liberación de ATP al espacio extracelular por canales de Pxs y/o Cxs activa receptores purinérgicos (P2X y P2Y). Esta regulación por neurotransmisores y gliotransmisores, desempeña un papel clave en el funcionamiento del acoplamiento neuro-vascular (Orellana et al., 2011 a,b).

### Sistema vascular

La expresión de Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 y Cx45 se ha detectado en la pared de los vasos sanguíneos (Figueroa & Duling, 2008; Hill et al., 2002; Okamoto et al., 2009; Severs et al., 2001; van Kempen et al., 1995; Van Kempen & Jongsma, 1999). El patrón de expresión de conexina en la vasculatura es variable y se asocia al tamaño del vaso, del territorio vascular y de la especie (Figueroa et al., 2004; Hill et al., 2002; van Kempen et al., 1995; Van Kempen & Jongsma, 1999). Las células endoteliales expresan la Cx37 y la Cx40 (Figueroa & Duling, 2008; Gabriels & Paul, 1998; Kwak et al., 2002; Severs et al., 2001; Simon & McWhorter, 2002; Van Kempen & Jongsma, 1999). En la circulación cerebral, la Cx40 se encuentra principalmente en el endotelio y la Cx37

tanto en endotelio como en las células del músculo liso (Haddock et al., 2006; Ujiie et al., 2003). La Cx43 no está restringida a un tipo de célula específica (Gabriels & Paul, 1998; Little et al., 1995; Severs et al., 2001; Van Kempen & Jongsma, 1999), pues se ha encontrado en las células del músculo liso de los vasos sanguíneos periféricos (Van Kempen & Jongsma, 1999) y en células endoteliales de los vasos cerebrales (Haddock et al., 2006; Ujiie et al., 2003; Virgintino et al., 2001). La Cx45, sin embargo, solo se ha observado en las células del músculo liso y se expresa principalmente en el cerebro (Hashimoto et al., 2012; Li & Simard, 1999, 2001, 2002). Las conexinas expresadas en el endotelio están involucradas en la estructura operativa de la BHE mediante la formación de uniones gap entre las células de la BHE (Ivanova et al., 2017, 2019; Kovacs-Oller et al., 2020 a,b). La Cx40 o la Cx43 aparecen en las uniones estrechas co-localizadas junto a las proteínas ocludina, claudina-5 y zónula ocludens-1 (ZO-1) (Figueroa et al., 2004; Nagasawa et al., 2006). En células endoteliales de la BHE, bloqueantes de las uniones gap redujeron la resistencia eléctrica trans-endotelial aumentando la permeabilidad paracelular al manitol (Nagasawa et al., 2006). También se ha demostrado la participación de hemicanales de Cxs de las células endoteliales en funciones vasculares. El bloqueo de conexones en cultivos endoteliales de cerebro mediante carbenoxolona, Gap27 (un péptido mimético del segundo loop extracelular de Cx37 y Cx43) y el silenciamiento con siRNA de Cx37 y Cx43 inhibieron las oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> entre las células endoteliales y el consiguiente aumento de la permeabilidad de la BHE activado por el agente proinflamatorio bradiquinina (De Bock et al., 2011). Las células endoteliales juegan un papel central en la regulación del tono vasomotor, liberando moléculas vasodilatadoras como NO y prostaglandinas (Begandt et al., 2017). El NO puede inducir la apertura de conexones formados por las conexinas vasculares Cx37, Cx40 y Cx43 (Begandt et al., 2017; Dietrich et al., 1996; Simard et al., 2003). Múltiples reportes muestran que las células endoteliales pueden liberar ATP por conexones (Bao et al., 2004; Braet et al., 2003; Kagansky et al., 2001; Tachikawa et al., 2020; Thompson et al., 2006; Zonta et al., 2003 a,b). El ATP liberado por conexones sincroniza las células endoteliales de los vasos y genera oscilaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> entre ellas mediante aumento del IP<sub>3</sub> (Braet et al., 2003).

Para el caso de las panexinas, la expresión es heterogénea a lo largo del árbol vascular y parece depender del tamaño del vaso y del territorio vascular (Good et al., 2018; Locovei et al., 2006 a,b; Lohman et al., 2012). La Px1 se expresa en el endotelio de los conductos y vasos de resistencia de todos los territorios vasculares, y de los capilares cerebrales (Begandt et al., 2017; Gaete et al., 2014,

2019; Lohman et al., 2012; Tachikawa et al., 2020). En las células del músculo liso, esta proteína solo se ha detectado en arterias y arteriolas pequeñas (Billaud et al., 2011; Burns et al., 2012; Lohman et al., 2012). La expresión de Px2 y Px3 parece estar restringida al músculo liso y al endotelio de los pequeños vasos (Gaete et al., 2014; Johnstone et al., 2012; Lohman et al., 2012). Las células endoteliales y las células del músculo liso vascular liberan ATP vía panexones funcionales (Billaud et al., 2011; Gödecke et al., 2012; Good et al., 2018; Lohman et al., 2012; Lohman & Isakson, 2014). La liberación de ATP endotelial se ha observado durante cambios en el flujo sanguíneo involucrados con el "sheer stress" (Burnstock, 2007), y ocurriría a través de panexones de Px1 los cuales clasicamente son descritos como mecanosensibles (Bao et al., 2004). Actualmente, se ha determinado que la apertura de los panexones depende de la activación de receptores mecánicos del tipo Piezo (Lopez et al., 2020; 2021). Las purinas liberadas a través de los panexones/conexones del endotelio y de las células del músculo liso se han implicado en el control del tono vascular, el flujo sanguíneo y las respuestas inflamatorias cerebrales (Begandt et al., 2017; Billaud et al., 2011; De Lalio et al., 2019; Good et al., 2018; Lohman et al., 2015). La respuesta vasoconstrictora iniciada por los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos en arterias y arteriolas parece ser muy compleja y también implica la señalización autócrina mediada por la liberación de ATP a través de panexones (Begandt et al., 2017; Chiu et al., 2017; De Lalio et al., 2019; Isakson & Thompson, 2014). En la arteria mesentérica, Billaud y colaboradores demostraron que la estimulación mediante adrenalina o noradrenalina de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos conduce a la apertura de los panexones proporcionando una vía para la liberación de ATP. El ATP contribuye, en gran medida a la vasoconstricción a través de la activación de los receptores P2Y. Estos resultados fueron validados tanto farmacológicamente como utilizando arterias de ratones deficientes en la Px1 en las células del músculo liso (Billaud et al., 2011, 2012; De Lalio et al., 2019).

También receptores purinérgicos (P2) son expresados a nivel *abluminal* de las células endoteliales cerebrales, los cuales son sensibles a las concentraciones locales de ATP producido por células astrogliales y perivasculares, mientras que receptores purinérgicos expresados en el sitio luminal de la BHE son estimulados por nucleótidos procedentes de células sanguíneas o producidos por células endoteliales propias (Osipova et al., 2018). El aumento de la concentración extracelular de ATP no solo desencadena la activación de los receptores P2 por el propio ATP, sino también de receptores P1 indirectamente por la hidrólisis de ATP a adenosina, que se propuso mediaría la vasodilatación inducida con acetilcolina (ACh) (Grammas, 2000). De hecho, las células endoteliales cerebrales

demuestran sensibilidad a la adenosina (Sipos et al., 2000) que es un conocido "abridor" de la BHE (Bynoe et al., 2015). Finalmente, las células endoteliales cerebrales expresan varios subtipos de receptores para la adenosina cuya activación resulta en la elevación de la permeabilidad de la BHE (Carman et al., 2011).

### <u>Pericitos</u>

Los pericitos expresan Cx43 (Ivanova et al., 2017, 2019; Larson et al., 1990) y Cx37 (Ivanova et al., 2017, 2019; Zhang et al., 2006) y, en cultivos, se comunican con el endotelio a través de uniones en hendidura de Cx43 (Cuevas et al., 1984; Díaz-Flores et al., 2009; Larson et al., 1987; 1990). En la retina, la Cx37 se expresa en la membrana tanto de células murales como endoteliales a lo largo de todo el árbol vascular (Ivanova et al., 2017, 2019). A nivel capilar estudios in vivo determinaron que los pericitos forman uniones comunicantes a través de canales de Cx43 entre sí (Ivanova et al., 2019; Alarcon-Martinez et al., 2020) y con las células endoteliales (Ivanova et al., 2019), proponiendo la base para la propagación de una respuesta vasomotora (Ivanova et al., 2017). Al igual que en las células endoteliales, en los pericitos la Cx43 aparece expresada junto con los componentes de las uniones estrechas (claudina 5) y en menor medida con los contactos de adherencia. Estudios funcionales en los cuales se inyectó neurobiotina (trazador que permea uniones gap) en un pericito pericapilar de retina muestra que esta se transfería principalmente a través de las células endoteliales sugiriendo que la señal vascular se propaga predominantemente a través de las uniones gap (Ivanova et al., 2019; Kovacs-Oller et al., 2020a). Estos resultados son concordantes con la evaluación eléctrica de la conectividad vascular realizada por Puro y col., quienes encontraron que la mayor parte del voltaje generado por el pericito se transmite al endotelio subyacente (Puro, 2012); resultados similares se obtuvieron en otros sistemas (Emerson & Segal, 2000; Segal & Jacobs, 2001). Se ha demostrado que las uniones gap de Cx43 entre pericitos y células endoteliales se encuentran reducidas en patologías como la diabetes (Ivanova et al., 2017; Li et al., 2003; Oku et al., 2001). Estudios pioneros efectuados por Kawamura y col., en el año 2003, demostraron que los mediadores ATP y UTP generaban despolarización de la membrana, influjo de Ca<sup>2+</sup> y contracción pericitaria mediante activación de receptores P2X7, resultando en una contracción del capilar subyacente. Estos autores determinaron que las células se encontraban acopladas por uniones gap, y que la despolarización local inducida por el ATP se propagaba electrotónicamente a lo largo del microvaso. Sin embargo, una exposición continua al ATP generaba un desacoplamiento de las uniones gap de

las células microvasculares limitando la región de despolarización y contracción (Kawamura et al., 2003). Mediante hibridación *in situ* se evidenció la expresión de Cx30 en una pequeña proporción de células PDGFβr positivas de todo el cerebro, lo que representa un subtipo de pericitos (Mazaré et al., 2018). Recientemente, mediante análisis transcripcional se ha determinado que los pericitos expresan ARN mensajero para la Px1 (He et al., 2016, 2018; Vanlandewijck et al., 2018).

### Coordinación de la respuesta entre los pericitos y las células vecinas a través de uniones gap

Estudios electrofisiológicos realizados en la micro-vasculatura de retina han demostrado que los pericitos peri-capilares están acoplados eléctricamente con los miocitos de las arteriolas precapilares formando una unidad funcional, estableciendo vías de comunicación bidireccional entre ambas células (Matsushita & Puro, 2006; Oku et al., 2001; Wu et al., 2006; Wu et al., 2003; Zhang, 2011). Fernandez-Klett y col., proponen que los pericitos generan un control espacial del FS por medio de cambios lentos y estables del tono contráctil; estos cambios afectarían las propiedades funcionales de la red capilar y restringirían la propagación de la hiperemia funcional, para que coincidan los cambios en el FS con las neuronas activas (Fernández-Klett, F & Priller, J., 2015). En retinas aisladas se ha demostrado que las uniones en hendidura (gap) juegan un rol en la comunicación de los pericitos con el endotelio vascular capilar (Ivanova et al., 2017). Recientemente, se han caracterizado en la microvasculatura de retina, regiones especializadas en las cuales las células endoteliales y los pericitos se comunican mediante uniones gap formadas por Cx43. La estimulación electrofisiológica de los pericitos de estas regiones promovió un acoplamiento fuerte y exclusivo de las células endoteliales vecinas a lo largo de la rama vascular correspondiente. La respuesta vasomotora fue impulsada por un preciso y discriminatorio mapa de conectividad mediada por uniones gap entre células advacentes: pericitos y células endoteliales >> pericitos y las células de músculo liso arteriolar >> pericitos y glía / pericitos y neuronas; en el último grupo prácticamente no se detectó acoplamiento con los pericitos (Ivanova et al., 2019; Kovacs-Oller et al., 2020 b). Este mapa de conectividad es capaz de acomodarse dinámicamente frente a variaciones en la entrada sensorial (Kovacs-Oller et al., 2020 a,b). Resultados recientes determinaron que los pericitos retínales se conectan entre sí mediante estructuras huecas "nanotubulares" que expresan α-SMA, y presentan organelos y mitocondrias. La electroporación de trazadores y medición de Ca2+ en los nanotúbulos determinó la existencia de comunicación bidireccional entre los pericitos conectados; empleando agentes farmacológicos e inmuno-marcaje los autores demostraron que la base funcional de dicho transporte estaba conformada por uniones *gap* de Cx43. Mediante estimulación lumínica se estableció que los pares de capilares conectados por nanotúbulos interpericitarios exhiben respuestas opuestas: un capilar se dilata y aumenta el flujo sanguíneo, mientras que el otro se contrae para disminuir disponibilidad de sangre. La respuesta contráctil a la estimulación lumínica fue sustancialmente más rápida en los capilares que en las arteriolas (Alarcón- Martínez et al., 2020). A la fecha no se ha reportado la expresión de conexones y/o panexones funcionales en la membrana

de los pericitos, que vinculen el interior de estas células íntimamente relacionadas con el capilar con el medio extravascular circundante donde residen neuronas, microglia y astrocitos.

## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

## 2.1- Hipótesis de trabajo

En función de las referencias teóricas antes presentadas la hipótesis de trabajo para esta tesis establece que, los pericitos ubicados estratégicamente en la interfaz sangre-cerebro actuarían como células integradoras de la información de las necesidades metabólicas del entorno para generar una respuesta vascular. Postulamos que los pericitos expresarían canales de gran poro formados de conexinas y/o panexinas funcionales, que actuarían junto con otras vías como sensores de las señales liberadas por las neuronas y los otros componentes de la UNV. De esta forma, el estado funcional de estos canales pericitarios regularía la liberación de ATP generando variaciones del nivel de calcio intracelular y del tono contráctil pericitario. Modificaciones en el tono contráctil pericitario producirían variaciones del calibre capilar, el flujo sanguíneo y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a nivel de la microvasculatura para satisfacer las demandas metabólicas cerebrales.

## 2.2- Objetivo General

El objetivo general de esta tesis es determinar si los pericitos pericapilares expresan hemicanales de Cx43 (conexones o HC-Cx43) y/o canales de Px1 (panexones) funcionales en el hipocampo de ratón. En este marco, determinaremos las vías de regulación de estos canales y su rol en condiciones basales, en presencia de neurotrasmisores y sustancias vasoactivas, y sobre la performance cognitiva.

## 2.3- Objetivos específicos

## 1- Determinar la identidad celular de los pericitos en el árbol capilar del hipocampo mediante el fluoróforo TO-PRO<sup>TM</sup>-3 Iodide (642/661)

a) Caracterizar la población celular identificada con el marcador TO-PRO-3.

b) Determinar si los pericitos identificados con TO-PRO-3 expresan la proteína contráctil α-SMA.

c) Evaluar la asociación anatómica de la población de pericitos trazados con TO-PRO-3 con los elementos de la UNV (endotelio, lámina basal, luz capilar, astrocitos, neuronas).

d) Caracterizar los mecanismos que subyacen el ingreso de TO-PRO-3 a través de la membrana del pericito.

## 2- Determinar si los pericitos interactúan con el microentorno extracelular cerebral a través de canales de membrana funcionales de Cx43 y/o Px1 en condiciones basales

a) Establecer la identidad molecular de los canales de membrana de gran poro (Cx43 y/o Px1) expresados por los pericitos del hipocampo que permiten la comunicación con su microentorno en condiciones *ex vivo*.

b) Establecer la identidad molecular de los canales de membrana de gran poro (Cx43 y/o
Px1) a través de los cuales los pericitos del hipocampo interactúan con su microentorno en condiciones *in vivo* en el animal despierto.

## 3- Caracterizar los mediadores y los receptores que subyacen la funcionalidad de los panexones y/o conexones en los pericitos pericapilares en condiciones basales

a) Determinar si el ATP modula la funcionalidad de los canales de Cx43 y/o Px1 expresados en los pericitos.

b) Establecer si la activación de receptores purinérgicos ionotrópicos ( $P2X_7$ ) y/o metabotrópicos ( $P2Y_6$ ) media el efecto modulador del ATP sobre la actividad de los panexones y/o conexones en los pericitos.

## 4- Determinar si la neurotransmisión glutamatérgica modula el intercambio de los pericitos con su microentorno mediante canales de gran poro

a) Determinar si el neurotransmisor excitatorio glutamato regula la funcionalidad de los canales de membrana pericitarios formados por Cx43 y/o por Px1.

b) Caracterizar los receptores glutamatérgicos neuronales involucrados en la regulación del intercambio mediado por canales de Px y/o Cx pericitarios.

5- Investigar si los agentes vasoactivos y moduladores del tono pericitario, regulan la actividad de los canales de gran poro de membrana formados por Cx43 y/o por Px1 en condiciones ex vivo

- a) Caracterizar el efecto de los agentes vasoconstrictores: ATP y noradrenalina
- b) Determinar el efecto de los agentes vasodilatadores: acetilcolina y prostaglandina E2

## 6- Establecer el rol de los canales de gran poro funcionales de Cx43 y/o Px1 pericitarios en la regulación del diámetro capilar

- a) ante la activación de receptores glutamatérgicos
- b) en presencia de agentes vasoactivos: ATP, noradrenalina y acetilcolina

7- Establecer el rol de los canales funcionales de Cx43 y/o Px1 pericitarios en procesos de memoria y aprendizaje in vivo

## 3. MATERIALES y MÉTODOS

## 3.1- Animales

En los experimentos de esta tesis se emplearon ratones hembras y machos, mayores a 21 días porque a partir de esta edad presentan desarrollo completo de conexones en la UNV (Ezan et al., 2012) y menores a 45 días para minimizar la presencia de vasos sanguíneos dañados (Mishra et al., 2014). Las cepas de ratones utilizadas fueron las siguientes: 1) cepa C57BL/6J provista por la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE; Facultad de Medicina – UdelaR), y 2) cepa de ratones homocigotos knock-out totales para la panexina1 (Panx1-/-) obtenida a partir de embriones heterocigotos (Panx1<sup>+/-</sup>) donados por la empresa Genetic Engineering Technology (Genentech, Inc.-USA) (Qu et al., 2011). La colonia homocigota de ratones Panx1<sup>-/-</sup> fue generada en la Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio (UBAL) del Instituto Pasteur Montevideo; posteriormente su mantenimiento y su expansión se continuaron hasta la fecha en URBE de la Facultad de Medicina. La cepa Panx1<sup>-/-</sup> presenta una deleción constitutiva del exón 2 del gen de la Px1, generando un corrimiento en el marco de lectura y un codón de parada prematuro lo que resulta en una proteína trunca (Qu et al., 2011). La homocigosis para la Px1 se validó mediante genotipado de los animales por PCR, utilizando los siguientes cebadores: 5'-TGA CCA CAG ACA GCA CTTAAG-3' y 5'- CGT CTGAGA GCT CCC TGG CG-3'. En los animales salvajes la PCR amplifica un fragmento de 651-bp y en los Panx1<sup>-/-</sup> de 335-bp. La colonia Panx1<sup>-/-</sup> se realizó a partir de cruzamientos entre hermanos en URBE, y el mantenimiento de la homocigosis se confirmó rutinariamente mediante genotipado por PCR. La disminución de la expresión de la Px1 en los cerebros de los ratones Panx1<sup>-/-</sup> se determinó por nuestro equipo de investigación mediante inmunofluorescencia en hipocampo. A modo de control positivo evaluamos la expresión de la Px1 en las neuronas en los ratones salvajes ya que presentan elevada expresión de esta proteína (Bruzzone et al., 2003, 2005). La ausencia de actividad de los canales de Px1 pericitarios se evaluó por captación de colorante Etd<sup>+</sup> en presencia de bloqueantes generales y específicos de los conexones y panexones. También se trabajó con la colonia de 3) ratones knock-out condicionales para la Px1 pericitaria (Px1<sup>fl/fl</sup>/PDGFRbeta-P2A-CreERT2 o Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>); estos animales no expresan la proteína Px1 específicamente en los pericitos y se encuentran albergados en la UBAL. Los ratones

Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup> se obtuvieron mediante cruzamiento de dos cepas de ratones adquiridas a Jackson Laboratory: (1) cepa N° 030201 (PDGFRβ-P2A-CreERT2 (B6.CgPdgfrb<tm1.1(cre/ERT2)Csln>/J HET Heterozygous for Pdgfrb<tm1.1(cre/ERT2) Csln), que presenta la recombinasa Cre en homocigosis y su expresión se induce por tamoxifeno bajo la dirección del promotor del gen del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas murino  $\beta$  (Pdgfrb); estos ratones han sido utilizados para la deleción de los genes flanqueados por lox-P por la recombinasa Cre en pericitos (Cuervo et al., 2017), y (2) la cepa Nº 026021 Panx1<sup>fl/fl</sup> (B6;129Casp4<del> Panx1<tm1Vshe>/J), cuyos ratones poseen los sitios loxP de reconocimiento de la Cre recombinasa flanqueando los exones 3 y 4 del gen de la Px1. Cuando estos ratones son cruzados con otros que expresan la Cre recombinasa y se induce la expresión de la misma con tamoxifeno, la descendencia resultante tendrá los exones 3-4 de la Px1 suprimidos en las células que expresan la Cre (en nuestro caso en los pericitos) (Dvoriantchikova et al., 2012; Good et al., 2018). Esta cepa (B6;129Casp4<del> Panx1<tm1Vshe>/J) se ha empleado por otros grupos de investigación para estudiar el rol de los canales de Px1 en la fisiología del SNC (Dvoriantchikova et al., 2012). Mediante PCR se seleccionaron los ratones condicionales (presencia de Cre (Cre<sup>+</sup>)) y sus controles (ausencia de la recombinasa Cre (Cre)). La expresión de la recombinasa (Cre) se indujo mediante inyección intraperitoneal de tamoxifeno (TMX; 2mg/kg i.p) disuelto en aceite de maíz, a razón de 1 dosis/24h por 5 días consecutivos. Las maniobras experimentales se realizaron entre los días 7 y 10 de la última inyección con TMX (tiempo requerido para que ocurra la deleción del exón 3-4 de la Px1) (Cuervo et al., 2017). La ausencia de la proteína Px1 pericitaria se evaluó por inmuno-fluorescencia, y la ausencia de actividad de los canales de Px1 se evaluó por captación de colorante Etd<sup>+</sup> en presencia de bloqueantes generales y específicos de los conexones y panexones. A los ratones control Cre- se les efectuaron los mismos procedimientos de inducción con tamoxifeno y de experimentación que los condicionales Cre<sup>+</sup>.

## 3.2- Consideraciones éticas

Los procedimientos experimentales en los animales fueron ejecutados por Sandra Mai acreditada para el uso y manejo de animales en la categoría B (Comisión Honoraria de Experimentación Animal, UdelaR). Se procedió en acuerdo a las normativas éticas vigentes a nivel nacional organizadas en la Ordenanza Universitaria "Uso de animales en experimentación, docencia e investigación Universitaria", CDC Exp. 4332/99, Diario Oficial Nº 25467, Feb. 21/00, UdelaR, http://www.csic.edu.uy/chea. El protocolo de experimentación para este proyecto fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Medicina por resolución fechada el 17/5/2019 (validez por 5 años) y puede localizarse con el Número de Expediente: Exp. Nº 070153-000045-19.

## 3.3-Reactivos y sales

Reactivo	Procedencia	Descripción
A804598	Sigma Aldrich cas. no. 1125758-85-1	Agonista selectivo y competitivo del receptor P2X7
Aceite de Maiz	Sigma-Aldrich cas no. 8001-30-7	Disolvente del Tamoxifeno
Acetilcolina Bitartrato	Sigma-Aldrich cas. no. 50-31-1	Agente vasoactivo
Ácido Ascórbico	Sigma-Aldrich cas. no. 50-81-7	Agente antioxidante
Ácido Cítrico Monohidratado	Sigma-Aldrich cas. no. 5949-29-1	Utilizado para recuperación antigénica en inmuno-fluorescencia
Ácido L-glutámico	Sigma-Aldrich cas. no. 56-86-0	Agonista de los receptores glutamatérgicos
Adenosina 5'-Trifosfato (ATP)	Sigma-Aldrich cas. no.74804-12-9	Sal de Mg-ATP, agente vasoactivo, agonista purinérgico
Albúmina de Suero Bovino (BSA)	Sigma-Aldrich cas. no. 048-46-8	Bloqueante de sitios inespecíficos en las técnicas de inmuno-marcaje
AMPA	Research Biochemicals International (RBI) cas. no. G017	Agonista de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA
Apirasa (Apy)	Sigma-Aldrich cas. no.9000-95-7	Nucleasa que hidroliza el ATP
Bicarbonato de Sodio	TOCRIS cas. no. 3152	Sal para preparación de ACSF y soluciones
Bromuro de Etidio (Etd <sup>+</sup> )	Sigma-Aldrich cas. no. 1239-45-8	Agente intercalante de los ácidos nucleícos, utilizado para evaluar la permeabilidad celular por conexones y panexones.
Carbenoxolona (CBX)	Sigma-Aldrich cas. no. 7421-40-1	Inhibidor no selectivo de uniones gap y conexones formados de Cxs y de canales de Px1
Cloruro de Calcio	Mallinckrodt cas. no. 10035-04-8	Sal para preparación de ACSF
Cloruro de Potasio	Sigma-Aldrich cas. no.7447-40-7	Sal para preparación de ACSF y PBS
Cloruro de Sodio	Sigma-Aldrich cas. no. 7647-14-5	Sal para preparación de ACSF
CNQX (cyanquixaline)	Sigma-Aldrich cas. no. 115066-14-3	Antagonista de receptores glutamatérgicos de tipo AMPA/Kainato
CPP((±)-3-(2-Carboxypiperazin-4- yl)propyl-1-phosphonic acid )	Sigma-Aldrich cas. no. 100828-16-8	Antagonista de receptores de glutamato de tipo NMDA
DAPI	Sigma-Aldrich cat. no. D09542	Marcador de núcleos celulares
Dextrano 70S asociado a fluoresceína isotiocianato (FITC- Dextran 70S 70,000; FD 70S)	Sigma- Aldrich cat. no. 46945	Evidencia vasos sanguíneos cuando se inyecta por vía intravenosa
Evans Blue	Sigma-Aldrich cas. no. 314-13-6	Administrado por vía intravenosa para visulizar los vasos sanguíneos
Fosfato de sodio di básico anhidro	Carlo Erba y Sigma-Aldrich cas. no. 7558-79-4	Utilizado para soluciones de ACSF y PBS
Fosfato de Potasio di-hidrogenado	Carlo Erba cas. no. 7778-77-0	Sal para preparación de ACSF y PBS

Fosfato de Sodio monobásico	Sigma-Aldrich	Sal para preparación de ACSF y PBS	
(monohidratado)	cas. no.10049-21-5		
Gelatina	Applichem cas. no. A1693	Utilizado para preparar bloques de gelatina para seccionar las rodajas agudas de hipocampo	
Glicerina	Droguería Industrial Uruguaya	Medio de montaje	
Glicina	Sigma-Aldrich cas. no. 56-40-6	Utilizada en las soluciones de bloqueo de inmuno fluorescencia	
Glucosa	Carlo Erba cas. no. 5996-10-1	Para preparación de ACSF	
Hoechst 33342	Abcam y Sigma Aldrich cas. no. 23491-45-4	Marcador nuclear tanto en tejido vivo como fijado	
Jasplakinolide	Abcam cas.no. 102396-24-7	Estabilizador de los filamentos de actina	
Lectina de Bandeiraea simplicifolia (Griffonia.simplicifolia)- conjugada con fluoresceina. (IB4-FITC o FITC-ISOB4)	Sigma-Aldrich cat. no. L2895	Marcador de membranas basales del endotelio y de los pericitos	
Lectina de <i>Lycopersicon</i> <i>Esculentum</i> (Tomato) Dye-Light 488 (Tomato-Lectina)	Life Thermo Fisher Scientific cat. no. L32470	Marcador de membranas basales del endotelio y de los pericitos	
MRS 2578	Sigma-Aldrich cas. no. 711019-86-2	Agonista selectivo y potente del receptor purinérgico metabotrópico P2Y <sub>6</sub>	
Neurotrace <sup>™</sup> 500/525 Green Fluorescent Niss	Life Thermo Fisher Scientific cat. no. N21480	Marcador neuronal en tejido fijado y marcador pericitario en tejido vivo.	
Norepinefrina/Noradrenalina bi-tartrato	Sigma-Aldrich cas. no. 3414-63-9	Agente vasoconstrictor	
Paraformaldehído (PFA)	Droguería Industrial Uruguaya	Agente fijador tisular preparado al 4% en PBS; pH 7.4	
Péptido mimético <sup>10</sup> Panx 1	GenScript cat. no. 707231s	Péptido mimético que bloquea los panexones de Px1	
Péptido mimético Gap 19	GenScript cat. no. U8179BD010_1	Péptido mimético que bloquea los HC-Cx43	
Péptido mimético Gap 26	GenScript cat. no. RP20274	Péptido mimético que bloquea los HC-Cx43 y las uniones gap de Cx43	
Poli-D-Lysina	Sigma-Aldrich cas. no. 27964-99-4	Utilizado para favorecer la adhesión de rodajas de hipocampo al fondo de la cámara de perfusión	
PPADS Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'- disulfonic acid tetrasodium salt	Sigma-Aldrich cas. no. 192575-19-2	Antagonista no selectivo de los receptores purinérgicos ionotrópicos (P2X)	
Probenecid (PBD)	Life Thermo Fisher Scientific cat.no. P36400	Inhibidor de los canales de Px1 pero no de los HC-Cxs	
Prostaglandina E2 (PGE <sub>2</sub> )	Abcam cas. no. 363-24-6	Agente vasodilatador	
Reactive Blue 2 (RB2)	Sigma-Aldrich cas. no. 12236-82-7	Antagonista no selectivo de los receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y	
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	Carlo Erba cas. no. 10034-99-8	Utilizado para preparar ACSF	
TO-PRO <sup>TM</sup> -3 Iodide (642/661)	Life Thermo Fisher Scientific. cat.no. T3605	Marcador nuclear en tejido fijado y marcador pericitario en tejido vivo	
Tamoxifeno (TMX)	Sigma-Aldrich cas. no. 85256	Inductor de la expresión de la recombinasa Cre.	
Tritón R X-100	Applichem cas. no. 5996-10-1	Detergente no iónico y emulsificante para permeabilizar las membranas celulares	

#### Tabla 1- Información sobre los reactivos y las sales que se emplearon en esta tesis

## 3.4- Gases

Se utilizó gas carbógeno (95%  $O_2$  - 5%  $CO_2$ ) para oxigenar los tejidos y mantener el pH en torno a 7.3-7.4 en el líquido cefalorraquídeo artificial (ASCF). El carbógeno fue adquirido en las empresas de plaza Linde- AGA y/o Praxair.

## 3.5- Obtención de rodajas agudas de hipocampo

Para cumplir los objetivos de esta tesis empleamos rodajas agudas de hipocampo, preparación por excelencia para estudios ex vivo de la funcionalidad cerebral (Abudara et al., 2015; Dailey et al., 2011; Hall et al., 2014; Lacar et al., 2012; Nakagawa et al., 2009; Rouach et al., 2008). Este preparado preserva los circuitos neuronales y las interacciones neuro-glio-vasculares, al tiempo que nos permite administrar y controlar la concentración final de las sustancias y realizar maniobras experimentales (Abudara et al., 2015; Dailey et al., 2011; Nakagawa et al., 2009; Rouach et al., 2008). Las rodajas agudas de hipocampo se obtuvieron mediante protocolo publicado previamente (Pannasch et al., 2012), los pasos principales se detallan a continuación. Los ratones fueron sacrificados y luego decapitados, sus hemi-cerebros fueron removidos rápidamente del cráneo y sumergidos en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) frío a 4ºC, oxigenado y equilibrado con carbógeno (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>). La composición del ACSF en mM fue: NaCl 134, KCl 2.8, NaHCO<sub>3</sub> 29, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1, Glucosa 12, MgSO<sub>4</sub> 1.5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, pH 7.3-7.4. Los hipocampos se disecaron y se colocaron sobre un bloque de gelatina, el cual se adhirió con cemento a la platina de la cámara de sección la cual se rellenó con ACSF frío equilibrado con carbógeno. Las rodajas de 200-300µm de espesor se obtuvieron mediante cortes transversales de los hipocampos utilizando el vibrátomo Campeden Instrument LTD (England). Las rodajas obtenidas fueron transferidas a una malla plástica de una cámara conteniendo ACSF equilibrado con carbógeno a temperatura ambiente (RT) donde se estabilizaron por 30-45min (Dailey et al., 2011; Pannasch et al., 2012).

# 3.6- Identificación de los pericitos con TO-PRO<sup>™</sup>-3 Iodide (624/661) en rodajas de hipocampo

Se utilizó el protocolo previamente publicado (Lacar et al., 2012) con modificaciones (Mai-Morente et al., 2020; Mai-Morente et al., 2021). Las rodajas agudas de hipocampo fueron incubadas en ACSF equilibrado con carbógeno conteniendo el marcador nuclear fluorescente TO-PRO-3 (10µM) por 20min a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, las rodajas se lavaron en ACSF equilibrado con carbógeno para detener la captación de la sonda y reducir el fondo. Luego del lavado las rodajas se fijaron en agitación a RT en paraformaldehído (PFA 4% en PBS en tampón fosfato salino; pH 7.4; 40min). Por último, las rodajas fijadas se lavaron tres veces en PBS (pH 7.4) por 10min cada vez en agitación y se incubaron en DAPI (1-5 µM en PBS con 0.5% Triton X-100 (PBS-T); 10-20min) para marcar los núcleos; las rodajas se montaron en glicerina para luego ser analizadas mediante microscopía confocal. Para la identificación pericitaria, también se realizaron ensayos en rodajas hipocampales con TO-PRO-3 y NeuroTrace 500/525; este marcador fluorescente de Nissl usualmente se utiliza para marcar neuronas fijadas pero recientemente se ha demostrado que es capaz de identificar pericitos en tejido vivo (Damisah et al., 2017). En estos experimentos las rodajas agudas hipocampales se incubaron primero en ACSF equilibrado con carbógeno con la sonda NeuroTrace 500/525 (dosis entre 1:25 y 1:500 por 20min), luego se lavaron por 15-20min y se incubaron en ACSF equilibrado con carbógeno en presencia de TO-PRO-3 (10µM por 20min). Para marcar los núcleos en las células vivas, las rodajas se incubaron en ACSF equilibrado con carbógeno en presencia de Hoechst (2µg en 10ml por 15 -20min). En estos ensavos las rodajas cargadas con TO-PRO-3, NeuroTrace 500/525 y Hoechst se transfirieron a una cámara de perfusión cuyo fondo (constituído por un cubreobjeto; Nr 1.5) fue pre-tratado con poli-lisina (0.1mg/ml) para adherir las rodajas al mismo. La cámara conteniendo la rodaja se montó sobre la platina del microscopio confocal Leica SP5 y el preparado fue perfundido con ACSF equilibrado con carbógeno a temperatura ambiente a una velocidad de flujo constante de 1ml/min. Para determinar la contribución de los canales formados por conexinas y panexinas en la captación de TO-PRO-3 a través de la membrana pericitaria, se procedió a incubar las rodajas agudas de hipocampo en ACSF con TO-PRO-3 en presencia de: a) carbenoxolona (CBX) un inhibidor general de HC-Cxs, uniones gap y panexones (Pelegrin & Surprenant, 2006; Willebrords et al., 2017) o b) el péptido mimético de la Px1 (<sup>10</sup>Panx1), un bloqueante específico de panexones (Pelegrin & Surprenant, 2006; Thompson & MacVicar, 2008). La CBX fue preparada en concentración de 10mM en suero fisiológico (solución madre) y se utilizó en concentración final de 100 $\mu$ M, mientras que el péptido <sup>10</sup>Panx1 se disolvió directamente en el ACSF a 150 $\mu$ M de concentración final. Para establecer si el ingreso de TO-PRO-3 a los pericitos está mediado por panexones, la captación de TO-PRO-3 se llevó adelante en rodajas de ratones *knock-out* globales para la panexina1 (Panx1<sup>-/-</sup>) y condicionales para la Px1 pericitaria. Con el fin de evidenciar si el mecanismo de ingreso de TO-PRO- 3 a los pericitos es activo o pasivo, se realizaron ensayos de captación de TO-PRO-3 en rodajas agudas de hipocampo a 20°C y a 30°C y se determinó el coeficiente de temperatura Q10, que es la tasa de cambio en la captación de TO-PRO-3 en los pericitos es mediada por transportadores estudiamos la cinética de la captación del colorante exponiendo el preparado a distintas concentraciones de TO-PRO-3.

## 3.7- Técnicas de inmunofluorescencia

En rodajas de hipocampo pre-tratadas con TO-PRO-3 y fijadas se bloquearon los sitios inespecíficos y se permeabilizaron las membranas celulares mediante incubación en solución de PBS conteniendo: albúmina de suero bovino (BSA) 2%, glicina 0.2M y 0.5% Triton X-100 durante 2h en agitación suave a RT y bajo protección de la luz. Las rodajas se lavaron 3 veces en PBS-T por 10min cada vez y luego se incubaron por 24h a 4°C o por 2h a RT en agitación suave en la solución PBS-T conteniendo 2% BSA (PBS-T-BSA) en presencia de los siguientes anticuerpos primarios: anti-NG2; anti- PDGFr $\beta$ ; anti- $\alpha$ SMA; anti-GFAP-Cy3<sup>TM</sup>, anti-NeuN; anti-PECAM-1; anti-Px1; anti-Cx43; anti-P2X7 (ver Tabla 2). Para identificar la expresión y la distribución celular de la proteína contráctil alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en los pericitos (células TO-PRO-3<sup>+</sup>), se emplearon tres estrategias experimentales: 1) el método de inmuno-fluorescencia clásico descrito en la sección anterior empleando el anticuerpo primario anti α-SMA; debido a que esta metodología permitió la detección de la α-SMA en un bajo porcentaje de pericitos (Mai-Morente et al., 2020) utilizamos las siguientes estrategias complementarias: 2) las rodajas agudas cargadas con TO-PRO-3, se incubaron en ACSF equilibrado con carbógeno en presencia de jasplakinolide (20µM; 1h) para estabilizar los filamentos de actina de acuerdo a lo reportado previamente (Alarcon-Martinez et al., 2018), luego se lavaron en ACSF y se fijaron en PFA 4% (40min) o en una mezcla de 95% metanol y 5% ácido acético y se realizó el procedimiento de inmuno-fluorescencia antes descrito; 3) en otro grupo de

rodajas cargadas con TO-PRO-3 y fijadas se realizó recuperación antigénica para desenmascarar los epítetos específicos de la  $\alpha$ -SMA. Para ello incubamos las rodajas en buffer citrato de sodio 10mM, pH 6.0 por 20-30min a 80°C (utilizando vaporera). Posteriormente, se procedió a realizar la técnica de inmunomarcaje clásica con el anticuerpo anti  $\alpha$ -SMA (Alarcon-Martinez et al., 2018, 2019). Por último, luego de la incubación con el anticuerpo primario (para cualquiera de las estrategias empleadas) las rodajas se lavaron 3 veces en PBS-T por 10min cada vez y se incubaron en PBS-T-BSA por 2h en la oscuridad a RT y bajo agitación suave con los anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos (Alexa 488 o Cy-3 anti-conejo o anti-ratón). Luego las rodajas se lavaron dos veces en PBS-T por 10 min cada vez y se incubaron en DAPI (1-5 $\mu$ M diluido en PBS-T) por 10-20min, se montaron en glicerina y se analizaron mediante microscopía confocal.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Procedencia	Descripción
anti- PDGFrβ	policional de conejo	1:150	Abcam cat.no.Ab107169 RRID:AB_11156765	Marca el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas $\beta$ presente en pericitos y células de músculo liso vasculares.
anti-NG2	monoclonal de ratón	1:250	Millipore cat.no. MAB5384 RRID:AB_177646	Marca el antígeno neuro-glial proteoglicano condroitín sulfato 2, presente en pericitos y precursores de oligodendrocitos
antia-SMA	monoclonal de conejo	1:300	Abcam cat.no. ab124964 RRID: AB_11129103	Marca la $\alpha$ -actina del músculo liso vascular y de los pericitos
anti-GFAP−Cy3 <sup>™</sup>	monoclonal de conejo	1:400	Sigma-Aldrich cat.no. C9205 RRID: AB_476889	Marca la proteína glial fibrilar ácida astrociaria
anti-NeuN	Monoclonal de conejo	1:200	Abcam cat.no. Ab177487 RRID: AB_2532109	Marca la proteína nuclear específica de neuronas N (NeuN).
anti-PECAM-1/CD31	monoclonal de ratón	1:10	Bogen S.A. University of Iowa cat.no. 2H8 RRID: AB_2161039	Marca la molécula de adhesión del endotelio y plaquetas 1.
anti-Px1	policlonal de conejo	1:50	Sigma-Prestige cat. no. HPA016930, RRID:AB_1854954	Marca la proteína panexina l
anti-P2X7	policlonal de conejo	1: 150	Abcam cat.no. Ab48871 RRID:AB_881835	Marca el receptor purinérgico ionotrópico P2X <sub>7</sub>
anti-Cx43	policlonal de conejo	1:100	Invitrogen cat.no.71-0700 RRID:AB_2533973	Marca la proteína conexina 43
Alexa Fluo 488	anti-conejo	1:1000	Jackson Labs cat.no.711-545-152	Anticuerpo secundario

			RRID: AB_2313584	
Alexa Fluo 488	anti-ratón	1:1000	Jackson Labs	Anticuerpo secundario
			cat.no. 715-545-151	
			RRID: AB_2341099	
Alexa Fluo Cy3	anti-conejo	1:1000	Jackson Labs	Anticuerpo secundario
			cat.no. 111-165-003	
			RRID: AB_2338000	
Alexa Fluo Cy3	anti-ratón	1:1000	Jackson Labs.	Anticuerpo secundario
			cat.no.115-165-003	
			RRID: AB_2338680	

Tabla 2- Información sobre los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmuno-marcaje

## 3.8- Marcaje de los vasos sanguíneos

El espacio intravascular se evidenció mediante administración intravenosa de colorantes impermeables a las membranas celulares: FITC-dextrano (FITC-Dextran-70S MW; 2-4mg/100 µL) (Yardeni et al., 2011) o Evans Blue (30mg/100 µL) diluidos en suero fisiológico. El FITC-dextrano (FITC-Dextran-70S) queda retenido en la microcirculación debido a su gran tamaño, mientras que el Evans Blue se une a la albúmina plasmática quedando retenido a la columna de sangre. Ambos colorantes permiten evidenciar la red vascular sana, ya que en caso de daño se extravasan hacia el parénquima tisular (Saunders et al., 2015). Los marcadores se introdujeron en la luz vascular (Yardeni et al., 2011) por invección retro-orbital 20-30 minutos antes de la obtención de las rodajas (Morris et al., 1999; Simard et al., 2003). Esta maniobra fue realizada por técnicos de URBE en ratones anestesiados con isofluorano (4-5%) con el equipo de anestesia inhalatoria (VETEQUIP impac 6) o con ketamina (50-100mg/kg)-xilacina (10%) intraperitoneal. Los vasos y los pericitos también fueron evidenciados utilizando lectinas como marcadores endoteliales y pericitarios, tales como isolectina B4 conjugada a fluoresceína (IB4-FITC) o Lycopersicon Esculentum (Tomato) lectina conjugada a DyLight 488 (LEL-DyLight 488). Las lectinas presentan gran afinidad por los azúcares presentes en el glicocalix endotelial (Robertson et al., 2015), específicamente la IB4 se une a los residuos  $\alpha$ -D-galactosa de la lámina basal del endotelio (Laitinen, 1987; Peters & Goldstein, 1979) y de los pericitos (Mishra et al., 2014). En estos experimentos las rodajas agudas de hipocampo previamente cargadas con TO-PRO-3 y lavadas, se incubaron a 34-36°C en ACSF equilibrado con carbógeno con IB4-FITC (5µg/ml; 20min-1h) o Tomato-Lectina (5µg/ml; 2030min). Posteriormente, las rodajas se lavaron y se fijaron en PFA 4%, los núcleos se marcaron con DAPI y se montaron en glicerina para ulterior análisis con microscopia confocal.

## 3.9- Técnica de captación de Etd<sup>+</sup> en rodajas agudas de hipocampo

Para confirmar si los pericitos interactúan con el micro-entorno extracelular por medio de canales funcionales de HC- Cx43 y/o de panexones formados por Px1, se utilizó la técnica de captación del colorante, Bromuro de Etidio (Etd<sup>+</sup>), método difundido para evidenciar la actividad de estos canales (Contreras et al., 2002; Giaume et al., 2012); esta técnica además es de uso habitual en nuestro laboratorio. El Etd<sup>+</sup> es un fluoróforo catiónico con un PM de 394g/mol no permeable a través de las membranas celulares que administrado en la solución extracelular, ingresa a las células por medio de canales de gran poro, como los conexones y panexones, cuando se encuentran funcionales en las membranas. Una vez dentro de la célula, el colorante se intercala al ADN y al ARN y emite fluorescencia (longitudes de onda máximas de excitación/emisión de 528 nm / 598 nm); debido a que el Etd<sup>+</sup> se une irreversiblemente a los ácidos nucleicos no hay riesgo de fuga al exterior por difusión a través de la membrana plasmática. Por lo tanto, la cuantificación del nivel de fluorescencia de Etd<sup>+</sup> intracelular es una medida del grado de la funcionalidad/actividad (permeabilidad/apertura) de estos canales (o del número de canales abiertos/activos) en la membrana celular (Abudara et al., 2015; Contreras et al., 2002; Giaume et al., 2012; Orellana et al., 2011 a; Sáez et al., 2010). Para determinar si en condiciones basales los pericitos expresan canales de gran poro, las rodajas agudas de hipocampo pre-cargadas con TO-PRO-3 se incubaron en ACSF equilibrado con carbógeno con Etd<sup>+</sup> (10µM por 20min) protegidas de la luz. Para establecer la naturaleza molecular de los canales implicados en el intercambio molecular entre los pericitos y el medio extracelular, se realizaron ensavos de captación de Etd<sup>+</sup> en presencia de agentes farmacológicos que bloquean canales de Cx43 y Px1. Para ello las rodajas agudas hipocampales de ratones salvajes, Panx1<sup>-/-</sup>, condicionales (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>) y su respectivo control (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>-</sup>) previamente cargadas con TO-PRO-3 se incubaron en ACSF equilibrado con carbógeno conteniendo Etd<sup>+</sup> (10µM; 20min), en presencia de los siguientes bloqueantes de Cxs y Pxs: a) genéricos de conexones y panexones: carbenoxolona (CBX; 100 y 200µM) (Pelegrin & Surprenant, 2006; Willebrords et al., 2017), b) específicos de conexones v uniones gap: lantano (La<sup>3+</sup>; 200µM) (Ma et al., 2009; Retamal et al., 2007; Willebrords et al., 2017) para conexones en general, péptido mimético Gap19 (150µM) para conexones de Cx43 y péptido mimético Gap26 (150μM) para uniones gap y conexones de Cx43 (Evans et al., 2006; Willebrords et al., 2017), c) *específicos de panexones:* péptido mimético <sup>10</sup>Panx1 (150μM) (Evans et al., 2006; Pelegrin & Surprenant, 2006; Thompson & MacVicar, 2008) y probenecid (PBD; 500μM y 2mM) (Ma et al., 2009; Silverman et al., 2008). Para evaluar la participación de las vías purinérgicas en la regulación de la actividad de los panexones/conexones pericitarios se utilizaron los siguientes bloqueantes: *a) apirasa* (Apy, 8U/ml) (ATPasa soluble que degrada el ATP en ADP y AMPc), *b) antagonistas genéricos* de los receptores purinérgicos P2X y P2Y (respectivamente PPADS 50μM y RB2 100mM) (Watano et al., 2002), *c) antagonistas específicos* para el receptor ionotrópico P2X<sub>7</sub>R [BBG (5mM)] y [A804598 (0.2, 5, 10 y 100μM)] (Freire et al., 2019; Qiu & Dahl, 2009), y para el receptor metabotrópico P2Y<sub>6</sub>R [MRS 2578 (0.2, 5, 10 y 100μM)] (Timóteo et al., 2014), y *d) agonista genérico de ATP [Mg<sup>+2</sup>-ATP* (0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1, 5mM)].

Para investigar si la actividad de los panexones es modulada por la activación de receptores glutamatérgicos, se realizó la captación de Etd<sup>+</sup> (15min) en rodajas agudas de hipocampo de ratones salvajes y Panx1<sup>-/-</sup> en presencia de diferentes concentraciones de glutamato (100, 250, 500, 750, 1500µM) (Mishra et al., 2014; Peppiatt et al., 2006; Hall et al., 2014) utilizando ACSF modificado con bajo Mg<sup>2+</sup> (en mM: NaCl 135; KCl 2.8; NaHCO<sub>3</sub> 29; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1; glucosa 12; MgSO<sub>4</sub> 0.5; CaCl<sub>2</sub> 2.5) equilibrado con carbógeno. Se utilizó ACSF bajo en Mg<sup>2+</sup>, para permitir la activación de receptores neuronales de tipo NMDA y la incubación en presencia de glutamato fue por un período no mayor a 15min para evitar neuro-toxicidad. Para caracterizar la contribución individual de los receptores glutamatérgicos neuronales de tipo AMPA y NMDA, investigamos si el efecto del glutamato sobre la transferencia de Etd<sup>+</sup> hacia los pericitos se bloquea por antagonistas de los receptores glutamatérgicos neuronales ionotrópicos NMDA (CPP, 20µM) y AMPA (CNQX, 15µM) (Mishra et al., 2014). En otro grupo de experimentos se realizó la captación de Etd<sup>+</sup> en presencia de los agonistas glutamatérgicos AMPA (40µM) y NMDA (40µM) (Hall et al., 2014) tanto en forma individual como conjunta por 15min para determinar si la activación de dichos receptores por agonistas específicos emula la acción del glutamato sobre la transferencia de Etd<sup>+</sup> en los pericitos del hipocampo. Los ensayos en presencia de NMDA se empleó ACSF modificado con bajo Mg<sup>2+</sup> equilibrado con carbógeno como se describió anterirmente.

Para determinar si la actividad de los canales pericitarios de gran poro es controlada por agentes vasoactivos moduladores del tono contráctil pericitario, se investigó en rodajas agudas de hipocampo de ratones salvajes y Panx1<sup>-/-</sup> previamente cargadas con TO-PRO-3 si la captación de Etd<sup>+</sup> entre los

pericitos y el medio cerebral es regulada por: *a*) a*gentes vasodilatadores*: prostaglandina  $E_2(10\mu M)$  (Hall et al., 2014), acetilcolina (10 $\mu$ M) (Wu et al., 2003); *b*) *agentes vasoconstrictores*: norepinefrina (1.5,10,15, 50, 100 $\mu$ M) (Hamilton, 2010), ATP exógeno (100 $\mu$ M y 5mM) (Kawamura et al., 2003; Peppiatt et al., 2006).

En todos los casos una vez finalizado el tratamiento, las rodajas hipocampales se lavaron en ACSF equilibrado con carbógeno por 10min para detener la captación de Etd<sup>+</sup> y disminuir el fondo, y se fijaron en PFA 4%. Por último, las rodajas fijadas fueron lavadas en PBS-T 3 veces por 10min cada vez y los núcleos celulares se marcaron con DAPI (1-5µM; 10min); las rodajas se montaron en glicerina y se analizaron posteriormente por microscopía confocal.

## 3.10- Captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos hipocampales en ratones despiertos en condiciones de comportamiento libre

Una vez que los resultados en rodajas agudas revelaron la expresión de panexones funcionales en los pericitos cerebrales descartando una contribución evidenciable de los conexones, se llevaron adelante experimentos para validar si el intercambio molecular entre los pericitos y el microentorno mediado por panexones se encuentra funcional en condiciones basales en el animal *in vivo*. Para ello, a un grupo de ratones salvajes (C57BL6/J) en vigilia/despiertos se les administró por vía intraperitoneal Etd<sup>+</sup> diluido en suero fisiológico (100mg/kg peso i.p.). Estos ratones previamente fueron subdivididos en dos grupos: a uno se le inyectó el bloqueante específico de panexones probenecid (PBD; 200mg/kg peso i.p.) y al grupo de ratones control se le administró el mismo volumen del vehículo del PBD, es decir, suero fisiológico, en los 20min previos a la administración i.p. de Etd<sup>+</sup> (Figura 10 Esquema). Luego de la administración de Etd<sup>+</sup>, los ratones fueron colocados en sus jaulas por 25min en un ambiente tranquilo y se sacrificaron, se disecaron las rodajas agudas de hipocampo y se incubaron en ACSF equilibrado con carbógeno en presencia de TO-PRO-3. Por último, las rodajas se fijaron en PFA 4% y los núcleos se marcaron con DAPI, las rodajas se montaron en glicerina y se analizaron mediante microscopía confocal.

## 3.11- Evaluación del rol de los panexones en la regulación del calibre capilar

Para evaluar el rol de los canales de Px1 en la regulación del calibre capilar en respuesta a la activación neural y a los agentes vasoactivos, las rodajas agudas de hipocampo provenientes de ratones salvajes, condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>n/n</sup>/Cre<sup>+</sup>) y su respectivo control (Panx1<sup>n/n</sup>/Cre<sup>-</sup>) inicialmente se cargaron con TO-PRO-3 y/o Etd<sup>+</sup> a RT para evidenciar los pericitos. Luego las rodajas de hipocampo se incubaron a 34-36°C con el marcador vascular y pericitario IB4-FITC (5µg/ml) o Tomato-Lectina (5-10µg/ml) en presencia de glutamato (500µM) por 15min en ASCF bajo Mg<sup>2+</sup> equilibrado con carbógeno (Mishra et al., 2014; Peppiatt et al., 2006; Hall et al., 2014), o de los agentes vasoactivos: acetilcolina (10µM) (Wu et al., 2003), norepinefrina (15µM) (Hamilton, 2010) y ATP exógeno (100µM) (Kawamura et al., 2003, 2004; Peppiatt et al., 2006) por 20min en ACSF equilibrado con carbógeno. Por último las rodajas se fijaron en PFA 4%, se lavaron en PBS 3 veces por 10min cada vez y los núcleos celulares se marcaron con DAPI (1-5µM; 10min), posteriormente estas rodajas se montaron en glicerina y se analizaron por microscopía confocal.

# 3.12- Obtención de imágenes mediante microscopía confocal y análisis de resultados

Las rodajas de hipocampo de los experimentos antes descritos se adquirieron y se analizaron a partir de microfotografías obtenidas por microscopía confocal ya que permite obtener imágenes de un único plano focal con alta resolución y contraste. Para ello empleamos el microscopio confocal Leica SP5 Tandem Scanner de la Facultad de Medicina, utilizando el programa LAS AF en modo sequence scanning, pinhole 1Airy, rotation 90°, configuración xyz (para las rodajas fijadas) y xyt (frecuencia de muestreo de 30-60s para los experimentos en rodajas vivas), y resolución 1024 x1024. Las preparaciones fueron visualizadas con los objetivos 63x de aceite N.A. 1.42 con corrección UV o 40x de aceite N.A. 1.3 con corrección UV, empleando los láseres de Argón 488, HeNe 543 y HeNe 633nm y con la lámpara led UV 405nm. En algunos experimentos las imágenes fueron adquiridas mediante el microscopio confocal Zeiss LSM 800 del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) con el programa ZEN Blue 2.3 utilizando los láseres (405, 488, 561 y

640nm). En este caso, los objetivos usados fueron 10x N.A. 0.3, 20x N.A. 0.5, 40x N.A. 0.95, 40x N.A. 0.6 de larga distancia, 63x N.A. 1.4 y 100x N.A. 1.4. Los valores de ganancia y off-set y la potencia de los láseres empleados fueron configurados de manera de evitar saturación en las imágenes y de optimizar la relación señal/ruido; además estos parámetros se mantuvieron incambiados en aquellos experimentos independientes que requirieron comparar grupos controles y tratados tales como captación de Etd<sup>+</sup> o incorporación de distintas concentraciones de TO-PRO-3. Nos abocamos al estudio de los pericitos hipocampales ubicados en el Stratum Radiatum y Stratum Oriens a ambos lados de la capa de neuronas piramidales CA1. La adquisición de imágenes se realizó a partir de 20μm desde la superficie de las rodajas, evitando fotografiar pericitos que pudieran estar dañados por el proceso de corte y hasta aproximadamente las 80-100μm, para evitar la eventual heterogeneidad en la fluorescencia derivada del gradiente de difusión de colorantes y nutrientes (desde la superficie de corte hacia el interior de las rodajas).

Los fluoróforos utilizados fueron: DAPI y/o Hoechst (excitación/emisión 358/461nm), NeuroTrace (excitación/emisión 500/525 nm), Alexa-FICT/ LEL (Tomato)-Dye Light 488/IB4-FICT/Alexa-488/FITC-Dextrano(excitación/emisión 488/515nm), TO-PRO-3 (excitación/emisión 642/661nm), Alexa-Cy3 (excitación/emisión 554/568nm), Evans Blue (excitación/emisión 620/680nm), Etd<sup>+</sup> (excitación/emisión 528/ 598nm).

La cuantificación de la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> se efectuó con el programa Image-J o FIJI (NIH, Bethesda, MD, USA). Para ello, los contornos de los pericitos TO-PRO-3<sup>+</sup> fueron dibujados manualmente sobre la imagen utilizando la herramienta "Free Hand Selection" y cada contorno pericitario se consideró una región de interés (ROI). Las regiones ROI se adicionaron en el menú ROI: "ROI Manager (Analyse, Tools, ROI Manager, Add)". Una vez seleccionados todos los pericitos de un campo se midió su fluorescencia en el canal del fluoróforo Etd<sup>+</sup>, empleando la función "measure" en el menú ROI. De esta forma se obtuvo una lista de valores de fluorescencia (F) para todos los pericitos seleccionados. La cuantificación de la intensidad de captación del Etd<sup>+</sup> en unidades arbitrarias (UA) se obtuvo como la diferencia (F-F<sub>0</sub>) entre la fluorescencia (F) en los pericitos y la fluorescencia del fondo (F<sub>0</sub>) medida como el promedio de la fluorescencia en cuatro zonas del mismo campo sin células marcadas. En cada experimento se normalizó la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> en las distintas condiciones con relación a la media de la fluorescencia de la condición control. Para determinar la incorporación de TO-PRO-3 en presencia de bloqueantes o de distintas concentraciones del fluoróforo, se desarrolló una estrategia similar que para el Etd<sup>+</sup>. Para determinar el largo y el número de los procesos longitudinales que se proyectan a partir de los somas de las células TO-PRO-3<sup>+</sup> se adquirieron imágenes de planos focales consecutivos ("z-stacks") de rodajas de hipocampo. Utilizando el programa Image-J se superpusieron los planos para reconstituir una imagen única "Image, Stacks, Stacks to Image". Estas imágenes se convirtieron en escala de grises y se cuantificó el largo de cada prolongación empleando la herramienta "freehand line". Las prolongaciones se dibujaron manualmente y mediante la herramienta "measure" del menú "analyse" se midió su longitud en micras desde su punto de emergencia a nivel del soma hasta la primera ramificación. La densidad pericitaria se evaluó mediante cuantificación manual de los somas pericitarios (TO-PRO-3), para esto se contabilizaron los somas en las imágenes reconstituidas de los "z stacks" y se referenciaron como el número de pericitos por el volumen de cerebro analizado en mm<sup>3</sup>. En los experimentos de medición del calibre capilar, se identificaron los capilares como microvasos con diámetro < 5µM, ausencia de una capa continua de músculo liso y presencia de pericitos en su pared abluminal. Los capilares y los pericitos se observaron y se fotografiaron en el microscopio confocal bajo campo claro o contraste de interferencia diferencial (DIC) y fluorescencia. Se utilizaron los siguientes criterios publicados para determinar los capilares saludables: (a) forma cilíndrica en 3D, (b) luz claramente visible (no colapsada), (c) cobertura pericitaria, (d) células endoteliales delgadas y planas. Los capilares no saludables presentaron: (a) células endoteliales hinchadas, (b) lumen capilar colapsado y (c) aspecto planar del capilar (en 2D) (Mishra et al., 2014). Para el análisis del diámetro/calibre capilar, se seleccionaron capilares cuyas paredes estuvieran claramente delineadas con DIC y/o con Tomato-lectina o IB4, y los pericitos con somas fusiformes dando origen a prolongaciones en las zonas medio-capilares. Los calibres capilares internos/ luminales (que son más sensibles a las variaciones que los diámetros externos/abluminales), se midieron manualmente dibujando una línea perpendicular en la luz del vaso utilizando la herramienta "freehand line" del programa Image-J (Isasi et al., 2019; Lacar et al., 2012; Mishra et al., 2014). Las mediciones abarcaron el ancho intravascular (visualizado con Evans Blue o Dextrano), entre los límites internos de las paredes vasculares fotografiados en el mismo plano focal (visualizados con DIC y/o con fluorescencia (DIC/ IB4-FICT/Tomato-Lectina); se evitó medir a nivel de los somas endoteliales y pericitarios. Los calibres capilares medidos usando DIC y fluorescencia fueron similares entre sí y no presentaron diferencias significativas; también fuero similares las medidas de los calibres evaluadas en rodajas fijadas como vivas (Figura 6). Los valores de calibre capilar obtenidos fueron significativamente diferentes cuando se compararon entre animales juveniles (P 35-45 días) y adultos (P 90-120 días) (Figura 6); valores de calibres capilares internos similares a los obtenidos por nosotros han sido identificados en ratones por otros grupos de investigación (Boero et al., 1999; Hartmann et al., 2021; Kovács-Öller et al., 2020 a; Moeini et al., 2020; Müller et al., 2008; Steinman et al., 2017; Tata & Anderson, 2002).



Figura 6- Validación de la medición del calibre capilar interno con campo claro o contraste de interferencia diferencial (DIC) y con fluorescencia. A- Microfotografía confocal de un capilar cuyas paredes se evidenciaron con Tomato-Lectina (rosa) y con DIC, los pericitos se visualizan con TO-PRO-3 (verde). Las líneas amarillas perpendiculares a las paredes en el lumen vascular muestran zonas de medición del calibre interno capilar. La gráfica representa el calibre capilar interno (Media  $\pm$  SEM) medido en DIC (14 capilares y 3 animales) y en Tomato-Lectina (32 capilares y 3 animales). ns; no significativo, t-test no pareado de dos colas. En (B) se grafica el calibre capilar interno (Media  $\pm$  SEM) para animales de dos rangos etarios en función de la distancia del soma pericitario. Los animales adultos (P90-120) (58 capilares, 3 animales) presentan un diámetro significativamente mayor que los juveniles (P30-45) (37 capilares, 3 animales). \*p<0.05, comparación entre los grupos indicados por las líneas horizontales. En (C) se grafica el diámetro capilar interno (Media  $\pm$  SEM) medido en rodajas agudas de hipocampo fijadas (38 capilares y 4 animales) y perfundidas (vivas) en el microscopio confocal (14 capilares y 3 animales). no significativo, t-test no pareado de dos colas.

## 3.13- Test de reconocimiento de objeto novedoso (NOR Test)

Este test permite la evaluación de aprendizaje y memoria en el animal vivo. El protocolo de NOR test utilizado fue adaptado de artículos previos (Cheung et al., 2022; Frick & Gresack, 2003; Leger et al., 2013; Lueptow, 2017). Los ratones fueron manipulados por lo menos durante 1min todos los días en la semana previa a la realización del test por el investigador a cargo del ensayo, para disminuir el estrés inducido por la novedad. El día del test, se siguieron distintas fases: (1) prehabituación: los ratones en sus jaulas individuales se ubicaron por 60min en una sala de experimentación a la cual se le controló la temperatura, el acceso de las personas, los ruidos y la luz (para disminuir los factores de estrés); (2) habituación o aclimatación: los ratones fueron colocados en la arena vacía (caja plástica de 40cm de largo, 26cm de ancho y 26cm de alto) que exploraron por 10min; culminado este tiempo se colocó al ratón en su jaula individual por 20min (Frick & Gresack, 2003), mientras tanto se desinfectó la arena con alcohol 70% en la cual se ubicaron dos objetos idénticos (objetos familiares F1 y F2). Los objetos F1 y F2 consistieron en dos pilas de tres bloques de plástico, cilíndricos de encastre iguales en color, textura y forma (de 10cm de alto y 5cm de diámetro) que se fijaron mediante cinta en forma cruzada al piso de la arena y separados de la pared por al menos 5cm; (3) fase de familiarización o entrenamiento o adquisición: pasado el tiempo de descanso (20min), se colocó el ratón en el centro de la arena conteniendo los dos objetos (F1 y F2) que exploraron libremente por 10min; (4) intervalo de tiempo entre las pruebas: pasado el tiempo de entrenamiento (10min), se retiró el ratón de la arena y se lo colocó en su jaula de descanso por 60min durante los cuales se desinfectaron la arena y los objetos con alcohol, y se cambió uno de los objetos familiares (F) por un objeto nuevo (N) que consistió en un muñeco de plástico de 9cm de alto y 3cm de ancho; (5) fase de test o de re-exposición: luego de los 60min de intervalo, se introdujo el ratón en el centro de la arena por 10min durante los cuales el animal exploró los objetos F y N. Durante las fases 3 y 5 se registró el ratón en la arena mediante filmación con una cámara de video. A partir de las filmaciones se cuantificó con un cronómetro el tiempo de exploración de cada objeto en la fase de entrenamiento (F1 y F2) y de testeo (F1 y N). La exploración se definió por la actitud del animal de dirigir el hocico a 2 cm del objeto mientras lo observa, lo huele o lo toca, excluyendo los contactos accidentales como chocar o cuando el ratón se trepa sobre el objeto (salvo que explore el objeto previamente o mientras está trepado en él) (Cheung et al., 2022; Frick & Gresack, 2003; Leger et al., 2013; Lueptow, 2017). Para validar la fase de entrenamiento se utilizó como criterio, que el ratón

explorara cada objeto por un total de al menos 20s de los 10min de esta fase (Frick & Gresack, 2003; Leger et al., 2013). Una vez obtenidos los tiempos de exploración de cada objeto se calcularon los Índices de Discriminación de la siguiente forma:

a) Para la fase de familiarización:

Índice Discriminación = (Tiempo Exploración F2(s)-Tiempo Exploración F1(s)) x 100 (Tiempo Exploración F2(s)+Tiempo Exploración F1(s))

b) Para la fase de test o re-exposición:

Índice Discriminación = (Tiempo Exploración N(s)-Tiempo Exploración F(s)) x 100 (Tiempo Exploración N(s)+Tiempo Exploración F(s))

## 3.14- Representación de resultados y análisis estadístico

Los resultados obtenidos para las cuantificaciones corresponden a la Media  $\pm$  SEM (Error Estándar de la Media). En todos los casos se adquirieron imágenes de 3-7 rodajas para cada condición por animal de por lo menos 3 ratones independientes (Garré et al., 2010; Abudara et al., 2015). Para determinar la significancia estadística se utilizaron los programas GraphPad InStat 5.0 o Prisma 8.0.2. Antes de aplicar los test estadísticos se realizó un análisis de distribución normal de datos (Kolmogorov-Smirnov), para aquellos datos que pasaron el test de normalidad se aplicaron los test de ANOVA de dos colas o de t no pareados de dos colas. Para los datos que no pasaron el test de normalidad, la significancia se evaluó con los tests no paramétricos: Mann–Whitney de dos colas y el Kruskal-Wallis seguido de post-test Dunn. Se consideraron diferencias significativas valores de p<0.05. En los pies de cada figura se referencian los análisis estadísticos aplicados y los valores de "p" obtenidos.

## 4. RESULTADOS OBTENIDOS

## **Objetivo Específico 1**

# 4.1- Identificación de pericitos cerebrales con el fluoróforo TO-PRO-3 Iodide (642/661)

Los resultados referentes a este objetivo están contenidos en las publicaciones adjuntas (Mai-Morente et al., 2020; Mai-Morente et al., 2021). En breve, en estos trabajos demostramos que el fluoróforo TO-PRO-3 que emite en el espectro del rojo lejano (642/661) y que se emplea en general como colorante nuclear en tejido fijado, actúa como un marcador específico de los pericitos del SN cuando se aplica en tejido vivo. En rodajas agudas de corteza, hipocampo, médula espinal y en la retina, los pericitos pericapilares incorporaron de manera selectiva y estable el TO-PRO-3. Este hallazgo fue validado mediante co-marcaje de las células con TO-PRO-3 y con los marcadores pericitarios clásicos: el antígeno condroitín sulfato proteoglicano neuronal-glial 2 (NG2) y el antígeno del receptor del factor de crecimiento beta derivado de plaquetas (PDGFr\u00b3). Además validamos la identidad pericitaria de las células marcadas con TO-PRO-3 mediante el fluoróforo NeuroTrace (500/525), el cual ha sido reportado como colorante de pericitos en condiciones in vivo (Damisah et al., 2017). Utilizando la tinción de los pericitos con TO-PRO-3 se cuantificó la densidad pericitaria en el cerebro, se caracterizó la morfometría de los pericitos y se evidenció la relación de los pericitos con los componentes de la unidad neurovascular (vasos y endotelio, astrocitos y neuronas). Además, determinamos que un subconjunto de pericitos teñidos con TO-PRO-3 expresa la proteína contráctil  $\alpha$ -SMA, indicativo de su posible capacidad para controlar el diámetro capilar (tópico aún en discusión por la comunidad científica internacional). La captación de la sonda TO-PRO-3 por los pericitos no fue mediada por canales de gran poro de Cx43 o Px1, pero fue sumamente sensible a la temperatura (Q10~5) y mostró saturación cuando se emplearon concentracion crecientes del trazador; esto sugirió que el TO-PRO-3 es incorporado a los pericitos vivos de las rodajas agudas del hipocampo a través de un mecanismo activo mediado por un transportador de identidad aún desconocida. En estos estudios concluimos que el marcaje de pericitos con TO-PRO-3 proporciona una herramienta confiable, robusta, sensible y económica para identificar pericitos en la microvasculatura del sistema nervioso sin la necesidad de utilizar animales transgénicos o inmunomarcaje. Un reporte reciente validó la utilidad de este marcador para reconocer los pericitos en condiciones *in vivo* mediante microscopía bifotónica (Tong et al., 2021). El TO-PRO-3 se ha empleado en el marco de esta tesis de forma corriente para identificar los pericitos y se ha combinado con múltiples abordajes (inmuno-fluorescencia, captación de colorante (Etd<sup>+</sup>), ensayos farmacológicos, experimentos *ex vivo*, medición de calibre capilar) con el fin de responder la hipótesis y los objetivos planteados.

## **Objetivo Específico 2**

## 4.2- Los pericitos pericapilares del hipocampo captan el trazador Etd<sup>+</sup> en condiciones de reposo a través de canales de gran poro

En rodajas agudas de hipocampo, evaluamos el intercambio molecular entre los pericitos y el medio extracelular utilizando la técnica de captación del colorante bromuro de etidio (Etd<sup>+</sup>). El Etd<sup>+</sup> fue aplicado en el medio de incubación de las rodajas vivas como se detalló en materiales y métodos (Etd<sup>+</sup> 10µM; 20 min). Este trazador ingresa a las células por los canales de gran poro abiertos en las membranas celulares; dichos canales pueden estar formados por conexinas (Cxs) o panexinas. Una vez intracelular, el Etd<sup>+</sup> se fija a los ácidos nucleicos en forma irreversible (Abudara et al., 2015; Contreras et al., 2002; Giaume et al., 2012; Orellana et al., 2011 a; Sáez et al., 2010). Dado que, en las rodajas agudas cerebrales, la difusión de nutrientes, sustratos, gases y trazadores desde el medio de incubación presentan un gradiente de propagación a través del corte (Hall et al., 2014; Mishra et al., 2014; Tian et al., 2010), cuantificamos la fluorescencia en los pericitos localizados en el rango de profundidad de 25 a 80µm desde la superficie de las rodajas. Los resultados obtenidos muestran que los pericitos pericapilares de las rodajas agudas de hipocampo incorporaron Etd<sup>+</sup> desde el medio extracelular en condiciones basales (Figura 7). Mediante medición del nivel de fluorescencia intrapericitaria del Etd<sup>+</sup> se cuantificó el grado de actividad de los canales funcionales de Cx y/o Px (Figura 7C). Tanto los pericitos localizados en las porciones rectas de los vasos como aquellos ubicados en las bifurcaciones captaron el trazador en niveles similares (Figura 7 B y C). Además, la captación de Etd<sup>+</sup> en otras células de la UNV (neuronas, astrocitos y endotelio) en condiciones de reposo fue menor, siendo los pericitos los que presentaron mayor intercambio con el entorno. En la

figura 7D y E, presentamos la comparación de la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos y los astrocitos en condiciones de reposo; estos últimos posiblemente capturaron el colorante a través de conexones de Cx43 que se encuentran abiertos en el hipocampo en condiciones basales (Chever et al., 2014). En el animal vivo, el centro vasomotor bulbar y la presión de perfusión mantienen el tono vasomotor (estado parcial de contracción de las fibras musculares vasculares). Para compensar la ausencia de tono vascular en condiciones *ex vivo*, perfundimos las rodajas con norepinefrina (NE) en concentración de pre-contracción (NE, 1.5 $\mu$ M en presencia de ascorbato 100 $\mu$ M que enlentece su oxidación) (Mishra et col., 2014). Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas en la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos de las rodajas pre-contraídas y sin pre-contraer (Figura 7C).

En conjunto, estos resultados sugieren que en condiciones de reposo los pericitos pericapilares del hipocampo exhiben un intercambio molecular con el fluido cerebral mediado por canales de gran poro el cual es independiente del tono vasomotor basal pericitario sugiriendo la existencia de vía(s) funcional(es) activas en estado basal que median el ingreso del trazador a los pericitos.


Figura 7- Los pericitos pericapilares de las rodajas agudas de hipocampo captan el trazador Etd<sup>+</sup> en condiciones basales. (A) Microfotografías fluorescentes de un mismo campo ubicado en el Stratum Radiatum del hipocampo (a - d). El recuadro en las imágenes de b, c y d fue amplificado respectivamente en b', c' y d'. La imagen pseudocoloreada en (a) muestra los somas pericitarios (verdes) adosados a la microvasculatura cerebral (negro). Se observa que los pericitos pericapilares identificados con TO-PRO-3 (verde, a b y b', d y d') han captado Etd<sup>+</sup> (c y c'; rojo) en condiciones basales. En d y d'se muestra la superposición de las imágenes b y c y b'y c', respectivamente, donde se aprecian que los pericitos TO-PRO-3 incorporaron Etd<sup>+</sup> (d y d'; amarillo). (B) Microfotografías fluorescentes muestran dos pericitos (a y b) identificados con TO-PRO-3 que captaron Etd<sup>+</sup>, uno ubicado en una bifurcación vascular (a) y el otro adyacente al eje capilar (b). Desde los pericitos se extienden prolongaciones longitudinales primarias (cabezas de flecha) y secundarias rodeando al capilar (flecha entera). (C) Cuantificación de la captación de Etd<sup>+</sup> por pericitos ubicados en el eje y en las bifurcaciones de los capilares del Stratum Radiatum de rodajas agudas de hipocampo sin precontraer y precontraídas (NE 1.5 µM en presencia de ascorbato 100µM). En el gráfico, cada símbolo ilustra el valor de la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> normalizada para cada pericito respecto a la media (Media ± SEM) de la fluorescencia obtenida para todos los pericitos adyacentes a los ejes vasculares en rodajas no precontraídas (ejes: 1.00 ± 0.05, 122 pericitos; bifurcaciones:  $1.02 \pm 0.11$ , 23 pericitos, 3 ratones) y pre-contraídas (ejes:  $1.00 \pm 0.04$ , 151 pericitos; bifurcaciones:  $0.93 \pm 0.09$ , 30 pericitos, 3 ratones); ns, no significativo; Kruskal-Wallis con post-test). (D) Microfotografías ilustran la captación basal de Etd<sup>+</sup> (c y c') en los pericitos (TO-PRO-3+ en verde en a y a' y b y b') y en los astrocitos (GFAP+ en negro en a y a' y en blanco, b y b'). En d y d', se muestra respectivamente la superposición de b y c y de b' y c'. Los recuadros en a, b, c y d aparecen amplificados en a', b', c', y d' respectivamente. La figura a, es la misma que b que ha sido pseudo-coloreada para facilitar la visualización de la unidad gliovascular. En d y d' los pericitos TO-PRO-3<sup>+</sup> que captaron Etd<sup>+</sup>, aparecen en amarillo mientras que los astrocitos captantes aparecen en rosado. La flecha en c'está indicando un soma pericitario que ha captado Etd<sup>+</sup> y las cabezas de flecha indican los somas astrocitarios que han captado Etd<sup>+</sup>. (E) Cuantificación de la captación de Etd<sup>+</sup> por pericitos (1.00 ± 0.05, 116 pericitos, 4 ratones), y astrocitos (0.26 ± 0.01, 163 astrocitos, 4 ratones) en el Stratum Radiatum del hipocampo de ratón. Los valores de fluorescencia de Etd<sup>+</sup> de cada célula fueron normalizados con respecto a la media de la fluorescencia para Etd<sup>+</sup> pericitarios y graficado en barras (Media ± SEM). \*\*\* p<0.001 captación de los astrocitos comparada con la pericitaria; Mann-Whitney-test. Escala: 10µm en todas las imágenes.

# 4.3- En condiciones basales, los panexones median el ingreso de Etd<sup>+</sup> a los pericitos pericapilares en rodajas agudas de hipocampo

Para discriminar la naturaleza molecular de los canales que median el ingreso de Etd<sup>+</sup> a los pericitos desde el medio extracelular en condiciones basales, se caracterizó la sensibilidad farmacológica de la captación pericitaria de Etd<sup>+</sup> a inhibidores generales y específicos de panexones y conexones (Tabla 3 y Figura 8). Los resultados obtenidos muestran que la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos en presencia de carbenoxolona (CBX), un inhibidor genérico de conexones y panexones en concentraciones mayores a 50µM (Pelegrin & Surprenant, 2006; Willebrords et al., 2017), fue significativamente bloqueada para las concentraciones de 100µM y 200µM, tanto en las rodajas agudas de hipocampo pre-contraídas con norepinefrina 1.5µM como sin pre-contraer (Figura 8, A). El histograma de distribución de frecuencias de la captación pericitaria de Etd<sup>+</sup> muestra un corrimiento de los valores hacia la izquierda para los coeficientes de captación de los pericitos expuestos a CBX (Figura 8Ai). Estos resultados sugieren que el ingreso de Etd<sup>+</sup> desde el medio extracelular depende de la expresión funcional de canales de Cx43 y/o Px1 en los pericitos. El lantano (La<sup>3+</sup>), bloqueante de conexones que no exhibe efecto sobre los panexones (Ma et al., 2009), no generó variaciones significativas de la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos. En cambio, el probenecid (PBD), un inhibidor de canales de Px1 que no afecta los conexones (Ma et al., 2009; Silverman et al., 2008), inhibió significativamente el ingreso de Etd<sup>+</sup> a los pericitos en forma similar para las dos concentraciones evaluadas (500µM y 2mM). Además, los valores de inhibición de la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos en presencia de PBD fueron similares a los obtenidos para las dos concentraciones de CBX ensayadas (100µM y 200µM) (Tabla 3). Para confirmar que el influjo de Etd<sup>+</sup> a los pericitos es mediado por panexones y no por conexones de Cx43 u otros canales de gran poro, se incubaron las rodajas agudas de hipocampo en ACSF conteniendo Etd<sup>+</sup> y péptidos miméticos. Estos péptidos inhiben los panexones o conexones por interacción con los bucles extracelulares de las Pxs o de las Cxs, respectivamente (Evans et al., 2006) (Figura 8, Ba y b). El Gap26 (150µM), péptido inhibidor específico de la Cx43 tanto en su configuración de uniones gap como de hemicanales, y el Gap19, péptido inhibidor específico de la Cx43 en su configuración como hemicanales, no tuvieron efectos significativos sobre la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos desde el medio extracelular en rodajas agudas de hipocampo en condiciones basales, dato consistente con el

obtenido para el La<sup>3+</sup>. El péptido mimético <sup>10</sup>Px1 (150μM), un inhibidor específico de la Px1, bloqueó el influjo de Etd<sup>+</sup> a los pericitos en forma significativa y similar al PBD y a la CBX (Figura 8 A y B; Tabla 3). Resultados similares fueron encontrados en cultivos pericitarios cerebrales murinos en presencia de los antagonistas CBX, <sup>10</sup>Px1 y Gap19 (datos no mostrados obtenidos en colaboración con la Dra. Eugenia Isasi).

Con el objetivo de validar que la naturaleza molecular de los canales de gran poro involucrados en la comunicación de los pericitos con el entorno en condiciones basales es la Px1, realizamos los mismos ensayos farmacológicos descritos anteriormente empleando rodajas agudas de hipocampo de ratones knock-out (KO) totales para la Px1. Como era esperable en caso de estar involucrados los panexones, los resultados obtenidos mostraron que el ingreso de Etd<sup>+</sup> a los pericitos resultó insensible a los bloqueantes CBX (100µM), Gap 19 (150µM) y <sup>10</sup>Px1 (150µM) (Tabla 3, Figura 8Bc). Para confirmar que son los panexones expresados en los pericitos hipocampales (y no los panexones expresados en otro tipo celular) quienes median la captación basal de colorante, se comparó la fluorescencia en pericitos de ratones condicionales [cuya expresión génica de Px1 únicamente se silenció en los pericitos (Panx1<sup>fl/fl</sup>/PDGFRbeta-P2A-CreERT2 o Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>)] con sus controles [pericitos de animales que no expresan la recombinasa Cre (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>-</sup>)]. En estas condiciones, la transferencia de Etd<sup>+</sup> por los pericitos de las rodajas hipocampales de los ratones condicionales Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup> fue 45% menor que en los pericitos de los animales control (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>-</sup>) (Figura 8Da). Además, se realizaron los mismos tratamientos farmacológicos descritos anteriormente (en los pericitos derivados de ratones salvajes y KO globales para la Px1), para los pericitos provenientes de la cepa de ratones condicionales Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup> y de sus controles Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>-</sup>; los últimos respondieron a los bloqueantes de Cxs/Pxs en forma similar a los pericitos de los ratones salvajes (C57Bl/6): la CBX (100µM) y el péptido <sup>10</sup>Px1 (150µM) generaron disminución significativa de la captación pericitaria de Etd<sup>+</sup> mientras que el Gap19 no tuvo efecto (Figura 8Db, Tabla 3). Por su parte, los pericitos de las rodajas agudas de hipocampo de los ratones condicionales Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup> fueron insensibles a estos bloqueantes al igual que los pericitos de los ratones KO totales para la Px1 (Figura 8 Dc, Tabla 3). En conjunto, los resultados antes descritos, muestran que los bloqueantes de la Px1 fueron efectivos en inhibir la comunicación entre los pericitos hipocampales y el microentorno en rodajas agudas de ratones salvajes (C57Bl/6) y controles de los condicionales (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>-</sup>) y en cultivos pericitarios (datos no presentados), pero no afectaron la captación de colorante por los pericitos del hipocampo de ratones KO totales para la



Px1 y condicionales ( $Panx1^{fl/fl}/Cre^+$ ) carentes de Px1. En la Tabla 3 se resumen los valores de captación pericitaria de  $Etd^+$  en las condiciones previamente mencionadas.

Figura 8-Los panexones median el ingreso de Etd<sup>+</sup> a los pericitos desde el medio extracelular en rodajas agudas de hipocampo. (A) Las imágenes fluorescentes muestran la captación de Etd<sup>+</sup> por pericitos (evidenciados con TO-PRO-3) en el Stratum Radiatum del hipocampo en condiciones basales (Ctrl; a-d) y tratados con carbenoxolona (bloqueante de Cxs/Pxs) (CBX 100  $\mu$ M; e-h). Los recuadros ampliados en (b) y (f) evidencian la atenuación de la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> en pericitos tratados con CBX (f) en comparación con los pericitos controles (b). En la parte superior de (i) se esquematiza el ensayo de captación de Etd<sup>+</sup> en rodajas agudas de hipocampo y en el recuadro superior se grafica la frecuencia de distribución (bin 0.05) para los coeficientes de captación de Etd<sup>+</sup> de pericitos controles (barras blancas, 1112 pericitos, 13 ratones) y para aquellos tratados con CBX (100  $\mu$ M, ebarras azules; 404 pericitos, 8 ratones) (recuadro). Los gráficos de barras (i y j) ilustran el coeficiente de captación (Media ± SEM) para pericitos controles (barras blancas, 112 pericitos, 5 pericitos, 5 ratones; CBX 100  $\mu$ M, 241 pericitos, 6 ratones; CBX 200  $\mu$ M, 643 pericitos, 9 ratones) y en rodajas pre-contraídas con NE 1.5  $\mu$ M (j) (control, 157 pericitos, 3 ratones). (B) (a) Las microfotografías fluorescentes muestran la captación de Etd<sup>+</sup> por pericitos (marcados con TO-PRO-3) en rodajas agudas de hipocampo de ratones salvajes WT en condiciones basales controles (Ctrl) y tratadas con bloqueantes específicos de canales de Pxs (<sup>10</sup>Px1) o Cxs (Gap26). (b) Coeficientes de captación de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) para pericitos de rodajas de hipocampo de ratones WT en

condiciones basales Ctrl (732 pericitos, 9 ratones), en presencia de bloqueantes de conexones [(La<sup>3+</sup> 200µM (221 pericitos, 4 ratones), Gap19 300µM (192 pericitos, 3 ratones) y Gap26 150 µM (222 pericitos, 3 ratones)] y de panexones [Probenecid (PBD 500 µM (97 pericitos, 3 ratones), 2 mM (151 pericitos, 4 ratones) y <sup>10</sup>Px1 150µM (249 pericitos, 3 ratones)]; el compuesto Scr<sup>10</sup>Px1 150µM no tuvo efecto (273 pericitos, 3 ratones). (c) Imagen de inmunofluorescencia para la Px1 en rodajas de hipocampo de ratones salvajes ilustra la Px1 en la membrana y en el citosol de los pericitos evidenciados con TO-PRO-3. Nótese el importante marcado de Px1 en la célula adyacente al pericito (posiblemente una célula endotelial). (C) Gráfico de los coeficientes de captación de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) para pericitos de rodajas de hipocampo de ratones KO totales para la Px1 (Panx1<sup>-/-</sup>) en condiciones basales Ctrl (827 pericitos, 7 ratones), en presencia de CBX 100 µM, bloqueante genérico de Cxs y Pxs (591 pericitos, 8 ratones), de bloqueante de conexones de Cx43 [Gap19 150µM (201 pericitos, 4 ratones)] y de panexones [<sup>10</sup>Px1 150µM (339 pericitos, 4 ratones)]. (**D**) (a) Gráfico de barras para la fluorescencia absoluta de captación de Etd\* (AU-Unidades Arbitrarias; Media ± SEM) cuantificada en pericitos de rodajas agudas de hipocampo derivadas de ratones a los que se le inhibió el gen de la Px1 pericitario bajo la expresión de la recombinasa CRE con tamoxifeno (condicionales) o Panx1fl/fl/Cre<sup>+</sup> (11.59±0.67 SEM; 165 pericitos; 3 ratones) y en ratones controles que no expresan la recombinasa CRE o Panx1fl/fl/Cre<sup>-</sup> (21.5±0.81, 256 pericitos; 4 ratones); ambos grupos de ratones fueron tratados con tamoxifeno. Nótese la inhibición del 45% de la captación de colorante en los pericitos de los ratones condicionales a los cuales se les ha inducido el silenciamiento de la Px1. (b) El influjo de Etd<sup>+</sup> a los pericitos pericapilares en rodajas agudas de hipocampo derivadas de ratones controles Panx1<sup>fl/n</sup>/Cre- es sensible a bloqueantes de panexinas pero insensible a inhibidores de conexinas en forma similar al comportamiento de los pericitos de los ratones salvajes (WT). El gráfico de barras muestra los resultados obtenidos para el coeficiente de captación de Étd+ (Media ± SEM) por los pericitos de rodajas de hipocampo derivadas de ratones Panx1<sup>a/d</sup>/Cre<sup>-</sup> tratados con tamoxifeno (Ctrl, 273 pericitos; 4 ratones), expuestas a carbenoxolona (CBX 100µM; 145 pericitos; 4 ratones), al péptido mimético <sup>10</sup>Px1 (150µM; 188 pericitos; 4 ratones), y al péptido mimético Gap19 (150 µM; 147 pericitos; 4 ratones)]. (c) El influjo de Etd<sup>+</sup> por los pericitos pericapilares en rodajas agudas de hipocampo derivadas de ratones condicionales para la panexina1 pericitaria, Panx1fl/fl/Cre<sup>+</sup>, es insensible a bloqueantes de Px1 y de Cxs en forma similar al comportamiento de los ratones knockout totales para Panx1. El gráfico de barras muestra el coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) por pericitos de rodajas de hipocampo derivadas de ratones condicionales Panx1 fl/fl/Cre<sup>+</sup> en condiciones basales (Ctrl; 253 pericitos; 4 ratones) expuestas a la carbenoxolona (CBX 100µM; 160 pericitos; 3 ratones), al bloqueante específico de Px1, <sup>10</sup>Px1 (150µM; 0.9±0.04 SEM; 156 pericitos; 3 ratones), y al péptido mimético de la Cx43 Gap19 (150µM; 124 pericitos; 3 ratones). En todas las gráficas cada símbolo representa el valor de fluorescencia absoluta o relativa para un pericito único; los coeficientes de captación se calcularon a partir de los valores de fluorescencia tanto para los pericitos en las condiciones basales (Ctrl) como para los pericitos tratados con los bloqueantes y se normalizaron con respecto a la media del control. ns, no significativo; \*\*\*p<0.001, respecto al control o entre las condiciones indicadas por las líneas horizontales, Kruskal Wallis-test seguido de post-test en Ai, Bb, Bc, De y Db; Mann-Whitney test en Aj y Da. Escala: 10µm en todas las imágenes.

	Inhibidor	Genérico C Panexones	onexones y	Inhibidores Específicos de Panexones			Inhibidores Específicos de Conexones y Uniones Gap				
	Ctl	СВХ 100 µМ	CBX 200 µM	Ctl	PBD 500 μM	PBD 2 mM	<sup>10</sup> Px1 150 μM	Scr <sup>10</sup> Px1 150 μM	La <sup>3+</sup> 200 μM	Gap19 150 μΜ	Gap26 150 μΜ
Pericitos de ratones salvajes	1.00±0.02 (n=525)	0.52±0.52 (n=241)	0.48±0.01 (n=643)	1.00±0.02 (n=732)	0.38±0.04 (n=97)	0.41±0.03 (n=151)	0.42±0.02 (n=249)	0.94±0.04 (n=273)	0.97±0.02 (n=221)	0.93±0.03 (n=192)	0.99±0.03 (n=222)
Pericitos de ratones salvajes pre- contraído	1.00±0.03 (n=157)	0.44±0.02 (n=115)	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
Pericitos de ratones KO totales para la Panx1-/-	1.00±0.02 (n=827)	1.02±0.02 (n=591)	N/E	N/E	N/E	N/E	0.95±0.03 (n=339)	N/E	N/E	1.01±0.03 (n=201)	N/E
Pericitos de ratones controles de los condicionales para la Panx1 +/+ (Panx1 <sup>nn/</sup> Cre-)	1.00±0.04 (n=273)	0.51±0.03 (n=144)	N/E	N/E	N/E	N/E	0.48±0.02 (n=188)	N/E	N/E	1.02±0.05 (n=147)	N/E
Pericitos de ratones condicionales para la Panx1-/- (Panx1 <sup>n/n</sup> /Cre+)	1.00±0.03 (n=253)	1.06±0.05 (n=160)	N/E	N/E	N/E	N/E	0.90±0.04 (n=156)	N/E	N/E	1.06±0.07 (n=124)	N/E

Tabla 3- Coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos (Media  $\pm$  S.E.M.) en presencia de los inhibidores genéricos y específicos de los panexones, conexones y uniones gap, n es la cantidad de pericitos, N/E no ensayado.

Para detectar la expresión de la proteína Px1 en los pericitos se realizó inmuno-fluorescencia en rodajas fijadas de hipocampo derivadas de todas las cepas de ratones empleadas (WT, Panx1<sup>-/-</sup>, Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>-</sup> y Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>). En ratones salvajes (C57Bl/6) y controles de los condicionales

Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>-</sup>, los resultados obtenidos muestran la presencia de la proteína Px1 en el citoplasma y en las membranas de los pericitos, de las neuronas y del endotelio hipocampal (Figura 8Bc y 9). En cambio, en las rodajas de hipocampo de ratones KO totales para la Px1 o Panx1<sup>-/-</sup>, no se detectó inmuno-marcaje para esta proteína en las neuronas, en los pericitos y en el endotelio. Finalmente, en rodajas de hipocampo de animales condicionales (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>) validamos la ausencia de expresión de la Px1 pericitaria, y su presencia en las neuronas y en el endotelio (Figura 9).



Figura 9– Expresión de panexinal en pericitos (P), endotelio (E) y neuronas (N) de la capa CA1 en rodajas de hipocampo provenientes de cepas de ratones salvajes (WT), ratones controles de los condicionales (Panx1fl/fl CRE<sup>+</sup>), ratones condicionales para panexinal en pericitos (Panx1fl/fl CRE<sup>+</sup>) y ratones knockout totales para panexinal (KO Panx1-/-). El endotelio fue identificado con Tomato Lectina conjugada a Alexa 488, los pericitos con TO-PRO-3, las neuronas con NeuroTrace y los núcleos con DAPI. Nótese la expresión de panexinal en estos 3 tipos celulares para las cepas de ratones WT y Panx1fl/fl CRE-, la ausencia de marca para panexinal en los pericitos hipocampales para los ratones Panx1fl/fl CRE+, y la desaparición de la expresión de la panexinal en los ratones KO Panx1-/-. En todos los casos, los campos a y a' son los mismos entre sí y representan la expresión de Px1 en pericitos y endotelio; mientras que los campos b y b'son los mismos entre sí e ilustran la expresión de la Px1 en neuronas piramidales de la capa CA1 del hipocampo.

En función de los resultados hasta aquí descritos, concluimos que los pericitos expresan canales de *Px1* (panexones), que se encuentran activos en condiciones basales mediando una vía funcional para el intercambio entre los pericitos y el medio extracelular y que en esta transferencia no intervienen conexones funcionales de Cx43.

## 4.4- Los pericitos hipocampales captan Etd<sup>+</sup> a través de panexones funcionales en ratones despiertos en condiciones de comportamiento libre (ensayo in vivo)

Para validar que los panexones pericitarios se encuentran abiertos en los ratones en condiciones in vivo y que su funcionalidad no es inducida durante el procedimiento de obtención de las rodajas, se administró Etd<sup>+</sup> por vía intraperitoneal (i.p.) diluido en suero fisiológico (100 mg/kg peso i.p.), los ratones se sacrificaron y se obtuvieron las rodajas de hipocampo (ver protocolo experimental en Figura 10A). Debido a que el  $Etd^+$  es un agente intercalante, una vez que ingresa a las células se fija de manera irreversible a los ácidos nucleicos, por lo que no existe riesgo de fuga desde las células durante el procedimiento de obtención de las rodajas. Los resultados obtenidos muestran la presencia del trazador Etd<sup>+</sup> en los pericitos hipocampales identificados con TO-PRO-3 (Figura 10). Estos datos sugieren que el Etd<sup>+</sup> fue incorporado en el animal vivo en condiciones de comportamiento libre siendo capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica (la captación de Etd<sup>+</sup> se desarrolló in vivo y el análisis se realizó ex vivo). Con el objetivo de determinar que en dichas condiciones la captación de Etd<sup>+</sup> es mediada por panexones pericitarios funcionales, se inyectó el bloqueante de panexones probenecid por vía intraperitoneal (PBD; 200mg/kg peso i.p) en los ratones 20 minutos antes de la administración de Etd<sup>+</sup> (protocolo experimental en Figura 10A). Los resultados obtenidos muestran que la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos se inhibió en forma significativa 62.5% (Figura 10B). Cabe destacar que los valores de inhibición de la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos en presencia de PBD en los ensayos in vivo y ex vivo fueron similares (Figura 10D).

En suma, estos resultados indican que el ingreso de Etd<sup>+</sup> a los pericitos pericapilares cerebrales desde el medio extracelular mediado por panexones es un mecanismo funcional de los pericitos en condiciones de comportamiento libre (in vivo) validando los resultados obtenidos en las rodajas agudas de hipocampo (ex vivo).



Figura 10- Los pericitos del hipocampo incorporan el trazador Etd<sup>+</sup> desde el torrente sanguíneo mediante panexones en condiciones in vivo. (A) El esquema ilustra el procedimiento experimental. (B) Microfotografías fluorescentes del Stratum Radiatum del hipocampo muestran la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos identificados con TO-PRO-3, ante administración intraperitoneal de vehículo (control; mismo campo a – a'') y de PBD (PBD; mismo campo b - b''). c) Distribución de las frecuencias de los valores de captación de Etd<sup>+</sup> (AU o unidades arbitrarias) de los pericitos del experimento en A inyectados con el vehículo (suero fisiológico) (259 pericitos, 4 ratones) y tratados con PBD (279 pericitos, 4 ratones). d) El gráfico muestra la cuantificación de la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> [Unidades Arbitrarias (AU)] para pericitos de ratones inyectados con suero fisiológico (vehículo ip.; datos grises) (31.87±0.95; 308 pericitos, 4 ratones) o con un bloqueante de los canales de Px1, PBD (PBD i.p.; datos verdes) (12.22±0.53; 270 pericitos, 4 ratones) (C) Las imágenes fluorescentes muestran un mismo campo con un pericito identificado con TO-PRO-3 que captó Etd<sup>+</sup> en condiciones in vivo y que se encuentra adosado al endotelio vascular marcado con isolectina B4 (IB<sub>4</sub>). (D) Gráfica comparativa del coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) por pericitos hipocampales de ratones inyectados con suero fisiológico (vehículo, datos blancos: 1.00±0.03, 251 pericitos, 4 ratones) o con PBD (2mg/kg) (datos verdes: 0.36±0.02; 279 pericitos, 4 ratones) en el ensayo (In Vivo) y de la captación de Etd<sup>+</sup> de los pericitos de rodajas agudas de hipocampo en ausencia (Ctrl, datos blancos: 1.00±0.02, 434 pericitos, 7 ratones) o en presencia de PBD (0.5mM) (datos verdes: 0.38±0.03; 135 pericitos, 3 ratones) (Ex Vivo). En todas las gráficas cada símbolo representa el valor de fluorescencia absoluta o relativa para un pericito único. La fluorescencia relativa se calculó a partir de los valores de captación tanto para los pericitos de los ratones tratados con vehículo en los ensayos in vivo y en las condiciones basales de los ensayos ex vivo (Ctrl) como para los tratados con PBD in vivo o ex vivo normalizados con respecto a la media del vehículo/control de cada experimento. ns: no significativo entre los grupos indicados por la barra horizontal; \*\*\* p < 0.001 con relación al vehículo o al control (MannWhitney-test). Escala: 10µm en todas las imágenes.

#### **Objetivo Específico 3**

### 4.5- La liberación de ATP endógeno sustenta el intercambio mediado por canales de Px1 entre los pericitos y su microentorno en condiciones basales

Los canales de Px1 poseen un gran poro central que permite la salida de ATP en sistemas de expresión y en distintos tipos celulares (Iglesias et al., 2009; Locovei et al., 2006 a,b), por ende, los panexones actúan como vías regulables para la liberación del nucleótido. En astrocitos, la liberación de ATP mediada por Px1 puede activar receptores purinérgicos (Iglesias et al., 2009; Garré et al., 2010). En macrófagos, la activación de P2X7R induce la captación de colorante a través de canales de Px1 (Pelegrin & Surprenant, 2006). En este escenario, determinamos la participación de las vías ATP/P2X<sub>7</sub>R y ATP/PY<sub>6</sub>R sobre la funcionalidad de los canales de Px1 en los pericitos del hipocampo. Como primera aproximación, eliminamos el ATP del medio de incubación (ASCF en presencia de Etd<sup>+</sup>) mediante la aplicación de la enzima apirasa (8U/ml) (Apy, ectonucleasa soluble que hidroliza ATP en ADP y AMPc). Los resultados obtenidos muestran que la Apy inhibió significativamente el influjo de Etd<sup>+</sup> en un 57% en los pericitos salvajes (Figura 11A y Tabla 4). Concordantemente, en cultivos de pericitos de cerebro de rata el ingreso de Etd<sup>+</sup> fue prevenido por la Apy en un porcentaje similar. En cambio, la misma maniobra experimental no afectó significativamente el ingreso de Etd<sup>+</sup> a los pericitos de las rodajas agudas de hipocampo provenientes de ratones KO totales para la Px1 (Figura 11A). Estos resultados sugieren que, en condiciones basales, el ATP endógeno es responsable de mantener la funcionalidad de los panexones pericitarios. Considerando que los cultivos de pericitos cerebrales están conformados principalmente por este tipo celular, el efecto inhibitorio de la Apy sobre la captación de Etd<sup>+</sup> por estos pericitos, sugiere fuertemente que sería el ATP liberado por los propios pericitos el que sustenta la apertura de panexones en condiciones basales; en las rodajas agudas de hipocampo no se podría descartar una contribución del ATP desde las células gliales, las neuronas y/o el endotelio.

### 4.6- En condiciones basales, la activación de receptores purinérgicos ionotrópicos P2X<sub>7</sub> y metabotrópicos P2Y<sub>6</sub> subyace el intercambio pericitario con el entorno vía panexones

El ATP, molécula vasoactiva que regula el estado funcional de los pericitos, podría inducir la transferencia de Etd<sup>+</sup> por acciones mediadas a través de receptores purinérgicos catiónicos P2X (activados por ligando) y/o metabotrópicos P2Y (acoplados a proteína G). La activación de P2X7R por aplicación sostenida de ATP, puede promover el pasaje de moléculas relativamente grandes (~ 900 kDa) entre los medios intra y extracelular, como influjo de Etd<sup>+</sup> (North, 2002) y eflujo de ATP (Iglesias et al., 2009; Locovei et al., 2006 a,b). En los últimos años se han acumulado evidencias que indican que el poro que media dicho intercambio es el canal formado de Px1 asociado al  $P2X_7R$ , (apertura de canales de Px1 activada por P2X<sub>7</sub>R) (Pelegrin & Surprenant, 2006). Además del P2X<sub>7</sub>R, recientemente se han descrito otros tipos y subtipos de receptores purinérgicos que también activan canales de Px1, tales como el P2X<sub>4</sub> (Hung et al., 2013) y los P2Y<sub>1/2/6</sub> (Carneiro et al., 2014; Locovei, al., 2006 a; Timóteo et al., 2014). Los pericitos expresan receptores purinérgicos de tipo P2X<sub>1/7</sub> y P2Y<sub>2/4/6</sub> que aumentan la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> provocando contracción pericitaria (Crawford et al., 2012; Kawamura et al., 2003; Lacar et al., 2012). En este escenario, determinamos si la activación de los receptores purinérgicos (P2X y P2Y) por el ATP está mediando la transferencia transmembrana de Etd<sup>+</sup> a través de los panexones pericitarios; para ello realizamos ensayos de captación de Etd<sup>+</sup> en rodajas agudas de hipocampo en presencia de antagonistas genéricos de los receptores P2X y P2Y, respectivamente el ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico (PPADS) y reactive blue 2 (RB2) (Palea et al., 1994; Watano et al., 2002). La aplicación de estos antagonistas, inhibió la captación de Etd<sup>+</sup> en los pericitos en un 51% para el PPADS (50µM) mientras que la aplicación conjunta de PPADS (50µM) y RB2 (100µM) inhibió la captación de Etd<sup>+</sup> en un 78% (Figura 11B y Tabla 4). Estos datos sugieren que la activación de ambos tipos de receptores (P2X y P2Y) se encuentra en la base de los mecanismos que median la incorporación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos en condiciones basales. En este marco, investigamos la contribución específica de los subtipos de receptores ionotrópico P2X7 y metabotrópico P2Y6, empleando antagonistas específicos para el receptor ionotrópico P2X7R: brillant blue G (BBG), un inhibidor no competitivo de los P2X7R (Eschke et al., 2002) y A804598 (Donnelly-Roberts et al., 2009), un antagonista

selectivo del receptor metabotrópico P2Y<sub>6</sub>R (MRS 2578) (Wihlborg et al., 2006). En presencia de brillant blue G (BBG; 5 µM), la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos exhibió una disminución significativa de 45%. En concordancia con este resultado, la aplicación de distintas concentraciones de A804598 (0.2, 5.0, 10 y 100µM), generó una inhibición significativa de la captación de Etd<sup>+</sup> del 43%, 40%, 41% y 54% respectivamente; resultados similares fueron observados en cultivos pericitarios para la concentración de 0.2 µM (Figura 11C y Tabla 5). Por su parte, en forma similar, el MRS 2578, un antagonista selectivo de los P2Y<sub>6</sub>R, inhibió el influjo de Etd<sup>+</sup> por los pericitos de manera concentración dependiente (0.2, 5.0, 10 y 100µM) en 19%, 37%, 45% y 53% para cada concentración respectivamente (Figura 11D y Tabla 6). La aplicación conjunta de A804598 (5µM) y MRS2578 (5µM) en el medio de incubación de las rodajas agudas de hipocampo de ratones salvajes, indujo una disminución del 78% de la captación de colorante (Figura 10D). Este valor de inhibición fue similar a la suma de la inhibición en la captación de Etd<sup>+</sup> inducida por cada bloqueante al aplicarlo de manera independiente (77%), observándose una captación residual no atribuible a estos sistemas de activación (panexón/receptores purinérgicos). Para validar que en condiciones basales el intercambio de los pericitos con el entorno es vía panexones y está mantenida por la activación de P2X<sub>7</sub>R y P2Y<sub>6</sub>R, se realizaron las mismas maniobras experimentales en rodajas agudas de hipocampo provenientes de animales KO para la Px1 (Panx1-<sup>-/-</sup>). La aplicación de una única concentración de A804598 (5µM) o de MRS2578 (5µM) que resultó efectiva en inhibir la captación de Etd<sup>+</sup> en los pericitos de ratones salvajes no afectó el influjo de Etd<sup>+</sup> a los pericitos de los ratones KO Panx1<sup>-/-</sup> (Figura 11C y D y Tabla 6).

Por su parte, los pericitos cerebrales cultivados exhibieron un comportamiento similar a los pericitos de las rodajas de hipocampo de los ratones salvajes, ya que la captación de colorante por los mismos se inhibió de manera significativa ante el agregado de estos bloqueantes específicos de P2X<sub>7</sub>R y P2Y<sub>6</sub>R. Los valores de los coeficientes de captación de estos experimentos se transcriben en las Tablas 4, 5 y 6.



Figura 11 - El intercambio mediado por panexones entre los pericitos y su entorno en condiciones basales, requiere de la liberación de ATP endógeno y la activación de receptores purinérgicos ionotrópicos P2X7 (P2X7R) y metabotrópicos P2Y6 (P2Y6R). (A) La gráfica de barras muestra los coeficientes de captación de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) para pericitos control (barras blancas) y tratados con apirasa (Apy; barras grises) en rodajas agudas de hipocampos derivadas de ratones: salvajes (Ctrl, 4 ratones; Apy, 8 U/ml, 4 ratones), KO totales para Panx1-/- (Ctrl, 3 ratones; Apy, 8 U/ml, 3 ratones) y en cultivos de pericitos de ratas (Ctrl, 5 ensayos independientes; Apy, 2 U/ml, 3 ensayos independientes). (B) La gráfica de barras muestra los coeficientes de captación de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) de pericitos de rodajas agudas de hipocampo en condición control (datos grises), en presencia del agonista general de los P2Xr, PPADS (datos rojos) (Ctrl, 5 ratones; PPADS, 50 µM, 5 ratones) y tratados en forma conjunta con un inhibidor general del P2X, PPADS (50 µM) y un inhibidor general del P2Y, RB2 (100 µM) (datos verdes) (Ctrl, 5 ratones; RB2+PPADS, 5 ratones). (C) La gráfica de barras muestra los coeficientes de captación de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) por los pericitos de las rodajas agudas de hipocampo en condiciones control (gris), tratados con un inhibidor los P2X7R, BBG (Ctrl, 4 ratones; BBG, 5 µM, 3 ratones) y con diferentes concentraciones de un bloqueante específico del P2X<sub>7</sub>R, el A804598 (0.2 - 100 μM) (Ctrl, 4 ratones; A804598: 0.2 μM 3 ratones, 5 μM, 4 ratones, 10 μM, 4 ratones y 100 µM,4 ratones) (datos rojos). En los pericitos de las rodajas agudas de hipocampos de ratones KO Panx1-/- se validó una única concentración de del bloqueante del P2X71R A804598 (Ctrl, 4 ratones; A804598, 5 µM, 4 ratones) así como en cultivos de pericitos cerebrales de ratas (Ctrl, 5 ensayos independientes; A804598, 0.2 µM, 3 ensayos independientes). (D) Las gráficas ilustran el coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) para: (1) pericitos de rodajas agudas de hipocampo en condiciones control (datos grises) y con diferentes concentraciones  $(0.2 - 100 \ \mu\text{M})$  del bloqueante específico del P2Y<sub>6</sub>R, el MRS2578 (lila) (Ctrl, 4 ratones; MRS2578, 0.2 µM, 3 ratones, 5 µM, 4 ratones, 10 µM, 3 ratones y 100 µM, 3 ratones), (2) pericitos en presencia de una concentración única del bloqueante de P2Y<sub>6</sub>R, el MRS2578 en rodajas agudas de hipocampo de ratones KO Panx1-/-(Ctrl, 3 ratones; MRS2578, 5 µM, 3 ratones) y (3) para cultivos de pericitos cerebrales de ratas (Ctrl, 5 ensayos independientes; MRS 2578, 5 µM, 3 ensayos independientes). Finalmente, se representa el coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos en rodajas agudas de hipocampo salvajes en presencia de A804598 (5 µM) y MRS2578 (5 µM) aplicados juntos (datos en verde) (Ctrl, 3 ratones; A804598+MRS2578, 3 ratones). En todas las gráficas los datos corresponden al valor de la captación de Etd<sup>+</sup> de cada pericito individual normalizado con respecto a la media del control de su propio ensayo. Estadística: ns no significativo; \* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001; al comparar versus control o entre concentraciones (indicado por barras horizontales), Kruskal-Wallis test con post-test en los gráficos B y C (solo los que representan varias concentraciones de fármaco), en el resto de los gráficos se realizó el Mann-Whitney test.

	Eliminación de	ATP del medio	Antagonistas genéricos de los receptores P2X y P2Y				
	Ctl	Apyrase 8 unidades/ml	Ctl	PPADS (50 μM)	РРАДS (50 µМ)+RB2 (100 µМ)		
Pericitos de ratones salvajes	1.00±0.02 (n=234)	0.43±0.01 (n=243)	1.00±0.02 (n=295)	0.49±0.03 (n=175)	0.22±0.01 (n=289)		
Pericitos de ratones KO totales para la Panx1-/-	1.00±0.03 (n=424)	0.98±0.03 (n=279)	N/E	N/E	N/E		
Cultivos de pericitos Murinos	1.00±0.05 (n=30)*	0.5±0.02 (n=18)*	N/E	N/E	N/E		

Tabla 4- Coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos (Media ± S.E.M.) en presencia de apirasa e inhibidores genéricos de receptores purinérgicos. n es la cantidad de pericitos, salvo en cultivos donde n representa el número de campos de pericitos cultivados (\*), N/E no ensayado.

		Antago		Antagonista Específico del Receptor P2X <sub>7</sub>			
	Cti	A804598 (0.2 μM)	A804598 (5.0 μM)	A804598 (10 μM)	A804598 (100 μM)	Cti	Brillant blue G (5 µM)
Pericitos de ratones salvajes	1.00±0.03 (n=223)	0.57±0.03 (n=92)	0.6±0.04 (n=115)	0.59±0.03 (n=253)	0.46±0.02 (n=194)	1.00±0.02 (n=306)	0.55±0.02 (n=143)
Pericitos de ratones KO totales para la Panx1-/-	1.00±0.02 (n=618)	N/E	0.99±0.03 (n=395)	N/E	N/E	N/E	N/E
Cultivos de pericitos murinos	1.00±0.04 (n=22)*	N/E	0.52±0.03 (n=15)*	N/E	N/E	N/E	N/E

Tabla 5- Coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos (Media ± S.E.M.) en presencia de inhibidores específicos de receptores purinérgicos de tipo P2X<sub>7</sub>. n es la cantidad de pericitos, (\*) en cultivos n representa el número de campos de pericitos cultivados, N/E no ensayado.

		Antagonista Específico del Receptor P2Y <sub>6</sub>					Antagonistas Específicos P2Y6y P2X7		
	Ctl	MRS 2578 (0.2 μM)	MRS 2578 (5.0 μM)	MRS 2578 (10 μM)	MRS 2578 (100 μM)	Ctl	A804598 (5.0 μM) + MRS 2578 (5.0 μM)		
Pericitos de ratones salvajes	1.00±0.04 (n=147)	0.81±0.04 (n=108)	0.63±0.03 (n=136)	0.55±0.04 (n=77)	0.47±0.03 (n=81)	1.00±0.04 (n=175)	0.21±0.02 (n=74)		
Pericitos de ratones KO totales para la Panx1-/-	1.00±0.03 (n=483)	N/E	0.97±0.04 (n=203)	N/E	N/E	N/E	N/E		
Cultivos de pericitos murinos	1.00±0.03 (n=20)*	0.68±0.01 (n=23)*	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E		

Tabla 6- Coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos (Media  $\pm$  S.E.M.) en presencia de un inhibidor específico de los receptores purinérgicos de tipo P2Y<sub>6</sub>. n es la cantidad de pericitos, salvo en cultivos donde n representa el número de campos de pericitos cultivados (\*), N/E no ensayado.

En conjunto, los resultados presentados hasta aquí sugieren que en condiciones basales el mediador ATP liberado endógenamente por los propios pericitos, activa los receptores purinérgicos pericitarios de tipo  $P2X_7 y P2Y_6$  para establecer el intercambio de estas células y su micro-entorno vía panexones funcionales (esquematizado a continuación).



**Esquema 1-**A partir los resultados obtenidos postulamos que en condiciones de reposo/basales los panexones (Panx1) pericitarios se encuentran funcionales captando Etd<sup>+</sup> desde el entorno y liberando ATP al medio extracelular, el cual en forma autócrina activa receptores purinérgicos ionotrópicos  $P2X_7$  y metabotrópicos  $P2Y_6$  manteniendo funcional el sistema de retroalimentación positivo entre panexones y receptores purinérgicos. P- Pericito, C- Capilar

#### **Objetivo Específico 4**

## 4.7- La activación de receptores glutamatérgicos (AMPA y NMDA) se asocia a una disminución del intercambio pericito - fluido cerebral por el cierre de panexones

Concepciones en crecimiento postulan que, durante la actividad cerebral los pericitos pericapilares contráctiles serían los primeros elementos vasculares en responder ante las demandas metabólicas neuronales actuando como sensores y relajándose activamente para aumentar el flujo sanguíneo cerebral local en condiciones de demanda metabólica (Hall et al., 2014; Hartmann et al., 2021; Ivanova et al., 2017, 2019; Nelson et al., 2020). En el marco de esta tesis evaluamos si el intercambio de los pericitos con el fluido cerebral mediado por canales de Px1 es regulado por el neurotransmisor glutamato en rodajas agudas de hipocampo. La elección del glutamato se fundamentó en que: (1) constituye el principal neurotransmisor excitatorio del cerebro, (2) ha sido involucrado como mediador del acoplamiento neuro-vascular, (3) activa receptores neuronales de tipo NMDA y AMPA y (4) la activación de estos receptores subyace a los procesos de plasticidad sináptica en el hipocampo asociados a la memoria y el aprendizaje (Hall et al., 2014; Peppiatt et al., 2006; Simandle et al., 2005; Wendling et al., 1996). Los resultados obtenidos mostraron que, la administración de distintas concentraciones de glutamato (100, 250, 500, 750, 1500µM) en el medio de incubación de las rodajas agudas de hipocampo indujo una disminución concentración dependiente de la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos (de 18%, 66%, 68%, 68%, 68% respectivamente), con una IC<sub>50</sub> de aproximadamente 170µM. La incubación de las rodajas en ACSF bajo en Mg<sup>++</sup> se usó como control y no generó de por sí una variación significativa de la captación de Etd<sup>+</sup> (Figura 12A y Tabla 7), sugiriendo que los niveles de glutamato endógeno no modularon la permeabilidad de los pericitos en condiciones control. El efecto inhibidor del glutamato sobre la permeabilidad pericitaria al Etd<sup>+</sup> fue prevenido cuando las rodajas agudas de hipocampo salvajes fueron incubadas en presencia de glutamato y de antagonistas de los receptores glutamatérgicos. Así, la inhibición de la captación pericitaria de Etd<sup>+</sup> por el glutamato 500µM se revirtió en un 35% en presencia del antagonista de los receptores del tipo NMDA (CPP (20µM)), en un 68% en presencia del antagonista de los receptores del tipo AMPA (CNQX (15µM)), y en un 93% en presencia de ambos antagonistas aplicados conjuntamente CPP (20µM) + CNQX (15µM) (Figura12B y Tabla 8).

Para corroborar que la activación de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA y NMDA modula el intercambio de los pericitos con el medio extracelular, se evaluó la permeabilidad pericitaria al Etd<sup>+</sup> en presencia de NMDA (40µM), AMPA (40µM) y NMDA+AMPA (40µM c/u). Los resultados obtenidos mostraron que estos agonistas glutamatérgicos generan una disminución de la captación de Etd<sup>+</sup> pericitario con respecto al control de 29% para el NMDA, de 46% para AMPA y de 63% para ambos (AMPA+NMDA) (Figura 12C); este último valor fue similar al máximo efecto del glutamato en concentración 500µM (68%). Para determinar si la disminución de la captación de Etd<sup>+</sup> inducida por glutamato y por el AMPA+NMDA es mediada por canales pericitarios de Px1, se realizaron las mismas maniobras experimentales en rodajas agudas de hipocampo de animales KO totales para la Px1. Los resultados obtenidos mostraron que, en los pericitos de las rodajas provenientes de los ratones KO totales para la Px1 el influjo de Etd<sup>+</sup> a los pericitos en presencia de los agonistas de los receptores glutamatérgicos no presentó diferencias significativas en comparación con la condición control (Figura 12C y Tabla 7). Por otra parte, cuando se trataron pericitos en cultivo con AMPA o con NMDA no se observó variación del intercambio de los pericitos con el micro-entorno (Figura 12D y Tabla 7), evidenciando que el efecto de ambos agonistas no se ejerce directamente sobre los pericitos; estos hallazgos sugieren que la disminución de la funcionalidad de los panexones pericitarios por el glutamato requiere de la participación de otro(s) tipo(s) celular(es) y de otro(s) mediador(es) presente(s) en la rodaja.

En resumen, el conjunto de estos resultados sugiere que el neurotransmisor glutamato a través de la activación de ambos tipos de receptores de glutamato neuronales (NMDA y AMPA) provoca una disminución del intercambio del pericito con el medio extracelular mediado por el cierre de panexones, y que este efecto no es por acción directa del neurotransmisor sobre los panexones pericitarios.



Figura 12- El neurotransmisor excitatorio glutamato, a través de la activación de los receptores NMDA y AMPA, genera una disminución del intercambio de los pericitos con el medio extracelular mediado por panexones. (A) En rodajas agudas de hipocampo derivadas de ratones salvajes, la aplicación de glutamato inhibió la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos de manera concentración dependiente. La gráfica de barras muestra los coeficientes de captación de Etd<sup>+</sup> (Media  $\pm$  SEM) de los pericitos en presencia de las siguientes concentraciones de glutamato (100 $\mu$ M – 1.5mM) aplicadas en el medio de incubación de las rodajas (ASCF bajo Mg<sup>2+</sup> en presencia de Etd<sup>+</sup>). Se cuantificó la transferencia de colorante en pericitos hipocampales en condición control (incubados en ACSF normal; 354 pericitos, 8 ratones), en pericitos incubados en la solución de dilución (ACSF modificado bajo en Mg<sup>2+</sup>; 281 pericitos, 5 ratones) y en pericitos tratados con glutamato (barras grises; 100µM, 155 pericitos, 4 ratones; 250µM, 64 pericitos, 3 ratones; 500µM, 80 pericitos, 3 ratones; 750µM, 89 pericitos, 3 ratones; 1.5mM, 117 pericitos, 3 ratones). \*\* p < 0.01, \*\*\* p<0.001; comparado con el control; ### p < 0.001; cuando se compara con los tratados con ACSF bajo  $Mg^{2+}$ ; ns, no significativo; &&& p < 0.001, comparaciones entre grupos indicados por la barra horizontal, Kruskal Wallis-test seguido de post-test Dunn. (B) La reducción en la permeabilidad pericitaria inducida por el glutamato es mediada por activación de receptores ionotrópicos NMDA y AMPA. Gráfica: la disminución del influjo de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) inducida por dos concentraciones de glutamato (círculos grises; 100 y 500µM) es parcialmente revertida en presencia del antagonista de los NMDAr (CPP 20µM; círculos rosas) o por el antagonista de los AMPAr (CNQX15µM; círculos violetas) cuando se aplica en forma independiente, y cuasi totalmente revertido cuando ambos antagonistas se aplican simultáneamente (círculos negros). La cantidad de pericitos y ratones para cada condición es la indicada a continuación: glutamato (Glu), 0µM, 363 pericitos, 8 ratones; 100µM, 156 pericitos, 4 ratones; y 500µM, 80 pericitos, 3 ratones; CPP + Glu 0µM, 442 pericitos, 5 ratones; CPP + Glu 100µM, 194 pericitos, 4 ratones; CPP + Glu 500µM, 322 pericitos, 4 ratones; CNQX + Glu 0μM, 443 pericitos, 5 ratones; CNQX + Glu 100μM, 220 pericitos, 4 ratones; CNQX + Glu 500μM, 373 pericitos, 4 ratones; CPP + CNQX + Glu 0µM, 369 pericitos, 3 ratones; CPP + CNQX + Glu 100µM, 196 pericitos, 3 ratones; CPP + CNQX + Glu 500µM, 319 pericitos, 3 ratones; \* p<0.01; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; comparado con la correspondiente concentración de Glu (0, 100 o 500 µM), Mann-Whitney test; ns, no significativo; ### p<0.001; comparado con el efecto de los inhibidores aplicados solos (Glu 0µM), Kruskal Wallis-test seguido de post-test Dunn. (C) La activación de los NMDAr y AMPAr inhibe el influjo de colorante hacia los pericitos en rodajas agudas de hipocampo. La gráfica de barras muestra el efecto del NMDA (40µM) y del AMPA (40µM) sobre la captación de Etd<sup>+</sup> en pericitos hipocampales de ratones salvajes (Media ± SEM) [control (datos negros), 867 pericitos, 10 ratones; NMDA (datos rosas), 158 pericitos, 3 ratones; AMPA (datos violetas), 201 pericitos, 3 ratones; NMDA+AMPA (barra negra), 270 pericitos, 3 ratones]; \*\*\* p<0.001; versus control; ns, no significativo; && p<0.01; &&& p<0.001, comparación entre los dos grupos indicados por la barra horizontal, Kruskal Wallis-test seguido de post-test Dunn. La gráfica de barras derecha ilustra la situación control (290 pericitos, 3 ratones), el efecto del glutamato (500 µM) (281 pericitos, 3 ratones) y la aplicación simultánea de NMDA (40µM) y AMPA (40µM) (264 pericitos, 3 ratones) sobre la captación de Etd<sup>+</sup> de los pericitos hipocampales (Media ± SEM) provenientes de animales KO Px1<sup>-/-</sup>. ns, no significativo vs control; Kruskal Wallis-test seguido de post-test. (D) La gráfica de barras ilustra el efecto sobre la captación de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) en cultivos pericitarios controles (20 campos, 3 experimentos independientes), tratados con NMDA (40µM) (11 campos, 3 experimentos independientes) y con AMPA (40µM) (29 campos, 3 experimentos independientes). ns, no significativo vs control, one-way ANOVA seguido de post-test. En todas las gráficas cada símbolo representa el valor de fluorescencia relativa de cada pericito, calculada como la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> del pericito normalizada con respecto a la media de la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> del control de cada experimento.

		Captación pericitaria de Etd <sup>+</sup> en rodajas agudas de hipocampo en presencia de:											
	Ctl	Ctl bajo Mg <sup>2+</sup>	glutamato (100µM)	glutamato (250µM)	glutamato (500µM)	glutamato (750µM)	glutamato (1500µM)	Ctl	АМРА (40µМ)	NMDA (40µM)	AMPA (40μM) NMDA (40μM)		
Pericitos de ratones salvajes	1.00±0.02 (n=354 pericitos)	0.97±0.03 (n=281)	0.82±0.04 (n=155)	0.34±0.04 (n=64)	0.32±0.03 (n=80)	0.32±0.02 (n=89)	0.32±0.02 (n=117)	1.00±0.02 (n=867)	0.54±0.02 (n=201)	0.71±0.03 (n=158)	0.36±0.02 (n=270)		
Pericitos de ratones KO totales para la Panx1-/-	1.00±0.05 (n=290 pericitos)	N/E	N/E	N/E	1.02±0.04 (n=264)	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	0.91±0.04 (n=264)		
Cultivos de pericitos murinos	1.00±0.03 (n=20 campos)	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	0.93±0.03 (n=29 campos)	0.89±0.07 (n=11 campos)	N/E		

Tabla 7- Coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos (Media ± S.E.M.) en presencia de los agonistas de los receptores glutamatérgicos excitatorios: glutamato, NMDA y AMPA, n es la cantidad de pericitos, N/E no ensayado.

	Captación pericitaria de Etd⁺en rodajas agudas de hipocampo en:											
Ausencia de glutamato			Presencia de glutamato (100µM)			Presencia de glutamato (500µM)						
	Ctl	СРР (20µМ)	CNQX (15µM)	CPP (20µM) + CNQX (15µM)	Control (Glut 100µM)	СРР (20µМ)	CNQX (15µM)	CPP (20µM) + CNQX (15µM)	Control (Glut 500µM)	СРР (20µМ)	CNQX (15µM)	CPP (20µM) + CNQX (15µM)
Pericitos de ratones salvajes	1.00±0.02 (n=354 pericitos)	1.00±0.02 (n=442)	1.00±0.02 (n=443)	1.01±0.03 (n=369)	0.82±0.04 (n=155)	0.96±0.04 (n=194)	0.95±0.03 (n=220)	0.98±0.04 (n=196)	0.32±0.03 (n=80)	0.56±0.02 (n=322)	0.78±0.02 (n=373)	0.95±0.04 (n=319)
Pericitos de ratones KO totales para la Panx1-/-	1.00±0.05 (n=290 pericitos)	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	1.02±0.04 (n=281)	N/E	N/E	0.91±0.04 (n=264)

 Tabla 8- Coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos (Media  $\pm$  S.E.M.) en presencia de los antagonistas de los receptores glutamatérgicos excitatorios, n es la cantidad de pericitos, N/E no ensayado.

#### **Objetivo Específico 5**

4.8- Los agentes vasoconstrictores ATP y norepinefrina generan un aumento del intercambio de los pericitos con el entorno por apertura de canales de gran poro formados de Px1

Los agentes vasoactivos son capaces de controlar el tono contráctil pericitario y el diámetro capilar cerebral. Como se describió en la introducción los pericitos responden contrayéndose en presencia de ATP y norepinefrina (NE). En otros sistemas se ha descrito que ambos agentes activan receptores, induciendo la apertura de los panexones lo que resulta en liberación de ATP al medio extracelular (Billaud et al., 2011, 2012; Cai et al., 2018; Kawamura et al., 2003; Lacar et al., 2012; Peppiatt et al., 2006). En este sentido, postulamos que la liberación localizada del nucleótido (ATP) por los panexones en regiones cercanas a la membrana de los pericitos podría presentar implicancias funcionales sobre los pericitos. Inicialmente, evaluamos el efecto de concentraciones únicas de ATP exógeno sobre el influjo de Etd<sup>+</sup> mediado por panexones pericitarios en rodajas agudas de hipocampo. Como se observa en la Figura13 y en la Tabla 9, la aplicación de distintas concentraciones de ATP provocó un aumento en la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos para las concentraciones  $\geq$  a 75µM. El efecto máximo del ATP sobre la permeabilidad pericitaria al Etd<sup>+</sup> se obtuvo para la concentración de 100µM, la cual generó un incremento del ingreso del trazador a los pericitos de un 49%. concentraciones mayores de ATP (0.5, 1.0 y 5.0mM) también provocaron un aumento significativo del influjo pericitario de Etd<sup>+</sup> (37%, 30% y 19% respectivamente) en relación al control, aunque dicho aumento fue decreciendo conforme la concentración de ATP se incrementó (Figura13A y Tabla 9); este hallazgo se discutirá en el próximo capítulo.

Debido a que el ATP aumenta el tono contráctil de los pericitos (Cai et al., 2018; Kawamura et al., 2003) la contracción pericitaria podría concentrar el colorante en el soma pericitario alterando el valor de la fluorescencia por un mecanismo diferente al cambio de la permeabilidad por apertura de canales de gran poro. Para descartar un efecto del cambio de forma en la cuantificación de la fluorescencia evaluamos si la concentración de ATP de mayor efecto (100µM) sobre el ingreso de Etd<sup>+</sup> induce cambios morfológicos en los somas pericitarios que puedan concentrar el colorante. El

análisis del área y del perímetro del soma pericitario no reveló diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con ATP ( $100\mu$ M) (Figura13B). Este resultado junto al hecho de que el ATP es lavado del medio luego de la incubación, sugieren que los somas pericitarios no habrían cambiado su morfología al momento de la cuantificación.

Para determinar si son los panexones los involucrados en el incremento de la permeabilidad pericitaria observada en presencia de ATP, se evaluó el efecto de dos concentraciones de ATP (100µM y 5mM) sobre el influjo de Etd<sup>+</sup> hacia los pericitos en rodajas agudas de hipocampo de ratones KO totales para la Px1. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la captación de Etd<sup>+</sup> entre los pericitos de las rodajas de los ratones KO para la Px1 tratados con ATP versus los no tratados, tanto para la concentración que generó un intercambio máximo (100µM) como la que produjo el menor intercambio (5mM) en los ratones salvajes (Figura13A y Tabla 9) confirmando la participación de panexones.



Figura 13- El agente vasoconstrictor ATP activa panexones pericitarios en rodajas agudas de hipocampo. (A) La administración de ATP exógeno aumenta la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos pericapilares a través de panexones en rodajas agudas de hipocampo de manera concentración dependiente. Las gráficas (curva superior y barras inferior) muestran el coeficiente de captación pericitaria de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) en rodajas agudas de hipocampo derivados de ratones salvajes en control (puntos grises; 937 pericitos, 6 ratones) y en presencia de varias concentraciones de Mg-ATP (0.05-5mM) (puntos rosados, concentraciones: 0.05mM, 232 pericitos, 3 ratones; 0.075mM, 215 pericitos, 3 ratones; 0.1mM, 891 pericitos, 6 ratones; 0.5mM, 490 pericitos, 6 ratones; 1mM, 481 pericitos, 5 ratones; 5mM, 326 pericitos, 4 ratones). ns, no-significativo; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001 versus control; Kruskal Wallis-test seguido de post-test. &&& p<0.001, comparaciones entre grupos indicados por la barra horizontal, Kruskal Wallis-test seguido de post-test Dunn. La gráfica de barras de la derecha muestra los coeficientes de captación de Etd<sup>+</sup> (Media ± SEM) para pericitos tratados con dos concentraciones de ATP (0.1 y 5 mM) en rodajas de hipocampos de ratones KO totales para la panexina 1 (Panx 1 //) (control de 0.1mM, 539 pericitos, 5 ratones; ATP 0.1mM, 605 pericitos, 5 ratones; control de 5mM, 284 pericitos, 3 ratones; ATP 5mM, 322 pericitos, 3 ratones). ns, nosignificativo, Mann-Whitney test. (B) El incremento de la fluorescencia del Etd<sup>+</sup> inducido por el mediador ATP no se asocia a cambios morfológicos del soma pericitario. El área (µm<sup>2</sup>) y el perímetro (µm) de los somas pericitarios en condición control y tratados con ATP fueron medidos y graficados (Media ± SEM). Los pericitos tratados con ATP (0.1mM) no exhiben cambios en el área (gráfica de la derecha, barra rosa; control, 84 pericitos, 3 ratones; ATP 0.1mM, 114 pericitos, 3 ratones) o perímetro (gráfica izquierda: control, 86 pericitos, 3 ratones; ATP 0.1mM, 115 pericitos, 3 ratones) de sus somas comparados contra el control. ns, no-significativo, Mann-Whitney test para el gráfico del área y t-test no pareado para el perímetro. En todas las gráficas cada punto representa el valor de fluorescencia relativa de cada pericito, calculada como la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> de cada pericito individual normalizado con respecto a la media de la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> de todos los pericitos control de cada experimento.

	Captación pericitaria de Etd <sup>+</sup> en rodajas agudas de hipocampo en presencia de ATP									
	Ctl	ATP (0.05 mM)	ATP (0.075 mM)	ATP (0.1 mM)	ATP (0.5 mM)	ATP (1.0 mM)	ATP (5.0 mM)			
Pericitos de ratones salvajes	1.00±0.14 (n=937 pericitos)	0.97±0.03 (n=232 pericitos)	1.22±0.05 (n=215 pericitos)	1.49±0.03 (n=891 pericitos)	1.37±0.02 (n=490 pericitos)	1.30±0.04 (n=481 pericitos)	1.19±0.03 (n=326 pericitos)			
Pericitos de ratones ko totales para la Panx1 -/-	1.00±0.02 (n=539 pericitos)	N/E	N/E	1.01±0.02 (n=539 pericitos)	N/E	N/E	0.96±0.03 (n=322 pericitos)			

Como se detalló en la introducción y se discute en el próximo capítulo, la noradrenalina (NE) activa la apertura de panexones a través del receptor  $\alpha$ 1–adrenérgico para regular el flujo sanguíneo en las arterias de resistencia (Billaud et al., 2011, 2012). En la red capilar cerebral, la NE induce un aumento del tono pericitario (Dai et al., 2009; Kelley et al., 1987; Markhotina et al., 2007) y vasoconstricción capilar (Hall et al., 2014; Peppiatt et al., 2006). En este escenario, evaluamos el efecto de la NE sobre el intercambio mediado por panexones en los pericitos. Se trabajó con concentraciones de NE reportadas que generan contracción pericitaria (10, 15, 50 y 100 $\mu$ M). Los resultados obtenidos mostraron que la incubación de rodajas agudas de hipocampo en presencia de Etd<sup>+</sup> y NE provoca un incremento del ingreso de Etd<sup>+</sup> (del 30%, 64%, 65%, 57% para cada concentración mencionada respectivamente) en pericitos provenientes de rodajas agudas de hipocampo de ratones salvajes. La respuesta fue concentración-dependiente mostrando saturación para concentración (15 $\mu$ M) en rodajas agudas de animales KO totales para la Px1 no se encontró incremento en la captación de Etd<sup>+</sup> pericitaria (Figura 14 y Tabla 10).



Figura 14-El vasoconstrictor noradrenalina (NE) aumenta la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos pericapilares a través de panexones de manera concentración dependiente. Las gráficas de curva de puntos (arriba) y de barras (abajo) muestra el coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> (Media  $\pm$  SEM) pericitario para rodajas agudas de hipocampos de ratones salvajes y KO para Panx1 en presencia de norepinefrina. En ratones salvajes se aplicaron varias concentraciones de NE (1.5–100µM). Los valores de pericitos y animales fueron los siguientes: control (puntos grises; 776 pericitos, 6 ratones); NE (puntos rojos; 1.5µM, 238 pericitos, 4 ratones; 10µM, 345 pericitos, 4 ratones; 15µM, 272 pericitos, 5 ratones; 50 µM, 181 pericitos, 3 ratones; 100µM, 96 pericitos, 3 ratones). ns, no-significativo; \*\*\* p<0.001 versus control; Kruskal Wallis-test seguido de post-test Dunn. & p<0.05, &&& p<0.001, comparaciones entre grupos indicados por la barra horizontal, Kruskal Wallis-test seguido de post-test Dunn. La gráfica sombreada a la derecha muestra el coeficiente de captación pericitaria de Etd<sup>+</sup> (Media  $\pm$  SEM) para rodajas de hipocampos derivadas de ratones KO Panx1<sup>-/-</sup> para el control (148 pericitos, 3 ratones) y en presencia de norepinefrina 15µM (NE, 159 pericitos, 3 ratones). ns, no-significativo, calculada com representa el valor de fluorescencia relativa de cada pericito, calculada com la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> de todos los pericitos, calculada com respecto a la media de la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> de todos los pericitos control de cada experimento.

	Captación pericitaria de Etd⁺en rodajas agudas de hipocampo en presencia de NE									
	Ctl	ΝΕ (1.5μM)	ΝΕ (10μΜ)	ΝΕ (15μM)	ΝΕ (50μΜ)	NE (100µM)				
Pericitos de ratones salvajes	1.00±0.02 (n=776 pericitos)	0.99±0.03 (n=238 pericitos)	1.30±0.03 (n=345 pericitos)	1.64±0.05 (n=272 pericitos)	1.65±0.06 (n=181 pericitos)	1.57±0.07 (n=96 pericitos)				
Pericitos de ratones KO totales para la Panx1-/-	1.00±0.05 (n=148 pericitos)	N/E	N/E	1.12±0.05 (n=159 pericitos)	N/E	N/E				

Tabla 10- Coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos (Media  $\pm$  S.E.M.) en presencia de múltiples concentraciones del agente vasoconstrictor norepinefrina (NE), n es la cantidad de pericitos; N/E no ensayado.

En conjunto, estos resultados indican que el aumento del intercambio pericito-fluido cerebral inducido por el ATP y por la NE está mediado por activación de panexones pericitarios de manera concentración-dependiente.

## 4.9- Los agentes vasodilatadores Acetilcolina y PGE<sub>2</sub> generan disminución del intercambio de los pericitos con el entorno mediante el cierre de panexones

El agente parasimpático vasodilatador acetilcolina (ACh) induce vasodilatación en la macrocirculación a nivel arteriolar, mientras que, en la red capilar inhibe el tono pericitario y aumenta el diámetro capilar y el flujo sanguíneo cerebral (Furchgott & Zawadzki, 1980; Meng et al., 1996; Rosenblum, 1992; Wu et al., 2003; Zambach et al., 2020; Zhang & Iadecola.,1995). En este marco, se evaluó si la ACh modula la funcionalidad de los panexones pericitarios y por lo tanto el intercambio mediado por estos canales de gran poro. La incubación de las rodajas agudas de hipocampo salvajes en presencia de ACh en concentración 10µM en el medio disminuye significativamente el intercambio de Etd<sup>+</sup> en 74% para los pericitos pericapilares. Cuando la ACh se administró en rodajas agudas de hipocampo de ratones KO para la Px1, la disminución del influjo de Etd<sup>+</sup> pericitario también fue significativo, 11% menor que para la condición control (Figura 15 y Tabla 11). Sin embargo, el efecto inhibitorio de la ACh sobre la captación de colorante fue significativamente mayor en los pericitos salvajes (74%) que en los KO Panx 1<sup>-/-</sup> (11%), lo que sugiere que la ACh regula el intercambio de los pericitos con el micro-entorno fundamentalmente por la modulación de la funcionalidad de los canales de Px1.

Dentro de los agentes vasodilatadores que caracterizamos en esta tesis, también se evaluó el efecto de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sobre la permeabilidad de la membrana pericitaria mediada por panexones. La PGE<sub>2</sub> es un metabolito derivado del ácido araquidónico y un potente vasodilatador a nivel arteriolar (Nippert et al., 2018); se ha reportado que este agente es responsable del acoplamiento neurovascular durante la respuesta hiperémica en corteza por su acción sobre el músculo liso de las arteriolas (Takano et al., 2006; Zonta, Angulo, et al., 2003; Zonta, Sebelin, et al., 2003). En rodajas cerebelares, se ha determinado que la PGE<sub>2</sub> actuando sobre los pericitos media la vasodilatación capilar generada por la aplicación de glutamato exógeno en presencia de óxido nítrico (NO) quien actuaría como agente permisivo inhibiendo el efecto vasoconstrictor producido por el 20-

HETE (20-ácido hidroxieicosatetraenoico) (Hall et al., 2014). En función de los datos aquí obtenidos y presentados, es decir, considerando que el efecto inhibitorio del glutamato sobre los panexones pericitarios es indirecto, la PGE2 surge como un candidato para mediar el efecto del glutamato sobre los panexones de los pericitos. Al aplicar PGE<sub>2</sub> (10 $\mu$ M) en el medio de incubación de las rodajas agudas de hipocampo de ratones salvajes en condiciones basales, y durante la pre-contracción con NE 1.5 $\mu$ M no se observaron variaciones en la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos. En cambio, la aplicación de PGE<sub>2</sub> (10 $\mu$ M) en presencia de NE en concentración constrictoras (NE, 15 $\mu$ M) revirtió en un 99% el incremento de la captación pericitaria de Etd<sup>+</sup> obtenido al aplicar NE (15 $\mu$ M) (Figura 15 y Tabla 12).

En conjunto, estos resultados indican que la acetilcolina induce un decremento del intercambio entre el pericito y el entorno mediado por cierre de panexones pericitarios. En cambio el agente vasodilatador  $PGE_2$  no genera variaciones en la permeabilidad pericitaria en condiciones de reposo a la concentración aplicada, pero es capaz de revertir el incremento del intercambio mediado por panexones entre los pericitos y el entorno inducido por concentración vasocontrictoras de NE.



Figura 15–Los agentes vasodilatadores Acetilcolina (ACh) y Prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) inducen una disminución de la permeabilidad de la membrana pericitaria mediada por cierre de panexones, La administración del vasodilatador ACh disminuye la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos pericapilares a través de panexones en rodajas agudas de hipocampo. La gráfica muestra el coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> (Media  $\pm$  SEM) para pericitos de rodajas agudas de hipocampo controles y tratadas con ACh (10µM) derivadas de ratones salvajes (controles, puntos grises, 158 pericitos, 3 ratones, ACh, puntos celestes, 85 pericitos, 3 ratones) y KO Panx1<sup>-/-</sup> (controles, puntos grises, 111 pericitos, 3 ratones, ACh, puntos celestes, 172 pericitos, 3 ratones). \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 versus control, Kruskal Wallis-test seguido de post-test. La administración del vasodilatador PGE<sub>2</sub> (10µM) no tiene efecto sobre la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos pericapilares (control, puntos grises, 165 pericitos, 3 ratones; PGE<sub>2</sub> (10µM, puntos verdes, 188 pericitos, 3 ratones) revierte el incremento en la captación de Etd<sup>+</sup> observado para la NE (15µM) (puntos verdes y columna rosa, 145 pericitos, 3 ratones) revierte el incremento en la captación de Etd<sup>+</sup> observado para la NE (15µM) (puntos negros y columna rosa, 157 pericitos, 3 ratones). no-significativo versus control (Mann Whitney-test).\*\*\* p<0.001, comparación entre grupos indicados por la barra horizontal, Kruskal Wallis-test seguido de post-test Dunn. En todas las gráficas cada punto representa el valor de fluorescencia relativa de cada pericito, calculada com la fluorescencia de Etd<sup>+</sup> del control de cada experimento.

	Cti	ACh (10 µM)
Pericitos de ratones salvajes	1.00±0.04 (n=158 pericitos)	0.26±0.02 (n=85 pericitos)
Pericitos de ratones KO totales para la Panx1-/-	1.00±0.04 (n=111 pericitos)	0.89±0.04 (n=172 pericitos)

Tabla 11- Coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos (Media ± S.E.M.) en presencia del agente vasodilatador acetilcolina (ACh), n es la cantidad de pericitos; N/E no ensayados.

	Cti	PGE2(10 μM)	NE (15 µM)	NE (15 μM) + PGE2(10 μM)
Pericitos de ratones salvajes	1.00±0.04	1.05±0.04	1.84±0.06	1.01±0.04
	(n=165 pericitos)	(n=188 pericitos)	(n=157pericitos)	(n=149 pericitos)

Tabla 12- Coeficiente de captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos (Media  $\pm$  S.E.M.) en presencia del agente vasodilatador prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), n es la cantidad de pericitos; N/E no ensayados.

#### **Objetivo Específico 6**

### 4.10- La modulación del diámetro capilar cerebral por el neurotransmisor glutamato y por los agentes vasoactivos (ATP, norepinefrina y acetilcolina) requiere de la expresión funcional de panexones pericitarios

En virtud de los resultados presentados anteriormente evaluamos si el glutamato y los agentes vasoactivos ATP, NE y ACh producen variaciones del calibre capilar, y si los panexones funcionales pericitarios participan en esta modulación. Para responder estas preguntas se incubaron rodajas agudas de hipocampo provenientes de ratones salvajes y de ratones a los cuales se les silenció la expresión del gen de la Px1 mediante inducción con tamoxifeno (condicionales para la Px1 pericitaria, Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>) en ASCF conteniendo: glutamato (500 $\mu$ M), ATP (100 $\mu$ M), NE (15 $\mu$ M) o ACh (10 $\mu$ M). Las paredes capilares y los contornos pericitarios se evidenciaron con DIC y/o con lectinas (Tomato lectina o Isolectina B4) conjugadas a fluoróforos, mientras que el interior vascular se marcó con Evans Blue (ver métodos). El diámetro capilar se midió intravascularmente entre las membranas internas enfrentadas dibujando una línea perpendicular en la luz del vaso, a distintas distancias desde el centro del soma pericitario (Isasi et al., 2019; Lacar et al., 2012; Mishra et al., 2014) tal como se ejemplifica en la Figura 16A. La aplicación de glutamato (500 $\mu$ M) en el medio de

incubación de las rodajas salvajes generó un incremento significativo de 11% en el diámetro capilar a nivel del soma pericitario (0-5µm), siendo a este nivel el efecto vasodilatador máximo inducido por este neurotransmisor (Figura 16 y Tabla 13); mientras que, a distancias mayores del soma pericitario el efecto del glutamato sobre el diámetro capilar fue disminuyendo (Figura 16A y Cb). También, evaluamos el cambio en el calibre capilar entre la región adyacente al soma pericitario a 0µm y la región del capilar ubicada a 15µm de distancia del soma pericitario; este parámetro da una estimación de la variación del calibre en el mismo capilar (entre el soma y las 15µm). Tal como se observa en la gráfica de la Figura 16Cb y en la Tabla 15, la variación del diámetro capilar entre el centro (0 µm) y las 15µm es 43% mayor en presencia de glutamato 500µM que para la condición control en ratones salvajes. En cambio, cuando se trataron rodajas agudas de hipocampo de ratones condicionales para la Px1 pericitaria con glutamato 500µM no observamos variaciones del diámetro capilar a nivel del soma pericitario en comparación con la condición control, ni entre el soma pericitario y las 15 µm (Figura 16B, Cb y Tabla 14 y 15).



Figura 16- Los panexones pericitarios median las variaciones del diámetro capilar inducidas por el neurotransmisor glutamato. A - En rodajas agudas de hipocampo de ratones salvajes el glutamato incrementó el diámetro capilar. (a) Imágenes obtenidas con microscopía confocal de microvasos y pericitos en rodajas de hipocampo derivadas de ratones salvajes en condiciones control y tratadas con glutamato (Glu, 500 µM). La luz capilar se evidencia con Evans Blue (verde), los pericitos y las paredes vasculares con Tomato Lectina (rosados) y el soma pericitario (Etd<sup>+</sup>, rojo). Las líneas sólidas amarillas y rojas perpendiculares a la pared vascular representan las distancias en las cuales se realizan mediciones del calibre/diámetro interno capilar. (b) Gráfico de los diámetros capilares [Medias ± SEM (µm)] en función de la distancia (µm) desde el centro del soma pericitario en hipocampos controles (4 ratones) y tratados con glutamato 500µM (3 ratones). B- En ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>0/n</sup>/Cre<sup>+</sup>), el glutamato no afectó el diámetro capilar en rodajas agudas de hipocampo. (a) Imágenes obtenidas con microscopía confocal de microvasos y pericitos en rodajas de hipocampo derivadas de ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>) en condiciones control (4 ratones) y tratadas con glutamato (Glu, 500µM) (4 ratones) (b) Gráfico de los diámetros capilares [Medias ± SEM (µm)] en función de la distancia (µm) desde el centro del soma pericitario en hipocampos controles y tratados con glutamato 500 µM. C- (a) Comparación de los diámetros capilares [Medias ± SEM (µM)] en la zona más cercana al soma pericitario (0-5µM) de rodajas hipocampales derivadas de ratones salvajes y condicionales Panx1<sup>fl/fl</sup>/CRE<sup>+</sup> ante tratamiento con glutamato para los experimentos mostrados previamente en A y B.\*\* p<0.005, \*\*\* p<0.001, en comparación al control o entre las barras horizontales, one-way ANOVA con post-test. (b) Cambio (%) del diámetro capilar a las 15 µM del soma pericitario en comparación al diámetro en la zona más cercana al soma pericitario (0-5µM) [Medias ± SEM (µM)] en rodajas hipocampales derivadas de ratones controles y condicionales Panx1<sup>n/n</sup>/CRE<sup>+</sup> ante tratamiento con glutamato. Cada símbolo representa el [(valor del calibre a las 15 µM menos el valor del calibre capilar en el soma (0-5µM)/valor del calibre en el soma (0-5µM)x100]. \*\* p<0.05, \*\*\* p<0.001, en comparación al control o entre las barras horizontales, one-way ANOVA con post-test. Los valores de las medias de los calibres de los experimentos de A y B se representan en las tablas siguientes, los valores de los experimentos representados en C se representan en la primera columna de las tablas siguientes (remarcados en negritas).

	Diámetro capilar (en µm) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones salvajes en condición control y en presen- cia de glutamato								
	0-5 µm	> 5-10 μm	> 10-15 μm	> 15-20 μm					
En condiciones control	3.19±0.09	3.12±0.07	3.07±0.08	3.05±0.08					
(ACSF en bajo Mg <sup>++</sup> )	(n=54 capilares)	(n=81 capilares)	(n=71 capilares)	(n=56 capilares)					
En presencia de glutamato	3.65±0.11	3.35±0.07	3.31±0.1	3.27±0.08					
500 μM	(n=34 capilares)	(n=66 capilares)	(n=63 capilares)	(n=54 capilares)					

Tabla 13- Medida del diámetro capilar (Media  $\pm$  S.E.M) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones salvajes en condición control y en presencia de glutamato, n es la cantidad de capilares.

	Diámetro capilar (en µm) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones condicionales para la panexina1 pe- ricitaria (Panx1 <sup>@/fl</sup> /Cre <sup>+</sup> ) en condición control y en presencia de glutamato							
	0-5 μm	> 5-10 μm	> 10-15 μm	> 15-20 μm				
En condiciones control	3.11±0.07	3.04±0.06	3.07±0.08	3.13±0.08				
(ACSF en bajo Mg <sup>++</sup> )	(n=62 capilares)	(n=73 capilares)	(n=54 capilares)	(n=43 capilares)				
En presencia de glutamato	3.01±0.07	3.08±0.05	3.11±0.05	3.03±0.06				
500 μM	(n=73 capilares)	(n=80 capilares)	(n=61 capilares)	(n=58 capilares)				

Tabla 14- Medida del diámetro capilar (Media ± S.E.M) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>n/n</sup>/CRE<sup>+</sup>) en condición control y en presencia de glutamato, n es la cantidad de capilares.

	Variación del diámetro capilar (en %) entre 0 y 15µm de distancia del pericito en ratones salvajes v condicionales en condición control y en presencia de glutamato	
	Ratones Salvajes	Ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1 <sup>n@</sup> /Cre <sup>+</sup> )
En condiciones control	-12.03±8.18	-3.94±8.14
(ACSF en bajo Mg++)	(n=71 capilares)	(n=54 capilares)
En presencia de glutamato	-42.7±8.56	8.23±5.37
500 μM	(n=60 capilares)	(n=61 capilares)

Tabla 15-Variación del diámetro capilar (Media ± S.E.M) a 15µm del soma pericitario y en la región adyacente al centro del pericito (0-5µm) del mismo, en ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>n/n</sup>/CRE<sup>+</sup>) en condición control y en presencia de glutamato, n es la cantidad de capilares.</sup>

La incubación de rodajas agudas de hipocampo de ratones salvajes en presencia de los agentes vasoconstrictores ATP ( $100\mu$ M) o NE ( $15\mu$ M) generó para ambos agentes una disminución significativa en el diámetro capilar de 37% y 44% respectivamente en la zona más cercana al soma pericitario comparado con el control, siendo a este nivel el efecto vasoconstrictor máximo para disminuir a medida que nos alejamos del soma (Figura 17A y C y Tabla 16). En cambio, la ausencia de expresión de la Px1 en los pericitos previno la disminución del calibre capilar cerebral inducida por el ATP y la NE en rodajas de hipocampo derivadas de ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>) (Figura 17B y C y Tablas 16-17). Además, la variación del calibre capilar entre la región adyacente al soma pericitario y la región capilar ubicada a 15µm de distancia del

soma pericitario fue significativamente menor 33% y 26% en presencia del ATP y la NE respectivamente que para la situación control y estos efectos no se observan en ratones condicionales Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup> (Figura 17, C, b y Tabla 18).

El tratamiento de las rodajas de hipocampo salvajes con el agente vasodilatador acetilcolina (ACh  $10\mu$ M) generó un incremento del 22% del diámetro capilar a nivel del soma pericitario versus el diámetro control, el cual tiende a decrecer a medida que alejamos del soma pericitario (Figura 17 y Tabla 16). En cambio, el incremento del diámetro capilar generado por la ACh no se observa cuando este agente se incuba en rodajas agudas de hipocampo de ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Figura 17 y Tabla 17). Además, el cambio del calibre capilar entre la región adyacente al soma pericitario y la región capilar ubicada a 15 $\mu$ m de distancia del soma pericitario fue 65% mayor en presencia de la ACh que para la situación control y este efecto no se observó en ratones condicionales Panx1<sup>n/n</sup>/Cre<sup>+</sup> (Figura 17, C, b y Tabla 18).

A modo de control, evaluamos el efecto del ATP ( $100\mu$ M) sobre el diámetro capilar en rodajas agudas de hipocampo derivadas de ratones controles para los condicionales tratados con tamoxifeno (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>-</sup>) como se ilustra en la Figura 18 y en la Tabla 18. Los resultados obtenidos fueron similares a los datos obtenidos en rodajas agudas hipocampales derivadas de ratones salvajes como era esperable (Figura 18 y Tabla 19).



Figura 17- Los panexones pericitarios median las variaciones del diámetro capilar inducidas por los agentes vasoactivos ACh, NE y ATP. A-En ratones salvajes, los agentes vasoactivos regulan el diámetro capilar en rodajas agudas de hipocampo. (a) Imágenes obtenidas con microscopía confocal de microvasos y pericitos en rodajas de hipocampo derivadas de ratones salvajes en condiciones control y tratadas con Acetilcolina (ACh), ATP y Norepinefrina (NA). La luz capilar se evidencia con Evans Blue (verde), los pericitos y las paredes vasculares con Tomato Lectina (rosados) y el soma pericitario (Etd<sup>+</sup>, rojo). Las líneas sólidas amarillas y rojas intravasculares representan zonas de capilares en las cuales se realizan mediciones del calibre/diámetro interno capilar. (b) Gráfico de los diámetros capilares [Medias ± SEM (µm)] en función de la distancia (µm) desde el centro del soma pericitario en hipocampos controles (4 ratones) y tratados con ATP 100µM (3 ratones), NE 15µM (3 ratones), Ach 10µM (3 ratones). B-En ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>nn</sup>/Cre<sup>+</sup>), los agentes vasoactivos no modificaron el diámetro capilar en rodajas agudas de hipocampo. (a) Imágenes obtenidas con microscopía confocal de microvasos y pericitos en rodajas de hipocampo derivadas de ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>fi/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>) en condiciones control (4 ratones) y tratadas con Acetilcolina (ACh 10 $\mu$ M) (4 ratones), ATP 100 $\mu$ M (4 ratones) y Norepinefrina (NE) 15µM (4 ratones). (b) Gráfico de los diámetros capilares [Medias ± SEM (µm)] en función de la distancia (µm) desde el centro del soma pericitario en hipocampos controles y tratados con los agentes vasoactivos antes mencionados. C-(a) Comparación de los diámetros capilares [Medias  $\pm$  SEM ( $\mu$ M)] en la zona más cercana al soma pericitario (0-5 $\mu$ m) de rodajas hipocampales derivadas de ratones salvajes y condicionales Panx1<sup>a/n</sup>/CRE<sup>+</sup> ante tratamiento con los agentes vasoactivos mencionados, cada símbolo representa el valor del calibre para un único capilar. ns, no significativo, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, en comparación al control o entre las barras horizontales, Mann-Whitney test. (b) Comparación del cambio del diámetro capilar a las 15 µM del soma pericitario versus al cambio de diámetro a la zona más cercana al soma pericitario (0-5 µm) [Medias ± SEM (µm)] de rodajas hipocampales derivadas de ratones controles y condicionales Panx1fl/fl/CRE<sup>+</sup> ante tratamiento con los agentes vasoactivos ATP, NE y ACh. Cada símbolo representa la diferencia del ((valor del calibre a las 15 µM -valor del calibre capilar en el soma (0-5µM))/valor del calibre capilar en el soma (0-5µM)) x100. ns no significativo, \* p<0.05, en comparación al control, one-way ANOVA with post-test en ratones controles en (b); no significativo en comparación al control, Kruskal-Wallis test seguido de post-test en (b); \*\* p<0.01 entre las barras horizontales en (b), Mann-Whitney test para el ATP, t-test no pareado de dos colas para NA y ACh. Los valores de las medias de los calibres de los experimentos de A y B se representan en las tablas siguientes, los valores de los experimentos representados en C se representan en la primera columna de las tablas siguientes (remarcados en negritas).

	Diámetro capilar (µm) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones salvajes en condición control y en pre- sencia de agentes vasoactivos ATP, NE y ACh			
	0-5 µm	> 5-10 μm	> 10-15 μm	> 15-20 μm
En condiciones control	3.54±0.09	3.37±0.1	3.32±0.12	3.31±0.14
(ACSF)	(n=38 capilares)	(n=45 capilares)	(n=22 capilares)	(n=11 capilares)
En presencia de ACh 10 μM	4.31±0.16	3.9±0.19	3.66±0.14	3.52±0.13
	(n=17 capilares)	(n=21 capilares)	(n=28 capilares)	(n=19 capilares)
En presencia de NE 15 μM	2.00±0.14	2.29±0.13	2.38±0.11	2.78±0.12
	(n=32 capilares)	(n=35 capilares)	(n=15 capilares)	(n=20 capilares)
En presencia de ATP 100 μM	2.22±0.09 (n=39 capilares)	2.46±0.1 (n=53 capilares)	$\begin{array}{c} 2.55 \pm 0.12\\ (n=26 \text{ capilares})\end{array}$	$\begin{array}{c} 2.81 \pm 0.1 \\ (n=23 \text{ capilares}) \end{array}$

Tabla 16- Medida del diámetro capilar (Media  $\pm$  S.E.M) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones salvajes en condición control y en presencia de agentes vasoactivos, n es la cantidad de capilares.

	Diámetro capilar (µm) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1 <sup>fi/l</sup> /Cre <sup>+</sup> ) en condición control y en presencia de agentes vasoactivos ATP, NE y ACh			
	0-5 µm	> 5-10 μm	> 10-15 µm	> 15-20 μm
En condiciones control	3.29±0.09	3.16±0.08	3.11±0.07	3.02±0.1
(ACSF)	(n=56 capilares)	(n=77 capilares)	(n=68 capilares)	(n=50 capilares)
En presencia de ACh 10 μM	3.28±0.1	3.11±0.09	3.13±0.13	3.25±0.13
	(n=43 capilares)	(n=58 capilares)	(n=49 capilares)	(n=38 capilares)
En presencia de NE 15 μM	2.97±0.08	2.92±0.09	2.9±0.1	2.97±0.09
	(n=57 capilares)	(n=70 capilares)	(n=58 capilares)	(n=53 capilares)
En presencia de ATP 100 μM	3.04±0.08	2.91±0.08	2.98±0.08	2.95±0.1
	(n=57 capilares)	(n=76 capilares)	(n=59 capilares)	(n=47 capilares)

Tabla 17- Medida del diámetro capilar (Media ± S.E.M) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones condicionales para la Px1 pericitaria en condición control y en presencia de agentes vasoactivos, n es la cantidad de capilares.

	Variación del diámetro capilar (en %) entre 0 y 15µm de distancia del pericito en ratones salvajes y condicionales para la Px1 en condición control y en presencia de agentes vasoactivos ATP, NE y ACh		
	Ratones Salvajes	Ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1 <sup>nn</sup> /Cre⁺)	
En condiciones control (ACSF)	-15.86±11.62 (n=21 capilares)	-21.4±6.05 (n=57 capilares)	
En presencia de ACh 10 μM	-65.43±14.48 (n=28 capilares)	-15.02±13.27 (n=49 capilares)	
En presencia de NE 15 µM	26.13±9.78 (n=15 capilares)	-13.7±8.09 (n=57 capilares)	
En presencia de ATP 100 µM	32.77±11.54 (n=26 capilares)	-6.2±8.38 (n=59 capilares)	

Tabla 18- Variación del diámetro capilar (Media  $\pm$  S.E.M) a 15µm del soma pericitario y en la región adyacente al centro del pericito (0-5µm) del mismo, en ratones condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1<sup>ft/n</sup>/CRE<sup>+</sup>) en condición control y en presencia de ACh, NE y ATP, n es la cantidad de capilares.



Figura 18- El ATP modula el calibre capilar en rodajas agudas hipocampales derivadas de ratones controles de los condicionales ( $Panx1^{B/d}/Cre$ ) tratados con tamoxifeno. Gráfico izquierdo: Gráfico de los diámetros capilares [Medias ± SEM (µm)] en función de la distancia (µm) desde el centro del soma pericitario en hipocampos controles (3 ratones) y tratados con ATP 100µM (3 ratones). Gráfico derecho: Comparación de los diámetros capilares [Medias ± SEM (µM)] en la zona más cercana al soma pericitario (0-5µM) de rodajas hipocampales derivadas de ratones controles para los condicionales Panx1fl/fl/CRE<sup>-</sup> en condición control y ante tratamiento con ATP 100µM. Cada símbolo representa el valor del calibre para un único capilar. \*\*\* p<0.001, entre la barra horizontal, t-test no pareado de dos colas. Los valores de las medias de los diámetros de estos experimentos se representan en la tabla siguiente. Los valores del gráfico de la derecha se ubican en la primera columna de la tabla remarcados en negritas.

	Diámetro capilar (en µm) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones controles de los condicionales para la Px1 pericitaria (Panx1 <sup>nn</sup> /Cre <sup>°</sup> ) en condición control y en presencia del agente vasoactivo ATP			
	0-5 µm	> 5-10 μm	> 10-15 µm	> 15-20 μm
En condiciones control	3.21±0.11	3.12±0.1	3.03±0.11	2.98±0.13
(ACSF)	(n=34 capilares)	(n=28 capilares)	(n=19 capilares)	(n=18 capilares)
En presencia de ATP 100 μM	2.17±0.09	2.28±0.1	2.39±0.12	2.4±0.16
	(n=34 capilares)	(n=30 capilares)	(n=22 capilares)	(n=17 capilares)

Tabla 19- Medida del diámetro capilar (Media ± S.E.M) a distintas distancias desde el centro del pericito en ratones controles de los condicionales para la Px1 pericitaria, en condición control y en presencia de ATP, n es la cantidad de capilares.

En conjunto, los resultados presentados sugieren que en condiciones de activación neural y/o en presencia de agentes vasodilatadores, los panexones pericitarios disminuyen el intercambio con el entorno lo cual se asocia a vasodilatación capilar. Por su parte, en presencia de agentes vasoconstrictores, los panexones pericitarios aumentan el intercambio con el entorno, lo que se acompaña de vasoconstricción a nivel microvascular. En todas las condiciones descritas, la expresión de la Px1 en los pericitos, es un requisito para que se induzca el efecto sobre el diámetro capilar (Esquema 2).



**Esquema 2-** En función de los resultados obtenidos proponemos que en condiciones de activación neural y en presencia de agentes vasodilatadores, los panexones pericitarios se inactivan, disminuyendo el intercambio con el entorno que se acompaña de vasodilatación capilar. En presencia de agentes vasoconstrictores, los panexones pericitarios se activan y aumentan del intercambio de Etd<sup>+</sup>, provocando en la microvasculatura vasoconstricción. En verde se representa un pericito, en rojo se representa un capilar.

#### **Objetivo Específico 7**

#### 4.11-Ensayo de reconocimiento de objeto novedoso (Test NOR)

Durante el aprendizaje y la memoria se activan receptores neuronales de tipo NMDA y AMPA que subyacen a los procesos de plasticidad sináptica en el hipocampo (Simandle et al., 2005; Wendling et al., 1996), esta activación debería acompañarse de hiperemia en las zonas activas y por lo tanto de una dilatación del calibre capilar y de un aumento del intercambio a través de la BHE. Con el objetivo de determinar las implicancias funcionales de los panexones pericitarios durante el desempeño cognitivo de los ratones en condición de comportamiento libre (*in vivo*), realizamos el test de reconocimiento de objeto novedoso o NOR-test que evalúa procesos de aprendizaje y memoria en el animal despierto. Las fases del protocolo experimental se esquematizan en la Figura 19A. Este ensayo se realizó en un grupo de ratones control (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>). Los ratones controles y

condicionales tenían la misma edad, ya que eran hermanos de la misma camada y fueron manipulados en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos mostraron que los ratones controles (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>-</sup>) fueron capaces de discriminar el cambio del objeto familiar por el objeto nuevo, debido a que pasaron significativamente más tiempo explorando el objeto novedoso que el familiar. En cambio, los ratones condicionales (Panx1<sup>fl/fl</sup>/Cre<sup>+</sup>) que no expresaban los panexones pericitarios fueron incapaces de discriminar el cambio del objeto familiar por el novedoso (Figura 19 y Tabla 20).



Figura 19- La expresión de la Px1 en los pericitos es necesaria para el reconocimiento de objeto novedoso (NOR-Test). (A) Esquema delprotocolo experimental, inicialmente los ratones exploran la arena sin objetos durante 10 minutos (Habituation), pasado este tiempo se los retira de la arena y se los coloca en una caja individual en un ambiente tranquilo por 20 minutos. Luego se los introduce en la arena a la cual se le colocaron dos objetos idénticos (cubos rojos) uno en cada extremo de la arena y se los coloca en una caja individual en un ambiente tranquilo por 20 minutos. Luego se los introduce en la arena a la cual se le colocaron dos objetos idénticos (cubos rojos) uno en cada extremo de la arena y se los coloca en una caja individual en un ambiente tranquilo por 60 minutos, para reintroducirlos en la arena a la cual se le dejó un objeto familiar (cubo rojo) y se le cambió un objeto familiar por uno novedoso (cículo verde); cada objeto se colocó en un extremo opuesto de la arena. Durante 10 minutos el ratón explora estos objetos mientras se lo registra con una cámara de video (Re-exposure). (B) La gráfica representa el Indice de discriminación del objeto nuevo versus el familiar para ratones control (7 ratones Panx1<sup>n//</sup>Cre<sup>+</sup>) ns, no-significativo; \*\*\* p<0.001 versus el índice de discriminación del objeto novedosos del grupo control vs del grupo Panx1<sup>n//</sup>Cre<sup>+</sup> one-way ANOVA test.

	Índice de Discriminación		
	Familiar	Novedoso	
Ratones controles de los condicionales para la Px1	-3.9±3.93	33.05±3.15	
pericitaria (Panx1 <sup>n/n</sup> /Cre <sup>-</sup> )	(N=7)	(N=6)	
Ratones condicionales para la Px1	1.39±1.65	5.7±6.48	
pericitaria (Panx1 <sup>n/n</sup> /Cre <sup>+</sup> )	(N=8)	(N=8)	

Tabla 20- Índice de discriminación (Media ± S.E.M) de un objeto familiar o novedoso para ratones controles de los condicionales para la Px1 pericitaria y ratones condicionales para la Px1 pericitaria, N es el número de ratones ensayados.

Estos resultados sugieren que la funcionalidad de los panexones pericitarios constituye un requerimiento para los procesos de aprendizaje, memoria y reconocimiento de objetos en el animal in vivo.

#### 5. DISCUSIÓN

En esta tesis demostramos que el fluoróforo TO-PRO-3 que emite en el espectro del rojo lejano (642/661) actúa como un marcador específico de los pericitos del SN cuando se aplicó en tejido vivo. La especificidad del TO-PRO-3 se confirmó frente a los marcadores clásicos de la membrana pericitaria NG2 y PDGFr $\beta$ , y mediante la sonda NeuroTrace 500/525. El influjo de TO-PRO-3 a los pericitos fue independiente de canales de Cx y/o Px, pero fue altamente sensible a la temperatura sugiriendo que el ingreso de esta sonda es mediado por transporte activo y mostró saturación. Además, determinamos que un subgrupo de pericitos marcados con TO-PRO-3 expresaron la proteína  $\alpha$ -SMA, indicativo de su capacidad contráctil.

Por otra parte, determinamos que los pericitos pericapilares del hipocampo de ratón expresan canales de gran poro formados por Px1, denominados panexones. En condiciones basales, los panexones pericitarios se encuentran funcionales mediando una vía de intercambio entre los pericitos y el medio extracelular cerebral tanto en condiciones de vida libre (in vivo) como en las rodajas agudas de hipocampo (ex vivo). La liberación basal del ATP por los panexones pericitarios al microentorno activa receptores pericitarios purinérgicos ionotrópico P2X7 y metabotrópico P2Y6, quiénes serían los encargados del mantenimiento del intercambio funcional mediado por panexones entre el pericito y su entorno en condiciones de reposo. El neurotransmisor glutamato y el agente vasodilatador ACh, indujeron una disminución del intercambio de los pericitos dependiente de panexones que se asoció a un aumento del calibre capilar (vaso-relajación). El cierre de panexones pericitarios por el glutamato fue concentración dependiente y estuvo mediado por receptores de tipo AMPA y NMDA; el efecto no se ejerció directamente sobre los pericitos. Niveles elevados de los agentes vasoconstrictores ATP y NE, determinaron un aumento del intercambio de los pericitos con el medio externo por apertura de panexones que se acompañó de una disminución del calibre capilar (vaso-constricción). La apertura de panexones pericitarios por el ATP y la NE fue concentración-dependiente; mientras que la NE mostró un efecto de saturación, el ATP presentó un máximo para después disminuir. Finalmente, determinamos que los panexones pericitarios son fundamentales para el reconocimiento de objetos novedosos en el animal vivo. En resumen, los pericitos pericapilares cerebrales expresan panexones funcionales en condiciones basales por acción del ATP vía receptores purinérgicos P2X7 y P2Y<sub>6</sub>. Neurotransmisores, gliotransmisores y agentes vasoactivos modulan la actividad de los
panexones pericitarios. La regulación del diámetro capilar por el neurotransmisor glutamato y los agentes vasoactivos así como una adecuada performance cognitiva (memoria y aprendizaje) requieren de la expresión de panexones funcionales en los pericitos hipocampales.

### 5.1- Los pericitos se identifican con el marcador nuclear fluorescente TO-PRO-3 Iodide (642/661)

Para investigar la funcionalidad de los canales de gran poro expresados en los pericitos pericapilares en condiciones fisiológicas y patológicas, la identificación de los pericitos de forma rigurosa y simple es fundamental. A la fecha, el reconocimiento de estas células murales y su definición no han sido zanjados, y continúan siendo objeto de estudio y controversia (Attwell et al., 2016; Damisah et al., 2017; Grutzendler & Nedergaard, 2019; Hartmann et al., 2015; 2021). La identificación de los pericitos con el fluoróforo TO-PRO-3 Iodide (642/661) y su relación con los componentes de la UNV en rodajas agudas de hipocampo fue el primer objetivo de esta tesis, dando origen a la publicación de un artículo y de un protocolo experimental (Mai-Morente et al., 2020; Mai-Morente et al., 2021). Existen múltiples estrategias para caracterizar e identificar a los pericitos como se describió en la introducción, entre ellas el empleo de (1) inmunomarcadores (anticuerpos) de los antígenos de superficie típicamente NG2 (condroitín sulfato proteoglicano neuro-glial 2) y PDGFrß (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas de tipo beta), (2) de animales reporteros que expresan proteínas fluorescentes asociadas a los promotores de los genes pericitarios NG2 o PDGFrß y (3) la incorporación del colorante fluorescente NeuroTrace (500/525) por los pericitos vivos, propiedad esta última que es compartida con el TO-PRO-3. Varias de estas estrategias (ratones reporteros, NeuroTrace 500/525), son clásicamente utilizadas para el reconocimiento de los pericitos en el animal vivo por microscopía multifotónica (Damisah et al., 2017; Hartmann et al., 2015; Lacar et al., 2012; Lindahl et al., 1997; Ozerdem & Stallcup, 2003; Smyth et al., 2018). En esta tesis desarrollamos una metodología confiable, sencilla y robusta para marcar los pericitos en rodajas agudas de hipocampo de ratón mediante la incorporación del fluoróforo TO-PRO-3 (642/661) el cual emite en el espectro del rojo lejano (Mai-Morente et al., 2021; Mai-Morente et al., 2020), lo cual nos permitió combinar este marcador con otros fluoróforos sin superposición de los

espectros de emisión y excitación. En una publicación previa, el TO-PRO-3 (642/661) fue empleado como marcador pericitario, pero en dicho reporte no se realizó una caracterización exhaustiva de la población celular identificada con esta sonda ni de los mecanismos de ingreso del fluoróforo a los pericitos (Lacar et al., 2012). La especificidad de la marcación de pericitos con TO-PRO-3 se validó mediante inmunofluorescencia contra los marcadores pericitarios clásicos, los antígenos de membrana NG2 y PDGFr-β (Hartmann et al., 2015; Lindahl et al., 1997; Ozerdem & Stallcup, 2003; Smyth et al., 2018) y con la sonda fluorescente NeuroTrace 500/525 que se incorpora en los pericitos en el animal in vivo (Damisah et al., 2017) y que nosotros adaptamos para trabajar en rodajas agudas de SN y en retinas aisladas. Nuestros resultados mostraron que la mayoría (>95%) de los pericitos positivos para TO-PRO-3 (TO-PRO-3<sup>+</sup>) presentó co-marcaje con NG2/PDGFrβ, y con NeuroTrace 500/525. La densidad de células TO-PRO-3<sup>+</sup> en rodajas de hipocampo fue similar a la reportada para los pericitos corticales vivos identificados con el trazador NeuroTrace 500/525 (Damisah et al., 2017). Los contornos celulares de los pericitos TO-PRO-3<sup>+</sup> también se marcaron con las lectinas fluorescentes (Isolectina B<sub>4</sub> o Tomato-Lectina) que se fijan a los residuos glicosilados de la membrana basal de los pericitos y del endotelio. Por otra parte, evaluamos la relación anatómica de las células TO-PRO-3<sup>+</sup> con los otros componentes de la UNV; las células TO-PRO3<sup>+</sup> se asociaron con vasos de pequeño tamaño (< a 5 micras de calibre) desprovistos de capas continuas de músculo liso características que los hacen compatibles con capilares (Mai-Morente et al., 2021; Mai-Morente et al., 2020). Morfológicamente, las células TO-PRO-3<sup>+</sup> son células fusiformes que emiten prolongaciones longitudinales y circulares que se adosan a la superficie abluminal de los microvasos sanguíneos y que presentan una íntima asociación con los pies astrocitarios y el endotelio. En este trabajo determinamos que un subgrupo de células TO-PRO-3<sup>+</sup> expresó la proteína contráctil α-SMA, indicativo de la función de los pericitos de contraerse y regular el diámetro capilar. Como fuera reportado por otros equipos de investigación, la detección por inmunofluorescencia de la proteína α-SMA aumentó cuando se pretrataron los pericitos mediante un estabilizador de la polimerización de la misma (Alarcon-Martinez et al., 2018, 2019; Kureli et al., 2020; Erdener et al., 2022). La captación de TO-PRO-3 por los pericitos no fue mediada por canales de conexina o panexina (ya que no se afectó en presencia de los inhibidores de panexones/conexones), pero fue altamente sensible a la temperatura y mostró saturación cuando se emplearon distintas concentraciones de colorante; estos resultados sugieren que la incorporación de esta sonda es mediada por un mecanismo de transporte que no caracterizamos. El hecho de que la incorporación de TO-PRO-3 por los pericitos no fuera

mediada por canales de gran poro de Cx o Px es fundamental, ya que la funcionalidad de los panexones y conexones fue objeto de estudio de esta tesis. En este sentido, este trazador resultó apto para identificar pericitos pericapilares en rodajas agudas de hipocampo de ratones KO totales para la Px1 y de condicionales para la Px1 pericitaria. Entre las principales ventajas del TO-PRO-3 como marcador pericitario destacamos las siguientes: (1) la marca pericitaria es selectiva y estable, (2) al tratarse de una sonda que emite en rojo lejano, el TO-PRO-3 Iodide (exc.642/em.661) presenta mínima auto-fluorescencia y baja foto-toxicidad en comparación con los fluoróforos que se excitan y emiten en otras longitudes de onda tales como ultravioleta (Suseela et al., 2018), (3) no presenta interferencia con otros canales de fluorescencia (Bink et al., 2001), lo que permite combinar esta sonda con otros colorantes y/o fluoróforos que emiten en otras longitudes de onda, (4) presenta poca o nula difusión desde los pericitos en tejido fijado a diferencia de lo reportado para el NeuroTrace (500/525) (Damisah et al., 2017), y (5) es una técnica sencilla y de costo accesible. Entre los marcadores que pueden ser combinados junto con el TO-PRO-3 y que fueron utilizados en esta tesis cabe mencionar: el bromuro de etidio (Etd<sup>+</sup>) (528/598) (que utilizamos para experimentos de captación), trazadores fluorescentes (Neurotrace, Lectinas, Dextranos asociados a fluoróforos, DAPI u Hoechst) y/o anticuerpos secundarios conjugados a FICT, Alexa 488 o Cy3. Este método de identificación pericitaria, resulta económico en comparación con el mantenimiento de animales reporteros que expresan proteínas fluorescentes asociadas a los promotores de los genes pericitarios NG2 o PDGFrβ. Además, el procedimiento de incubación de las rodajas con TO-PRO-3 es más simple y requiere menor tiempo de ejecución que la técnica de inmuno-marcaje con los marcadores pericitarios clásicos.

En resumen, la identificación de los pericitos pericapilares con TO-PRO-3 resulta un método riguroso, sencillo y económico que permite evidenciar los pericitos tanto en rodajas agudas del SN de animales salvajes como transgénicos (ratones knockout globales para la panexina1 o Panx1-/- y condicionales para la Panx1 pericitaria). En esta tesis el TO-PRO-3 se utilizó de forma corriente para identificar los pericitos de hipocampo en asociación con múltiples abordajes experimentales. Una discusión detallada de los principales resultados puede encontrarse en la publicación original anexada al final de esta tesis (Mai-Morente y col., 2020).

# 5.2- En condiciones basales, los pericitos expresan panexones funcionales que median una vía de intercambio con el microentorno, siendo el mediador ATP y la activación de los receptores $P2x_7$ y $P2Y_6$ fundamentales para esta transferencia

Mediante la técnica de captación de Etd<sup>+</sup> en presencia de inhibidores de panexones (Abudara et al., 2015; Contreras et al., 2002; Giaume et al., 2012; Orellana et al., 2011 a; Sáez et al., 2010), determinamos que los pericitos pericapilares expresan, en condiciones de reposo, panexones funcionales en el animal despierto (in vivo), en rodajas agudas de hipocampo (ex vivo) y en cultivos pericitarios (in vitro). Los resultados farmacológicos se validaron en rodajas agudas de hipocampo de ratones transgénicos para la Px1 (knock-out globales para la Px1 y condicionales para la Px1 pericitaria), en los cuales no encontramos cambios en la captación de colorante ante inhibidores de panexones tal como era esperable (Figura 8 y 10). El empleo de ratones KO (globales y condicionales) nos permitió confirmar la naturaleza molecular de la vía formada por panexones funcionales la cual se encuentra activa en los pericitos salvajes, mientras que, el empleo de ratones condicionales nos permitió determinar que son los panexones funcionales expresados en los pericitos y no en otros tipos celulares los implicados en el intercambio de moléculas relativamente grandes entre los pericitos y el microentorno. En línea con estos resultados, mediante inmuno-fluorescencia comprobamos la presencia de la Px1 en la membrana y en el citoplasma de los pericitos del hipocampo en animales salvajes y en los controles de los condicionales (Figura 9), estos hallazgos fueron concordantes con análisis transcripcionales que reportaron la expresión de ARN mensajero para la Px1 en los pericitos (He et al., 2016; Vanlandewijck et al., 2018). En otros modelos experimentales se ha demostrado que los panexones se encuentran funcionales e intercambian trazadores a potenciales de membrana de reposo (Nielsen et al., 2020; Taruno, 2018) no registrándose corrientes iónicas asociadas a este potencial (Nielsen et al., 2020). En condiciones fisiológicas, se ha descrito la expresión de panexones funcionales en eritrocitos y células endoteliales (Bao et al., 2004; Burnstock, 2008; Locovei et al., 2006a), en cultivos de astrocitos (Iglesias et al., 2009), en el epitelio respiratorio (Ransford et al., 2009), y a nivel neuronal (Silverman et al., 2009), entre otros tipos celulares. Debido a que, los conexones también constituyen canales de membrana de gran poro que median vías de intercambio entre el interior y el exterior celular (Giaume et al., 2012; Orellana et al., 2011 a; Sáez et al., 2003 a, b), estudiamos la expresión funcional de los conexones de Cx43 pericitarios en condiciones de reposo. Para esto se incubaron rodajas agudas de hipocampo en presencia de Etd<sup>+</sup> y de bloqueantes específicos de los canales de Cx43. Los resultados obtenidos no mostraron variaciones en la captación pericitaria de colorante tanto en rodajas agudas de hipocampo provenientes de ratones salvajes como transgénicos para la Px1 (KO totales Panx 1-/o condicionales para la Px1 pericitaria) (Figura 8). Sin embargo, detectamos la presencia de Cx43 en la membrana pericitaria en rodajas agudas de hipocampo por inmuno-fluorescencia (Figura Anexa Capítulo 8). Estos resultados sugieren que, si la Cx43 detectada en la membrana pericitaria está formando conexones, los mismos no se encontrarían funcionales como canales únicos no ensamblados en la membrana pericitaria y entonces no contribuyen al intercambio entre los pericitos y el medio externo observado en condiciones de reposo. Estos canales de Cx43 tampoco participarían en la base del mecanismo de captación residual de Etd<sup>+</sup> observado en los pericitos salvajes en presencia de bloqueantes generales y específicos de la Px1, transgénicos KO totales para la Px1 y condicionales para la Px1. La expresión de Cx43 podría asociarse a la formación de uniones comunicantes entre los pericitos y las células de la UNV; por ejemplo la presencia de uniones gap de Cx43 funcionales ha sido reportada entre los pericitos y el endotelio u otros componentes de la UNV (Alarcón-Martinez et al., 2020; Cuevas et al., 1984; Díaz-Flores et al., 2009; Emerson & Segal, 2000; Ivanova et al., 2017, 2019; Kovacs-Oller et al., 2020 a,b; Larson et al., 1990; Puro, 2012; Segal & Jacobs, 2001; Zhang et al., 2006).

En suma, los resultados aquí presentados permiten concluir que los pericitos expresan panexones activos, que funcionan como una vía de señalización parácrina/autócrina funcional en condiciones de reposo tanto en el animal despierto (*in vivo*) como en rodajas agudas de hipocampo (*ex vivo*) y en cultivos celulares primarios (*in vitro*).

Considerando que los panexones constituyen vías regulables para la liberación de ATP, analizamos si este nucleótido actúa como mediador soluble para mantener la funcionalidad de los panexones pericitarios en condiciones basales. Utilizando ensayos de captación de colorante en rodajas agudas de hipocampo en los que se eliminó el ATP del medio extracelular, mediante la incubación con apirasa, observamos una disminución significativa de la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos, efecto que no se presentó en los hipocampos de ratones de KO globales para Px1. Estos resultados permiten concluir que el ATP extracelular existente en el microentorno pericitario mantiene los panexones pericitarios funcionales en condiciones basales. Se obtuvieron resultados similares en cultivos primarios de pericitos cerebrales a los que se los incubó con apirasa, sugiriendo que el ATP liberado

por los propios pericitos al medio externo es capaz de modular el intercambio pericitario con el entorno mediante panexones (Figura 12). Estos resultados van en consonancia con lo reportado para otros tipos de células, donde se ha descrito que a través de panexones activos se libera ATP, el cual, una vez extracelular activa receptores purinérgicos en la propia célula o en las vecinas generando aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, activación de panexones y liberación de más ATP (Giaume et al., 2012; Orellana et al., 2011 a; Sáez et al., 2003 a,b; Billaud et al., 2011; Cea et al., 2013; Garré et al., 2010; Pelegrin & Surprenant, 2006; Schock et al., 2008; Suadicani et al., 2012; Thompson et al., 2006; Thompson & MacVicar, 2008). Este tipo de mecanismo autócrino y parácrino de retroalimentación positiva mediada por el ATP y la activación del sistema panexón/receptores purinérgicos se ha descrito en múltiples procesos fisiológicos y patológicos (Anselmi et al., 2008; Bao et al., 2004; Billaud et al., 2014; Gaete et al., 2014; Garré et al., 2020; Locovei et al., 2006 b; Penuela et al., 2013). Mediante ensayos de captación de Etd<sup>+</sup> en rodajas agudas de hipocampo en presencia de antagonistas genéricos de los receptores purinérgicos P2X y P2Y y específicos para el receptor ionotrópico P2X<sub>7</sub>R y el metabotrópico P2Y<sub>6</sub>R, determinamos que la activación de ambos tipos de receptores purinérgicos P2X7 y P2Y6 está mediando el intercambio de los panexones pericitarios con el entorno en condiciones basales (Figura 12). En este sentido, se ha reportado que los canales de Px1 y los receptores ionotrópicos purinérgicos P2X permeables a Ca2+ extracelular colocalizan en la membrana de ovocitos de Xenopus (Locovei et al., 2007), y en células uroteliales (Negoro et al., 2014); formando un micro-dominio de señalización que permite la propagación de señales de Ca2+. En los últimos años se han acumulado evidencias que indican que la apertura de canales de Px1 es activada por el P2X<sub>7</sub>R siendo el poro formado por los panexones el que media el influjo de colorante (Cisneros-Mejorado et al., 2015; Garré et al., 2020; Iglesias et al., 2008; Locovei et al., 2007; Miteva et al., 2018; Pelegrin & Surprenant, 2006). Además del P2X7R, recientemente se han descrito otros tipos y subtipos de receptores purinérgicos que también son capaces de activar canales de Px1, tales como el P2X<sub>4</sub> (Hung et al., 2013) y los P2Y<sub>1/2/6</sub> (Carneiro et al., 2014; Locovei et al., 2006 b; Timóteo et al., 2014). Nuevos estudios demuestran la expresión de receptores purinérgicos funcionales en los pericitos (Cai et al., 2018; Ivanova et al., 2019; Kovács-Öller et al., 2020 a,b; Lacar et al., 2012); entre ellos se han caracterizado los receptores ionotrópicos P2X<sub>7</sub> (Kawamura et al., 2003; Platania et al., 2017) y los metabotrópicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> (Hørlyck et al., 2021; Lacar et al., 2012). Mediante análisis transcriptómicos se determinó la expresión de los receptores purinérgicos ionotrópicos P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>4</sub> en pericitos (He et al., 2018). En acuerdo con esto en nuestro modelo de rodajas agudas hipocampales mediante inmunofluorescencia confirmamos la presencia del P2X<sub>7</sub>R en la membrana pericitaria (Figura Anexa Capítulo 8). Para el caso del P2Y<sub>6</sub>R no existen a la fecha reportes que indiquen su expresión en pericitos, pero la liberación de ATP por panexones y la activación de receptores metabotrópicos P2Y<sub>6</sub> potenciando la señal han sido descritos en músculo liso urotelial (Carneiro et al., 2014; Timóteo et al., 2014) y células musculares en arterias (Kauffenstein et al.,2016) donde modulan su tono contráctil. El incremento fisiológico del nivel Ca<sup>2+</sup> intracelular induce fosforilación vía CaMKII en la cola C-terminal de la Px1, que se refleja en un aumento del influjo de colorante y del eflujo de ATP (Lopez et al., 2021).

En resumen, los resultados presentados en esta tesis serían a la fecha los primeros en describir que en condiciones de reposo el sistema de retroalimentación positivo panexón/receptores purinérgicos P2X<sub>7</sub> y P2Y<sub>6</sub> se encuentra activo en los pericitos del sistema nervioso, siendo el ATP el mediador que al liberarse extracelularmente por los panexones pericitarios mantiene funcional este mecanismo de retroalimentación positivo.

## 5.3- La activación de receptores glutamatérgicos y los agentes vasodilatadores disminuyen el intercambio de los pericitos con el microentorno por el cierre de canales de Px1, efecto que se asocia a dilatación capilar

Estudios en crecimiento que emplean múltiples preparados tanto *ex vivo* como *in vivo* apoyan la idea de que los pericitos serían los primeros elementos vasculares en ajustar su tono contráctil y por lo tanto, el diámetro capilar en respuesta a la actividad neuronal (Alarcon-Martinez et al., 2020; Attwell et al., 2010; Attwell & Laughlin, 2001; Fernández-Klett et al., 2010; Fernández-Klett & Priller, 2015; Hall et al., 2014; Hartmann et al., 2021; Ivanova et al., 2017; Kisler et al., 2017, 2020; Kovacs-Oller et al., 2020 a; Lacar et al., 2012; Lovick et al., 1999; McDowell et al., 2021; Nakagawa et al., 2009; Nelson et al., 2020; Peppiatt et al., 2006; Tong et al., 2021). Los pericitos se ubican en la interfaz neurovascular, un sitio privilegiado para monitorear la actividad neural y generar ajustes del FS según las necesidades metabólicas (Hall et al., 2014; Hartmann et al., 2021; Ivanova et al., 2017, 2019; Mishra et al., 2014; Nelson et al., 2020). En concordancia, las neuronas activas se encuentran más cercanas a los pericitos y a los capilares que a las arteriolas (Lovick et al., 1999). En esta tesis

determinamos que la activación glutamatérgica modula el intercambio de los pericitos con el fluido cerebral mediante panexones pericitarios. El glutamato constituye el principal neurotransmisor excitatorio del cerebro y ha sido involucrado como mediador del acoplamiento neuro-vascular (Hall et al., 2014; Peppiatt et al., 2006; Simandle et al., 2005; Wendling et al., 1996). Nuestros resultados muestran que el glutamato induce disminución concentración-dependiente de la captación de Etd<sup>+</sup> por los pericitos mediante el cierre de panexones pericitarios en las rodajas agudas de hipocampo. Este efecto fue inducido por la activación de los receptores glutamatérgicos neuronales de tipo NMDA y AMPA. Estos hallazgos fueron obtenidos mediante el empleo de herramientas farmacológicas en rodajas agudas de hipocampo de ratones salvajes y validados en KO globales para la Px1 (Figura 12). Por otra parte, ensayos de captación de Etd<sup>+</sup> en presencia de AMPA o NMDA en cultivos de pericitos cerebrales (donde estas células constituyen el tipo celular predominante (Isasi et al.,2019)), mostraron que estos agonistas no tienen un efecto directo sobre el intercambio de los pericitos con el microentorno, ya que no afectaron la captación de colorante por los pericitos cerebrales en cultivo. Esto es consistente con lo reportado por otros grupos de investigación, que establecen que los pericitos de roedores son insensibles a concentraciones milimolares de lglutamato y de NMDA (Domoki et al., 2008). En función de los resultados de esta tesis y los reportes de otros autores, sugerimos que el efecto de estos transmisores sobre la disminución de la funcionalidad de los panexones pericitarios sería indirecto, y la activación glutamatérgica desencadenaría la liberación de otro(s) intermediario(s) por parte de un tipo celular diferente a los pericitos que regularía(n) a la baja la funcionalidad de los panexones pericitarios. En una segunda etapa, determinamos los efectos del glutamato sobre el calibre capilar en las rodajas agudas de hipocampos derivadas de ratones salvajes y condicionales para la Px1 pericitaria (Figura 16). Los resultados obtenidos serían los primeros en establecer que este incremento en el diámetro capilar observado en presencia de glutamato se encuentra mediado por el cierre de los panexones pericitarios. Estos hallazgos son concordantes con concepciones en crecimiento que proponen a los pericitos como sensores de la actividad neural que responden frente a ésta para ajustar el FS vascular cerebral según las necesidades metabólicas (Hall et al., 2014; Hartmann et al., 2021; Ivanova et al., 2017, 2019; Nelson et al., 2020). Estudios pioneros de Hall y col., determinaron en rodajas cerebelares, que la vaso-relajación capilar inducida por el glutamato está mediada por (a) la prostanglandina E2 (mediante activación del receptor EP4), la cual para generar vasodilatación requiere de la presencia de (b) NO para suprimir el efecto constrictor del agente 20-HETE (Hall et al., 2014). Recientemente, mediante ensayos ex vivo e in vivo se ha demostrado que la aplicación de PGE<sub>2</sub> en concentración nano-molares induce dilatación a nivel capilar (asociada a una corriente hiperpolarizante de K<sup>+</sup>) que se propaga desde los capilares hacia las arterias controlando el flujo sanguíneo cerebral para producir hiperemia. La PGE<sub>2</sub> es un potente vasodilatador (Nippert et al., 2018) que inhibe la fosforilación de la cadena liviana de miosina generando relajación en pericitos mediante la vía de señalización AMPc/PKA (Takata et al., 2009). En función de estos antecedentes, la PGE<sub>2</sub> surge como candidato para mediar el efecto del glutamato sobre la permeabilidad pericitaria por los panexones observada en rodajas agudas de hipocampo. Nuestros resultados muestran que en presencia de PGE<sub>2</sub> los pericitos de las rodajas hipocampales no presentaron variaciones en la captación de colorante (cuando se aplica sólo), pero la PGE<sub>2</sub> en condiciones de contracción con NE revierte el aumento del intercambio mediado por panexones pericitarios (Figura 15). Si bien no podemos concluir que la PGE<sub>2</sub> sea el mediador responsable entre la activación neural de receptores glutamatérgicos y el cierre de panexones pericitarios, la PGE<sub>2</sub> podría jugar un rol regulador en otras circunstancias experimentales; estudios futuros serán necesarios para evaluar dicho rol, como ser evaluar otras concentraciones de PGE2 y ensayos de activación glutamatérgica en presencia de los antagonistas de los receptores de la PGE2. De acuerdo a los resultados reportados por Hall et al., el vasodilatador óxido nítrico (NO) surge como otro mediador que podría estar implicado en la regulación a la baja de la funcionalidad de los panexones pericitarios durante la activación neural, y por lo tanto del tono pericitario y del diámetro capilar. El NO ya sea de origen neuronal como endotelial ha sido involucrado como mediador del acoplamiento neurovascular aunque más que cómo mediador, se propone que actuaría como un agente permisivo cuya presencia se requiere para que actúe otra molécula/mecanismo de señalización para inducir vasodilatación como mencionamos previamente para la PGE<sub>2</sub> (Laranjinha et al., 2012; Barkoudah et al., 2004; Hall et al., 2014; Mapelli et al., 2017; Nippert et al., 2018). Durante la activación neural se libera NO desde las neuronas (Mishra et al., 2014; Cauli et al., 2004; Jaglin et al., 2012; Li et al., 2003; Metea & Newman, 2006); en el hipocampo, la estimulación de las neuronas genera niveles de NO endógeno que se hacen indetectables recién a distancias mayores a 400µm (Ledo et al., 2005). Además, estudios recientes muestran la presencia a nivel endotelial de receptores NMDA que al activarse inducen la eNOS y la producción de NO (Hogan-Cann et al., 2019). En resumen, la producción de NO ya sea de origen neuronal y/o endotelial podría acoplar la actividad neural con la hiperemia (Hogan-Cann et al., 2019) actuando como mensajero retrógrado o anterógrado (Garthwaite, 2008; Schuman & Madison, 1994; Tao & Poo, 2001) sobre los pericitos. En los pericitos, el NO disminuye el tono de los mismos mediante inhibición del influjo de  $Ca^{2+}$  a través de un mecanismo GMPc-dependiente (Haefliger et al., 1994; Sakagami et al., 2001; Kovacs-Oller et al., 2020 a,b) aunque se ha reportado un efecto independiente de la vía del GMPc (Hall et al., 2014). En concordancia con estos resultados en uréteres se determinó que el NO induce relajación de los pericitos por inhibición de ondas de  $Ca^{2+}$  mediadas por IP<sub>3</sub> (Borysova et al., 2013). Si bien en esta tesis no se evaluó el rol del NO sobre la permeabilidad pericitaria mediada por panexones, debido a las características mencionadas anteriormente y en la introducción, el mismo surge como candidato para acoplar el efecto del glutamato en el cierre de los panexones pericitarios y la vasodilatación capilar registrada; estudios a futuro serán necesarios para corroborar su participación.

Por otra parte, en el marco de esta tesis también evaluamos el efecto del agente vasodilatador acetilcolina (ACh) sobre la permeabilidad mediada por panexones pericitarios y el diámetro capilar (Figura 15 y 17). Los resultados obtenidos muestran que la ACh induce un decremento del intercambio pericito-fluido extracelular por modulación de la funcionalidad de panexones pericitarios que se asocia con vasodilatación a nivel del capilar subyacente. Utilizando microscopía bifotónica se ha demostrado que la ACh induce vasodilatación en los capilares post-arteriolares y de primer orden cuando se perfundió sobre los pericitos (Zambach et al., 2020). Estos resultados son concordantes con los obtenidos en nuestro modelo ex vivo (Figura 15 y 17). Si bien son escasos los reportes acerca del rol de la ACh sobre los pericitos y los capilares, en la cercanía de estos se han localizado las terminales nerviosas colinérgicas (Arnerić et al., 1988; Nizari et al., 2019), que expresan la acetilcolintransferasa (enzima biosintética de la ACh) (Arnerić et al., 1988; Estrada et al., 1983; Hamel, 2004; Tong & Hamel, 1999). Esta inervación provee un sustrato morfológico para el control nervioso colinérgico de la microvasculatura (Arnerić et al., 1988; Estrada et al., 1983; Hamel, 2004; Tong & Hamel, 1999). Además, el endotelio vascular cerebral también expresa dicha enzima (Arnerić et al., 1988; Parnavelas et al., 1985). La ACh de origen neuronal participa de la regulación de la resistencia vascular cerebral y del flujo sanguíneo local del cerebro incluyendo al hipocampo (Dauphin & MacKenzie, 1995; Lacombe et al., 1989; Tong & Hamel, 1999; Vaucher & Hamel, 1995) y modula el acoplamiento neurovascular en respuesta a la estimulación sensorial de las vibrisas (Lecrux et al., 2017). En arteria mesentérica el bloqueo de la Px1 genera una fuerte vasodilatación en presencia de ACh por un incremento de la producción de NO y por modulación de la fosforilación de la eNOS (Lillo et al., 2021). En este sentido en animales KO totales para la Px1,

la vasodilatación arterial dependiente de ACh/NO se encuentra potenciada (Gaynullina et al., 2015; Lillo et al., 2021). En cambio, nuestros resultados mostraron que la ACh no produce vasodilatación en la red capilar cuando la Px1 se encuentra genéticamente silenciada en los pericitos (Figura 17). A nivel endotelial se ha reportado que la ACh también genera incremento de los niveles de Ca<sup>2+</sup> que activa panexones produciendo liberación de ATP como mediador parácrino y autócrino; se postula que la vasodilatación que acompaña a la estimulación colinérgica puede ser mediada por la hidrólisis de ATP a adenosina mediante activación de purino-receptores P1 (Gaynullina et al., 2015). La adenosina es un potente vasodilatador cerebral (Phillis JW, 1989; 2004) que genera hiperpolarización pericitaria a través de la activación de canales de K<sup>+</sup> activados por ATP o K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> (Gaynullina et al., 2015; Hariharan et al., 2022; Li & Puro, 2001), reduciendo el tono contráctil de los mismos (Matsugi et al., 1997) y produciendo vasodilatación capilar. Estudios recientes demostraron que la actividad de los panexones inducida por estrés mecánico es reducido por la adenosina en cultivos celulares vía activación de PKA y fosforilación de los panexones en la región intracelular (Lopez et al, 2020).

En suma, en función de los resultados obtenidos en esta tesis, proponemos que durante la neurotransmisión excitatoria glutamatérgica y en presencia de agentes vasodilatadores la funcionalidad de los panexones pericitarios disminuye para inducir la vasodilatación capilar. En este sentido, postulamos que el cierre de los panexones pericitarios generaría una menor rigidez pericitaria, relajación de los pericitos y aumento del diámetro capilar que se acompañaría de un aumento del FS y de un incremento en el intercambio a través de la BHE. Estudios futuros serán necesarios para determinar los mediadores y los mecanismos intracelulares que se activan en estos contextos. En función de los reportes bibliográficos los mediadores que podrían estar implicados serían, la ACh, el NO y/o la PGE<sub>2</sub> (en concentraciones diferentes a las evaluadas en esta tesis) y/o la adenosina. Los mecanismos que inducen la relajación de los pericitos por disminución de la funcionalidad de los panexones y que podrían estar implicados en la dilatación capilar, serían la disminución de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, el menor entrecruzamiento actina-miosina y la despolimerización de la actina-F, entre otros mecanismos.

## 5.4- Los agentes vasoconstrictores ATP y NE incrementan la permeabilidad de la membrana pericitaria por activación de panexones, generando contracción capilar

En función de los resultados obtenidos, y considerando que los panexones constituyen reguladores de la liberación de ATP, se determinó el rango dinámico de acción del ATP sobre el intercambio pericitario mediado por los panexones en rodajas agudas de hipocampo. Para esto se evaluó la captación pericitaria de Etd<sup>+</sup> en presencia de concentraciones únicas crecientes de ATP exógeno (Figura 13). Las concentraciones evaluadas de acuerdo a reportes previos, inducen la activación de receptores purinérgicos pericitarios, la contracción pericitaria y un aumento de la resistencia capilar, que resulta en una disminución del FS en la microcirculación cerebral (Hall et al., 2014; Kawamura et al., 2003; Lacar et al., 2012; Mishra et al., 2014; Peppiatt et al., 2006). Los resultados obtenidos muestran que el ATP exógeno (concentraciones entre 0.075mM y 5mM) induce un aumento del intercambio mediado por panexones entre los pericitos y el microentorno. El efecto máximo del ATP se obtuvo para la concentración de 0.1mM, mientras que concentraciones mayores (0.5, 1.0 y 5.0mM) provocaron también un aumento significativo de la actividad de los panexones, pero dicho aumento fue decreciendo a medida que las concentraciones de ATP aumentaron (Figura 13). En línea con estos hallazgos, se ha reportado que el ATP extracelular a concentraciones elevadas (0.2 y 0.5mM) es capaz de promover la internalización de la Px1 (Boyce et al., 2015; Boyce & Swayne, 2017; De Lalio et al., 2019) y del receptor P2X<sub>7</sub> de la membrana celular por activación de estos receptores (Boyce et al., 2015; Boyce & Swayne, 2017). La internalización del cluster panexónreceptor P2X7 actúa como mecanismo de regulación y protección, evitando la liberación de elevados niveles de ATP al medio externo por los panexones (Boyce et al., 2015; Boyce & Swayne, 2011). En este sentido, recientemente se reportó que la suramina (bloqueante genérico de los P2R) previene la internalización del complejo molecular receptor P2-panexón en presencia de ATP (López et al., 2021). Por su parte hallazgos de Qiu & Dahl, demostraron que células que co-expresan canales de Px1 y receptores P2Y o P2X7 expuestas a altas concentraciones de ATP presentaron una activación transitoria de los panexones, que en vez de activar un ciclo de retroalimentación positiva desencadenó un ciclo de retroalimentación negativa caracterizado por la inactivación de los canales de Px1 generando un mecanismo de protección y prevención de daño celular (Qiu & Dahl, 2009). En función de estos antecedentes y los datos obtenidos, en los pericitos de las rodajas agudas del

hipocampo, postulamos que para la concentración de ATP de 0.1mM el sistema panexón-receptores purinérgicos se encuentra activo en su nivel máximo, mientras que para concentraciones de ATP mayores a 0.1mM, el sistema se encuentra también activo pero en una menor proporción. Futuros estudios serán necesarios para determinar si esta disminución de la activación de los panexones a concentraciones mayores a 0.1mM es debida a internalización/inactivación de los panexones y si esto se acompaña de variación en la actividad y/o en el número de receptores purinérgicos.

Por su parte, como se describió en la introducción la apertura de panexones y la liberación de ATP hacia el microentorno es disparada por activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) incluyendo los receptores adrenérgicos de tipo al (RAa1) (Billaud et al., 2011, 2014; Chiu et al., 2021; De Lalio et al., 2019). En esta tesis evaluamos el efecto de la noradrenalina (NE) sobre la comunicación pericitaria dependiente de panexones utilizando la técnica de captación de colorante (Figura 14). Los resultados obtenidos en rodajas agudas de hipocampo muestran que la NE (concentraciones 0.010- 0.1mM) induce un aumento de la actividad de los panexones que resultó máximo para la concentración de 0.015mM para luego alcanzar una meseta, lo que sugiere la saturación del sistema RAa-panexón. Los hallazgos de esta tesis serían los primeros en determinar que la NE es capaz de incrementar la actividad de los panexones pericitarios. Estos resultados son concordantes con los reportados en el músculo liso vascular, donde se describió que la activación de receptores adrenérgicos al por fenilefrina y noradrenalina, induce liberación de ATP mediada por panexones funcionales y activación de receptores P2Y (Billaud et al., 2011, 2015). Si bien son escasos los reportes que describen del efecto de la NE sobre los pericitos, el 65% de las terminales simpáticas noradrenérgicas se encuentra más próximas a los capilares que a las arteriolas (Cohen et al., 1997; Itakura et al., 1977). La NE despolariza la membrana pericitaria (Helbig et al., 1992) y aumenta la concentración de AMPc intracelular generando contracción pericitaria (Kelley et al., 1987; Markhotina et al., 2007). Los pericitos expresan receptores para la NE de tipo α1 (Elfont et al., 1989; Helbig et al., 1992) y aunque estudios transcriptómicos muestran una expresión muy baja del gen del RA-a1 (Hariharan et al., 2020; Vanlandewijck et al., 2018), esto puede deberse a la baja tasa de turnover de esta proteína.

La(s) cascada(s) de señalización que se dispara(n) desde la activación de receptores acoplados a proteínas G como el RA- $\alpha$ 1, o por la activación de receptores purinérgicos metabotrópicos que genera activación reversible de la Px1, no fueron abordados en esta tesis. Sin embargo, en otros

sistemas se ha reportado que la activación de los receptores de membrana P2Y, P2X y RA-al provoca un aumento transitorio de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, ya sea por ingreso de Ca<sup>2+</sup> a través de los propios receptores o por movilización de los reservorios internos. La activación de los receptores purinérgicos y adrenérgicos también induce activación de quinasas dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaMKII) o Src de la Tirosina, que fosforilan a la Px1 en su dominio intracelular (c-terminal) produciendo un cambio conformacional que genera a su vez la apertura transitoria (reversible) del panexón y liberación de ATP al entorno (De Lalio et al., 2019; Iglesias et al., 2008; Locovei, et al., 2006 b; López et al., 2021; Yang et al., 2022). El aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular por sí mismo también activa los panexones que resulta en la liberación de ATP al entorno (Locovei et al., 2006 b). Para el caso de la activación del RA-al recientemente se determinó que dicho receptor induce la apertura de la Px1 mediante activación de proteínas G por una vía no canónica de activación mediada por Rho-A, que finalmente ocasiona desacetilación de una lisina del domino cterminal intracelular de la Px1 que es independiente del aumento de Ca2+ y de la activación de la fosfolipasa C (Chiu et al., 2021). Futuros estudios serán necesarios para determinar cuáles son las vías de señalización intrapericitarias involucradas en promover un aumento de la actividad de los panexones pericitarios en presencia de los agentes vasoconstrictores ATP y/o NE exógena.

En una segunda etapa, estudiamos si los canales pericitarios formados de Px1 median variaciones del calibre capilar en presencia de ATP ( $100\mu$ M) y NE ( $15\mu$ M), los cuales inducen contracción en los pericitos (Billaud et al., 2011, 2012; Cai et al., 2018; Hall et al., 2014; Hartmann et al., 2021; Kawamura et al., 2003; Nelson et al., 2020; Peppiatt et al., 2006). Los resultados obtenidos muestran que en presencia de ATP y NE, los capilares que subyacen a los pericitos presentan una reducción de su calibre (vasocontricción) en rodajas agudas de hipocampo provenientes de ratones salvajes. En cambio, el silenciamento genético de la Px1 pericitaria previene la disminución del calibre capilar inducida por estos agentes para las mismas concentraciones evaluadas en los capilares de los animales salvajes (Figura 17). Estos resultados permiten concluir que los panexones pericitarios participan en la regulación del diámetro de los capilares mediante ajustes en el tono contráctil de los pericitos pericapilares.

Múltiples mecanismos celulares gatillados por la Px1 podrían regular el tono contráctil y/o la rigidez de los pericitos pericapilares y controlar así el diámetro capilar. En el músculo esquelético, en el músculo liso vascular y de arterias de resistencia, la activación de la Px1 potencia la contracción

muscular, mecanismo dependiente del ATP liberado por los panexones (Billaud et al.,2012; 2014; De Lalio et al., 2019; Riquelme et al., 2013). En el músculo liso vascular se ha demostrado la existencia de microdominios de señalización adrenérgica, en los cuales la Px1 se acopla funcionalmente con la proteína "scaffold" caveolina-1. La interacción entre ambas es inducida durante la estimulación de los receptores RA-a desencadenando vasoconstricción y liberación de ATP por los panexones en las arterias de resistencia. De esta forma, la interacción de la caveolina-1 con el bucle intracelular de la Px1 modulando la vasocontracción arterial genera en parte variación de la presión arterial (De Lalio et al., 2019). En los últimos años, han aumentado las evidencias sobre los roles de la Px1 sobre la regulación del citoesqueleto, la maquinaria contráctil y los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular. En este sentido la presencia de maquinaria contráctil en los pericitos es consistente con la función de modificar activamente su tono y por lo tanto modular el diámetro capilar y el flujo sanguíneo (Hall et al., 2014; Hartmann et al., 2021; Isasi et al., 2019; Ivanova et al., 2019; Kawamura et al., 2003; Kisler et al., 2017, 2020; Lacar et al., 2012; Mishra et al., 2014, 2016; Nelson et al., 2020; Peppiatt et al., 2006). Estudios recientes han determinado que los pericitos más cercanos a las arteriolas expresan actina del musculo liso ( $\alpha$ -SMA); sin embargo, no hay consenso si los pericitos localizados en el lecho medio capilar expresan α-SMA o proteínas contráctiles alternativas (Alarcon-Martinez et al., 2018; Hartmann et al., 2021; Lebeux & Willemot, 1978; Mai-Morente et al., 2020; Nelson et al., 2020). En los pericitos del lecho medio capilar deficientes en  $\alpha$ -SMA, mediante estimulacióm optogenética y microscopía multifotón se observó disminución del diámetro capilar, lo que llevó a postular que las variaciones en el tono de los pericitos en esta localización es mediada por otras proteínas contráctiles (Hartmann et al., 2021; Nelson et al., 2020). En este sentido, mediante estudios transcriptómicos se reportó la expresión de múltiples genes que codifican para componentes de la maquinara contráctil en los pericitos: vimentina, desmina, titina, cadena pesada de la miosina 9, 10 y 11 y liviana de la miosina 6, 9, 12a y 12b, y genes asociados a la miosina (Myo1c, 1d, 5a, 6, 10 y 18a), que pueden estar mediando la contracción pericitaria y capilar (He et al., 2018; Vanlandewijck et al., 2018). Además, se ha demostrado que la rigidez y la contractilidad de los pericitos dependería de cambios en el estado de polimerización de la actina filamentosa (F actina) del citoesqueleto y de la α-SMA (Alarcon-Martinez et al., 2018, 2019; Kureli et al., 2020; Erdener et al., 2022). A nivel celular la tasa de turnover de la α-SMA es muy baja y en los pericitos la actina se encuentra en equilibrio despolimerización/repolimerización (Erdener et al., 2022). Mediante estudios in vivo en los que se inyectó NE intra-vitreal, se determinó que la NE promovía una rápida polimerización de la F-actina en los pericitos de todos los órdenes del árbol vascular de la retina, apoyando la hipótesis que los pericitos se contraen a través de la α-SMA en estado filamentoso (Erdener et al., 2022; Kureli et al., 2020). Con respecto a la expresión de proteínas contráctiles en pericitos, nuestros resultados en rodajas agudas del hipocampo mediante inmuno-fluorescencia evidenciaron que un grupo de pericitos (TO-PRO-3<sup>+</sup>) expresa la proteína  $\alpha$ -SMA, mientras que en otro grupo de pericitos TO-PRO- $3^+$  la  $\alpha$ -SMA fue indetectable (Mai-Morente et al, 2020). Esta expresión diferencial de la  $\alpha$ -SMA podría reflejar la heterogeneidad de la población de pericitos descrita por otros autores que postulan que los pericitos cercanos a las arteriolas expresan mayor cantidad de  $\alpha$ -SMA que los ubicados en el lecho medio capilar (Attwell et al., 2016; Bandopadhyay et al., 2001; Grant et al., 2019; Nehls & Drenckhahn, 1991). En estos pericitos, se propone que la ausencia de α-SMA es un efecto de la fijación del tejido y que hay que prevenir la despolimerización de la F-actina para detectarla (Alarcon-Martinez et al., 2018, 2019; Kureli et al., 2020). En nuestro modelo experimental, el porcentaje de pericitos TO-PRO- $3^{+}/\alpha$ -SMA<sup>+</sup> dependió de las técnicas empleadas, encontrándose el mayor porcentaje de pericitos α-SMA<sup>+</sup>, cuando se estabilizó la α-SMA con jasplakinoide previo a su fijación y detección con inmunofluorescencia (Mai-Morente y col, 2020). En nuestro estudio, no identificamos con exactitud en qué localización del árbol vascular se encontraron los pericitos y los capilares analizados tratados con los agentes vasoactivos, así como tampoco realizamos estudios adicionales para abordar la ubicación precisa de los pericitos que expresan α-SMA dentro del árbol vascular. Pero, cabe destacar que el diámetro capilar en condiciones basales tanto en rodajas hipocampales de animales salvajes como condicionales para la Px1 pericitaria fue similar al reportado para capilares cercanos a las arteriolas, entre el primer y el tercer orden en estudios in vivo mediante microscopía bifotónica (Hariharan et al., 2022). Concordantemente, resultados similares a los obtenidos en esta tesis de calibre capilar en ratones han sido reportados por otros grupos de investigación utilizando múltiples metodologías (Boero et al., 1999; Kovacs-Oller et al., 2020 a,b; McDowell et al., 2021; Moeini et al., 2020; Müller et al., 2008; Steinman et al., 2017; Tata & Anderson, 2002).

Además de promover la contracción pericitaria a través de una rápida polimerización de su actina F (Erdener et al., 2022; Kureli et al., 2020), la NE mediante activación del receptor  $\alpha$ 2 (Elfont et al., 1989) incrementa la fosforilación de la cadena liviana de la miosina evento clave para la contracción a nivel pericitario (Gonzales et al., 2020; Webb R.C., 2003). En otros tipos celulares, se ha reportado que la proteína Px1 está involucrada en la regulación de la migración celular posiblemente por sus

efectos sobre la actomiosina del citoesqueleto (Alvarez et al., 2016; Bao et al., 2012; Boyce et al., 2014; Lohman et al., 2015; Wicki-Stordeur & Swayne, 2013), ya que la Px1 interactúa con la actina y con las proteínas moduladoras de la actina del citoesqueleto (Bhalla-Gehi et al., 2010; Wicki-Stordeur & Swayne, 2013). En los pericitos la RhoA/Rho quinasa modula el citoesqueleto de actina hacia su estado contráctil mediante la actividad de la RhoA GTPasa (Durham et al., 2014; Kolyada et al., 2003; Kutcher et al., 2007) y la motilidad celular por su efecto sobre la dinámica de la polimerización de la actina (Hall, 1998; Pantaloni et al., 2001). En las neuronas de la capa CA1 del hipocampo de animales KO totales para la Px1 se ha determinado un incremento de la actina F y alta expresión de Rho/GTPasa activa, que se correlacionan con una perturbación en la dinámica del citoesqueleto de actina, sugiriendo que la panexinal "estabiliza" la morfología y la función neural por modulación de la dinámica de la actina mediante mecanismos que involucran a la familia de las Rho-GTPasas (Flores-Muñoz et al., 2021). El inhibidor de la Rho quinasa (fasudil) bloquea la formación de los puentes de actomiosina y enlentece el mecanismo de polimerización de la actina del citoesqueleto inhibiendo el tono contráctil pericitario y provocando dilatación capilar (Hartmann et al., 2021). En este sentido, estudios recientes describieron una vía de señalización en la cual la activación de los RAa1 genera activación de panexones por Rho (Chiu et al., 2021), en el epitelio respiratorio la inhibición de la RhoA quinasa o de la quinasa de la cadena liviana de la miosina (MLC) induce una disrupción del citoesqueleto de actina y una disminución significativa de la liberación de ATP vía canales de Px1 (Seminario-Vidal et al., 2011). A nivel arteriolar, los receptores P2Y<sub>6</sub> del músculo liso median la activación el sistema RhoA GTPasa, la fosforilización de la cadena liviana de la miosina y la contracción muscular, siendo este mecanismo más importante que el aumento intracelular de Ca<sup>2+</sup> por movilización de los reservorios internos por IP<sub>3</sub> (Kauffenstein et al., 2016). Un reporte reciente propone la existencia de un mecanismo de retroalimentación entre los panexones y el citoesqueleto, donde los panexones regulan la dinámica del citoesqueleto el que a su vez modula la activación de los panexones (Yang et al., 2022). En forma canónica la contracción pericitaria y los ajustes resultantes del diámetro capilar se inician por la formación de puentes cruzados entre la actina y la miosina y requiere del aumento de la concentración intrapericitaria de  $Ca^{2+}$  ([ $Ca^{2+}$ ]i), vía final común de la regulación del tono pericitario (Alarcon-Martinez et al., 2018, 2019; Bandopadhyay et al., 2001; Burdyga et al., 2014; Gonzales et al; 2020; Erdener et al., 2022; Kureli et al., 2020). Como se describió en la introducción, los panexones son reguladores fisiológicos de la liberación de ATP lo que impacta en modulaciones del Ca<sup>2+</sup> intracelular entre otros por la activación de receptores purinérgicos (Billaud et al., 2011; Garré et al., 2010; Isakson & Thompson, 2014; Locovei et al., 2006 a; Lohman & Isakson, 2014; Pelegrin & Surprenant, 2006; Thompson et al., 2008).

En resumen, nuestros resultados experimentales en rodajas agudas de hipocampo indican que la actividad de los panexones pericitarios es necesaria para generar vasoconstricción capilar en presencia de ATP y NE. En esta tesis no se ahondó en los mecanismos intrapericitarios que vinculan el aumento de la funcionalidad de los panexones pericitarios con la contracción capilar, pero las vías anteriormente detalladas surgen como posibles candidatos a explorar. En este escenario, proponemos aquí que, en presencia de estos agentes vasoconstrictores, los panexones pericitarios se activan liberando ATP al microentorno incrementando la [Ca<sup>2+</sup>]i pericitaria mediante la estimulación de receptores purinérgicos pericitarios ya sean ionotrópicos (activados por ligando) P2X y/o metabotrópicos (acoplados a proteína G) P2Y. Estos procesos promoverían el entrecruzamiento actina-miosina aumentando el tono pericitario. En forma complementaria, la presencia de los agentes vasoconstrictores podría promover la activación del sistema RhoA-GTPasa intrapericitario, derivando en la activación de los panexones, el entrecruzamiento actina-miosina y la modulación de las transiciones entre polimerización/despolimerización de la actina hacia la formación de actina F. Estos mecanismos generarían un incremento del tono pericitario que se acompañaría de contracción capilar, del aumento de la resistencia al FS y de un menor intercambio a través de la BHE.

### 5.5- Los panexones pericitarios se encuentran implicados en los procesos de aprendizaje y memoria en el animal vivo

La activación de la vía glutamatérgica/receptores NMDA subyace los procesos de aprendizaje y memoria en el hipocampo (Ardiles et al., 2014; Gajardo et al., 2018; Prochnow et al., 2012; Stehberg et al., 2012). En función de los resultados anteriormente descritos, en preparados *ex vivo* la activación excitatoria glutamatérgica induce vasodilatación capilar, efecto que requiere de la expresión de panexones funcionales de Px1 en los pericitos. Por lo tanto, postulamos que durante los procesos de aprendizaje y memoria en el hipocampo se generaría un aumento de la perfusión cerebral, que requeriría de la participación del glutamato y los panexones pericitarios para regular la

resistencia capilar y el flujo sanguíneo cerebral. Con el objetivo de evaluar las implicancias funcionales de los panexones pericitarios durante el proceso de memoria y aprendizaje realizamos ensayos de reconocimiento de objeto novedoso (NOR test) (Figura 19). Los resultados obtenidos muestran que, los ratones que no expresan la Px1 pericitaria no fueron capaces de discriminar el cambio de un objeto familiar por uno nuevo. Si bien un estudio más exhaustivo es necesario, postulamos que la ausencia de la Px1 pericitaria generaría incapacidad de modular/adaptar el tono pericitario para inducir la vaso-relajación del capilar acoplada a la activación neural que subyace los procesos de memoria y aprendizaje generando un déficit en la perfusión y el intercambio a través de la BHE en la microvasculatura. En este sentido, a nivel patológico la disfunción pericitaria acompaña una variedad de trastornos asociados a alteraciones cognitivas, tales como enfermedad de los pequeños vasos cerebrales, accidente cerebro-vascular, demencia y enfermedad de Alzheimer. Algunos de los mecanismos patogénicos que subyacen las alteraciones cognitivas vasculares determinadas por los pericitos han sido recientemente revisadas (Uemura et al., 2020) e incluyen inestabilidad de los microvasos, desmielinización, contracción sostenida de los pericitos con la consecuente disminución del calibre capilar y del flujo sanguíneo cerebral (Hall et al., 2014; Nortley et al., 2019; Yemisci et al., 2009).

#### 6. CONCLUSIÓN

A partir de los resultados presentados en esta tesis, proponemos que los pericitos ubicados estratégicamente en la interfaz entre los capilares sanguíneos y el parénquima cerebral detectarían la señales liberadas según las necesidades metabólicas neuronales para generar una respuesta vascular en la red capilar, tal como se esquematiza (Esquema 3).

En "estado de reposo cerebral" los panexones de los pericitos pericapilares se encontrarían funcionales liberando tónicamente ATP. Este mediador soluble, actuando de forma autócrina/parácrina activaría receptores purinérgicos  $P2X_7$  y  $P2Y_6$  acoplados a panexones manteniendo el nivel de Ca<sup>2+</sup> intrapericitario, y así el tono pericitario y el diámetro capilar en "condiciones basales" (ver esquema 1). Frente a aumentos en las demandas metabólicas neuronales, activación de la vía glutamatérgica neural y/o la presencia de vasodilatadores de origen endotelial o neural, este mecanismo mediado por panexones y receptores purinérgicos se modularía a la baja, asociándose a una disminución de la liberación de ATP al microentorno y en consecuencia a una reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$ , pudiendo generar desacoplamiento de los puentes de actina-miosina, despolimerización de la actina y relajación de los pericitos que se traduciría a nivel capilar en vasodilatación, y aumento del flujo sanguíneo y del intercambio local en la BHE.

En presencia de estímulos constrictores (ATP o NE) se activarían receptores purinérgicos y/o adrenérgicos pericitarios, generándose un incremento de la funcionalidad de los panexones pericitarios con la consecuente liberación de ATP. El ATP mediante activación de receptores purinérgicos, induciría un aumento del Ca<sup>2+</sup> pericitario que conduciría a su vez a la apertura de panexones, amplificando la señal (liberación de ATP inducida por ATP). El aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> provocaría contracción pericitaria por fosforilación de la miosina, acoplamiento de los puentes de actina-miosina, desencadenando en una mayor rigidez pericitaria y la constricción del capilar subyacente.

De este modo, los panexones de los pericitos pericapilares ubicados en la interfaz neurovascular censarían las demandas metabólicas del entorno acoplando la actividad neuronal al estado funcional del pericito para regular su tono contráctil lo cual se reflejaría en variaciones del diámetro del capilar subyacente; estos procesos finalmente ajustarían el flujo sanguíneo y el intercambio a través de la BHE. La regulación de la resistencia de la red capilar cerebral por los panexones pericitarios sería

fundamental para asegurar un adecuado desempeño cognitivo en el animal vivo y despierto. Futuros estudios en el animal vivo son necesarios para determinar el rol de la Px1 pericitaria en el acoplamiento neurovascular.

En conjunto, esta tesis revela un nuevo rol para los panexones pericitarios como reguladores neurometabólicos fisiológicos. En condiciones patológicas del sistema nervioso, alteraciones en la modulación de la funcionalidad de los panexones pericitarios promoverán contracción/dilatación capilar impactando en el intercambio a través de la barrera hematoencefálica y en la viabilidad del cerebro donde la Px1 pericitaria tendría tanto un rol deletéreo como neuro-protector.



Esquema 3- Mecanismos propuestos para el ajuste del calibre capilar regulado por panexones y receptores purinérgicos pericitarios. En reposo los panexones pericitarios liberan ATP al medio externo que induce la activación autócrina de receptores purinérgicos ionotrópicos P2X y metabotrópicos P2Y, y en consecuencia el ajuste de los niveles de  $Ca^{2+}$  y el tono contráctil pericitario. En condiciones de activación neural y/o en presencia de agentes vasodilatadores, los panexones se inactivan generando una disminución de la liberación de ATP, una menor activación de receptores purinérgicos; generando una disminución de los niveles de  $Ca^{2+}$  intrapericitario, del tono contráctil del pericito y vasodilatación capilar que se acompañaría con un incremento del intercambio metabólico. En presencia de agentes vasoconstrictores, los panexones se activación de receptores purinérgicos; los panexones se activación de receptores purinérgicos. En presencia de agentes vasoconstrictores, los panexones se activan generando una disminución de los noveles de  $Ca^{2+}$  intrapericitario, del tono contráctil del pericito y vasodilatación capilar que se acompañaría con un incremento del intercambio metabólico. En presencia de agentes vasoconstrictores, los panexones se activan generando liberación de ATP al medio externo y la activación de receptores purinérgico y el subsecuente aumento del  $Ca^{2+}$  intrapericitario. El aumento del  $Ca^{2+}$  intrapericitario aumentaría el tono contráctil del pericito provocando en la microvasculatura vasoconstricción y disminución del intercambio metabólico.

#### 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, N. J., Hughes, C. C. W., Revest, P. A., & Greenwood, J. (1992). Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: Towards an in vitro blood-brain barrier. *Journal of Cell Science*, 103(1), 23-37. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1429907/
- Abbott, N. Joan, Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. En Neurobiology of Disease (Vol. 37, Número 1, pp. 13-25). Neurobiol Dis. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Abbott, N.J.; Ronnback, L.; Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat. Rev. Neurosci, 7(1), 43-57.
- Abudara, V., Bechberger, J., Freitas-Andrade, M., De Bock, M., Wang, N., Bultynck, G., Naus, C. C., Leybaert, L., & Giaume, C. (2014). The connexin43 mimetic peptide Gap19 inhibits hemichannels without altering gap junctional communication in astrocytes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(OCT). https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00306
- Abudara, V., Retamal, M. A., Del Rio, R., & Orellana, J. A. (2018). Synaptic Functions of Hemichannels and Pannexons: A Double-Edged Sword. Frontiers in molecular neuroscience, 11, 435. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00435
- Abudara, V., Roux, L., Dallérac, G., Matias, I., Dulong, J., Mothet, J. P., Rouach, N., & Giaume, C. (2015). Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *GLIA*, 63(5), 795-811. https://doi.org/10.1002/glia.22785
- Al Ahmad, A., Gassmann, M., & Ogunshola, O. O. (2009). Maintaining blood-brain barrier integrity: Pericytes perform better than astrocytes during prolonged oxygen deprivation. *Journal of Cellular Physiology*, 218(3), 612-622. https://doi.org/10.1002/jcp.21638
- Alarcon-Martinez, L., Villafranca-Baughman, D., Quintero, H., Kacerovsky, J. B., Dotigny, F., Murai, K. K., Prat, A., Drapeau, P., & Di Polo, A. (2020). Interpericyte tunnelling nanotubes regulate neurovascular coupling. *Nature*, 585(7823), 91-95. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2589-x
- Alarcon-Martinez, L., Yilmaz-Ozcan, S., Yemisci, M., Schallek, J., Kılıç, K., Can, A., Di Polo, A., & Dalkara, T. (2018). Capillary pericytes express αsmooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *eLife*, 7. https://doi.org/10.7554/eLife.34861
- Alarcon-Martinez, L., Yilmaz-Ozcan, S., Yemisci, M., Schallek, J., Kılıç, K., Villafranca-Baughman, D., Can, A., Di Polo, A., & Dalkara, T. (2019). Retinal ischemia induces α-SMA-mediated capillary pericyte contraction coincident with perivascular glycogen depletion. Acta neuropathologica communications, 7(1), 134. https://doi.org/10.1186/s40478-019-0761-z
- Alvarez, A., Lagos-Cabré, R., Kong, M., Cárdenas, A., Burgos-Bravo, F., Schneider, P., Quest, A. F. G., & Leyton, L. (2016). Integrin-mediated transactivation of P2X7R via hemichannel-dependent ATP release stimulates astrocyte migration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(9), 2175-2188. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.05.018
- Anderson, C. M., & Nedergaard, M. (2003). Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. En *Trends in Neurosciences* (Vol. 26, Número 7, pp. 340-344). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00141-3
- Anselmi, F., Hernandez, V. H., Crispino, G., Seydel, A., Ortolanoa, S., Roper, S. D., Kessaris, N., Richardson, W., Rickheit, G., Filippov, M. A., Monyer, H., & Mammano, F. (2008). ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca2+ signals across the inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18770-18775. https://doi.org/10.1073/pnas.0800793105
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. En Trends in Neurosciences (Vol. 22, Número 5, pp. 208-215). Trends Neurosci. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6
- Ardiles, A. O., Flores-Muñoz, C., Toro-Ayala, G., Cárdenas, A. M., Palacios, A. G., Muñoz, P., Fuenzalida, M., Sáez, J. C., & Martínez, A. D. (2014). Pannexin 1 regulates bidirectional hippocampal synaptic plasticity in adult mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 326. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00326
- Armstead, W. M. (2016). Cerebral Blood Flow Autoregulation and Dysautoregulation. En Anesthesiology Clinics (Vol. 34, Número 3, pp. 465-477). W.B. Saunders. https://doi.org/10.1016/j.anclin.2016.04.002
- Armulik, A., Genové, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. En Developmental Cell (Vol. 21, Número 2, pp. 193-215). https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001
- Arnerić, S. P., Honig, M. A., Milner, T. A., Greco, S., Iadecola, C., & Reis, D. J. (1988). Neuronal and endothelial sites of acetylcholine synthesis and release associated with microvessels in rat cerebral cortex: ultrastructural and neurochemical studies. *Brain Research*, 454(1-2), 11-30. https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90799-8
- Attwell, D., & Laughlin, S. B. (2001). An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. En Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism (Vol. 21, Número 10, pp. 1133-1145). Lippincott Williams and Wilkins. https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001
- Attwell, D., Buchan, A. M., Charpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B. A., & Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. En Nature (Vol. 468, Número 7321, pp. 232-243). https://doi.org/10.1038/nature09613
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C. N., O'Farrell, F. M., & Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 36(2), 451-455. https://doi.org/10.1177/0271678X15610340

- Avolio, E., & Madeddu, P. (2016). Discovering cardiac pericyte biology: From physiopathological mechanisms to potential therapeutic applications in ischemic heart disease. En Vascular Pharmacology (Vol. 86, pp. 53-63). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.05.009
- Ball, K. K., Gandhi, G. K., Thrash, J., Cruz, N. F., & Dienel, G. A. (2007). Astrocytic connexin distributions and rapid, extensive dye transfer via gap junctions in the inferior colliculus: Implications for [14C] glucose metabolite trafficking. *Journal of Neuroscience Research*, 85(15), 3267-3283. https://doi.org/10.1002/jnr.21376
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. En Neurobiology of Disease (Vol. 16, Número 1, pp. 1-13). Neurobiol Dis. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.016
- Bandopadhyay, R., Orte, C., Lawrenson, J. G., Reid, A. R., De Silva, S., & Allt, G. (2001). Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *Journal of Neurocytology*, 30(1), 35-44. https://doi.org/10.1023/A:1011965307612
- Bao, B. A., Lai, C. P., Naus, C. C., & Morgan, J. R. (2012). Pannexin1 drives multicellular aggregate compaction via a signaling cascade that remodels the actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8407-8416. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.306522
- Bao, L., Locovei, S., & Dahl, G. (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. FEBS Letters, 572(1-3), 65-68. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.009
- Barbosa, F. F., & Silva, R. H. (2018). Chapter 18 Immediate-Early Gene Expression in Neural Circuits Related to Object Recognition Memory. En A. Ennaceur & M. A. B. T.-H. of B. N. de Souza Silva (Eds.), *Handbook of Object Novelty Recognition* (Vol. 27, pp. 261-271). Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812012-5.00018-5
- Barkoudah, E., Jaggar, J. H., & Leffler, C. W. (2004). The permissive role of endothelial NO in CO-induced cerebrovascular dilation. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 287(4), H1459-65. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00369.2004
- Beardslee, M. A., Laing, J. G., Beyer, E. C., & Saffitz, J. E. (1998). Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circulation Research*, 83(6), 629-635. https://doi.org/10.1161/01.RES.83.6.629
- Begandt, D., Good, M. E., Keller, A. S., DeLalio, L. J., Rowley, C., Isakson, B. E., & Figueroa, X. F. (2017). Pannexin channel and connexin hemichannel expression in vascular function and inflammation. En *BMC Cell Biology* (Vol. 18). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12860-016-0119-3
- Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., & Zlokovic, B. V. (2010). Pericytes Control Key Neurovascular Functions and Neuronal Phenotype in the Adult Brain and during Brain Aging. *Neuron*, 68(3), 409-427. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.043
- Belluardo, N., Trovato-Salinaro, A., Mudo, G., Hurd, Y. L., and Condorelli, D. F. (1999). Structure, chromosomal localization, and brain expression of human Cx36 gene. . . J. Neurosci. Res, 57, 740–752.
- Bennett, M. V. L., & Zukin, R. S. (2004). Electrical Coupling and Neuronal Synchronization in the Mammalian Brain. En Neuron (Vol. 41, Número 4, pp. 495-511). Cell Press. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00043-1
- Bennett, M. V. L., Contreras, J. E., Bukauskas, F. F., & Sáez, J. C. (2003). New roles for astrocytes: Gap junction hemichannels have something to communicate. En *Trends in Neurosciences* (Vol. 26, Número 11, pp. 610-617). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.09.008
- Bhalla-Gehi, R., Penuela, S., Churko, J. M., Shao, Q., & Laird, D. W. (2010). Pannexin1 and pannexin3 delivery, cell surface dynamics, and cytoskeletal interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(12), 9147-9160. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082008
- Billaud, M., Chiu, Y.-H., Lohman, A. W., Parpaite, T., Butcher, J. T., Mutchler, S. M., DeLalio, L. J., Artamonov, M. V, Sandilos, J. K., Best, A. K., Somlyo, A. V, Thompson, R. J., Le, T. H., Ravichandran, K. S., Bayliss, D. A., & Isakson, B. E. (2015). A molecular signature in the pannexin1 intracellular loop confers channel activation by the α1 adrenoreceptor in smooth muscle cells. *Science Signaling*, 8(364), ra17. https://doi.org/10.1126/scisignal.2005824
- Billaud, M., Lohman, A. W., Johnstone, S. R., Biwer, L. A., Mutchler, S., & Isakson, B. E. (2014). Regulation of cellular communication by signaling microdomains in the blood vessel wall. *Pharmacological Reviews*, 66(2), 513-569. https://doi.org/10.1124/pr.112.007351
- Billaud, M., Lohman, A. W., Straub, A. C., Looft-Wilson, R., Johnstone, S. R., Araj, C. A., Best, A. K., Chekeni, F. B., Ravichandran, K. S., Penuela, S., Laird, D. W., & Isakson, B. E. (2011). Pannexin1 regulates α1-adrenergic receptor- mediated vasoconstriction. *Circulation Research*, 109(1), 80-85. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.237594
- Billaud, M., Sandilos, J. K., & Isakson, B. E. (2012). Pannexin 1 in the Regulation of Vascular Tone. En Trends in Cardiovascular Medicine (Vol. 22, Número 3, pp. 68-72). NIH Public Access. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.06.014
- Bink, K., Walch, A., Feuchtinger, A., Eisenmann, H., Hutzler, P., Höfler, H., & Werner, M. (2001). TO-PRO-3 is an optimal fluorescent dye for nuclear counterstaining in dual-colour FISH on paraffin sections. *Histochemistry and Cell Biology*, 115(4), 293-299. https://doi.org/10.1007/s004180100254
- Blinder, P., Shih, A. Y., Rafie, C., & Kleinfeld, D. (2010). Topological basis for the robust distribution of blood to rodent neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28), 12670-12675. https://doi.org/10.1073/pnas.1007239107
- Boero, J. A., Ascher, J., Arregui, A., Rovainen, C., & Woolsey, T. A. (1999). Increased brain capillaries in chronic hypoxia. Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985), 86(4), 1211-1219. https://doi.org/10.1152/jappl.1999.86.4.1211

- Bondjers, C., He, L., Takemoto, M., Norlin, J., Asker, N., Hellström, M., Lindahl, P., Betsholtz, C., Bondjers, C., He, L., Takemoto, M., Norlin, J., Asker, N., Hellström, M., Lindahl, P., & Betsholtz, C. (2006). Microarray analysis of blood microvessels from PDGF-B and PDGF-Rβ mutant mice identifies novel markers for brain pericytes. *The FASEB Journal*, 20(10), 1703-1705. https://doi.org/10.1096/fj.05-4944fje
- Bonkowski, D., Katyshev, V., Balabanov, R. D., Borisov, A., & Dore-Duffy, P. (2011). The CNS microvascular pericyte: Pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. En *Fluids and Barriers of the CNS* (Vol. 8, Número 1). Fluids Barriers CNS. https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-8
- Borysova, L., Wray, S., Eisner, D. A., & Burdyga, T. (2013). How calcium signals in myocytes and pericytes are integrated across in situ microvascular networks and control microvascular tone. *Cell calcium*, 54(3), 163–174. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.06.001
- Borysova, L., & Burdyga, T. (2015). Evidence that NO/cGMP/PKG signalling cascade mediates endothelium dependent inhibition of IP3R mediated Ca2+ oscillations in myocytes and pericytes of ureteric microvascular network in situ. *Cell Calcium*, 58(6), 535-540. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.08.006
- Boyce, A. K. J., & Swayne, L. A. (2017). P2X7 receptor cross-Talk regulates ATP-induced pannexin 1 internalization. *Biochemical Journal*, 474(13), 2133-2144. https://doi.org/10.1042/BCJ20170257
- Boyce, A. K. J., Kim, M. S., Wicki-Stordeur, L. E., & Swayne, L. A. (2015). ATP stimulates pannexin 1 internalization to endosomal compartments. *Biochemical Journal*, 470(3), 319-330. https://doi.org/10.1042/BJ20141551
- Boyce, A. K. J., Wicki-Stordeur, L. E., & Swayne, L. A. (2014). Powerful partnership: crosstalk between pannexin 1 and the cytoskeleton. *Frontiers in Physiology*, *5*, 27. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00027
- Braet, K., Vandamme, W., Martin, P. E. M., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2003). Photoliberating inositol-1,4,5-trisphosphate triggers ATP release that is blocked by the connexin mimetic peptide gap 26. En *Cell Calcium* (Vol. 33, Número 1, pp. 37-48). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/S0143-4160(02)00180-X
- Brown, L. S., Foster, C. G., Courtney, J. M., King, N. E., Howells, D. W., & Sutherland, B. A. (2019). Pericytes and neurovascular function in the healthy and diseased brain. En Frontiers in Cellular Neuroscience (Vol. 13). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00282
- Bruzzone, R., Barbe, M. T., Jakob, N. J., & Monyer, H. (2005). Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in Xenopus oocytes. *Journal of Neurochemistry*, 92(5), 1033-1043. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02947.x
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., & Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(23), 13644-13649. https://doi.org/10.1073/pnas.2233464100
- Burdyga, T., & Borysova, L. (2014). Calcium signalling in pericytes. En Journal of Vascular Research (Vol. 51, Número 3, pp. 190-199). S. Karger AG. https://doi.org/10.1159/000362687
- Burns, A. R., Phillips, S. C., & Sokoya, E. M. (2012). Pannexin protein expression in the rat middle cerebral artery. *Journal of Vascular Research*, 49(2), 101-110. https://doi.org/10.1159/000332329
- Burnstock, G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. En Trends in Pharmacological Sciences (Vol. 27, Número 3 SPEC. ISS., pp. 166-176). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.01.005
- Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. En *Physiological Reviews* (Vol. 87, Número 2, pp. 659-797). Physiol Rev. https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006
- Burnstock, G. (2008). Dual control of vascular tone and remodelling by ATP released from nerves and endothelial cells. *Pharmacological Reports* : *PR*, 60(1), 12-20.
- Burnstock, G. (2017). Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. En Circulation Research (Vol. 120, Número 1, pp. 207-228). Lippincott Williams and Wilkins. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309726
- Burra, S., & Jiang, J. X. (2009). Connexin 43 hemichannel opening associated with Prostaglandin E2 release is adaptively regulated by mechanical stimulation. *Communicative and Integrative Biology*, 2(3), 239-240. https://doi.org/10.4161/cib.2.3.8154
- Bushong, E. A., Martone, M. E., & Ellisman, M. H. (2004). Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 22(2), 73-86. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2003.12.008
- Bynoe, M. S., Viret, C., Yan, A., & Kim, D. G. (2015). Adenosine receptor signaling: A key to opening the blood-brain door. En *Fluids and Barriers of the CNS* (Vol. 12, Número 1, p. 20). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12987-015-0017-7
- Cai, C., Fordsmann, J. C., Jensen, S. H., Gesslein, B., Lønstrup, M., Hald, B. O., Zambach, S. A., Brodin, B., & Lauritzen, M. J. (2018). Stimulationinduced increases in cerebral blood flow and local capillary vasoconstriction depend on conducted vascular responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(25), E5796-E5804. https://doi.org/10.1073/pnas.1707702115
- Carman, A. J., Mills, J. H., Krenz, A., Kim, D. G., & Bynoe, M. S. (2011). Adenosine receptor signaling modulates permeability of the blood-brain barrier. *Journal of Neuroscience*, 31(37), 13272-13280. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3337-11.2011

- Carneiro, I., Timóteo, M. A., Silva, I., Vieira, C., Baldaia, C., Ferreirinha, F., Silva-Ramos, M., & Correia-De-Sá, P. (2014). Activation of P2Y6 receptors increases the voiding frequency in anaesthetized rats by releasing ATP from the bladder urothelium. *British Journal of Pharmacology*, 171(14), 3404-3419. https://doi.org/10.1111/bph.12711
- Cauli, B., Tong, X. K., Rancillac, A., Serluca, N., Lambolez, B., Rossier, J., & Hamel, E. (2004). Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: Relays for subcortical vasoactive pathways. *Journal of Neuroscience*, 24(41), 8940-8949. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3065-04.2004
- Cea, L. A., Cisterna, B. A., Puebla, C., Frank, M., Figueroa, X. F., Cardozo, C., Willecke, K., Latorre, R., & Sáez, J. C. (2013). De novo expression of connexin hemichannels in denervated fast skeletal muscles leads to atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), 16229-16234. https://doi.org/10.1073/pnas.1312331110
- Cenedese, V., De Graaff, W., Csikós, T., Poovayya, M., Zoidl, G., & Kamermans, M. (2017). Pannexin 1 is critically involved in feedback from horizontal cells to cones. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00403
- Chakravarthy, U., Gardiner, T. A., Anderson, P., Archer, D. B., & Trimble, E. R. (1992). The effect of endothelin 1 on the retinal microvascular pericyte. *Microvascular Research*, 43(3), 241-254. https://doi.org/10.1016/0026-2862(92)90022-H
- Chakravarthy, U., Hayes, R. G., Stitt, A. W., & Douglas, A. (1997). Endothelin expression in ocular tissues of diabetic and insulin-treated rats. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 38(10), 2144-2151.
- Chasseigneaux, S., Moraca, Y., Cochois-Guégan, V., Boulay, A. C., Gilbert, A., Le Crom, S., Blugeon, C., Firmo, C., Cisternino, S., Laplanche, J. L., Curis, E., Declèves, X., & Saubaméa, B. (2018). Isolation and differential transcriptome of vascular smooth muscle cells and mid-capillary pericytes from the rat brain. *Scientific Reports*, 8(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-30739-5
- Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski, E. R., Armstrong, A. J., Penuela, S., Laird, D. W., Salvesen, G. S., Isakson, B. E., Bayliss, D. A., & Ravichandran, K. S. (2010). Pannexin 1 channels mediate «find-me» signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, 467(7317), 863-867. https://doi.org/10.1038/nature09413
- Cheung, G., Bataveljic, D., Visser, J., Kumar, N., Moulard, J., Dallérac, G., Mozheiko, D., Rollenhagen, A., Ezan, P., Mongin, C., Chever, O., Bemelmans, A.-P., Lübke, J., Leray, I., & Rouach, N. (2022). Physiological synaptic activity and recognition memory require astroglial glutamine. *Nature Communications*, 13(1), 753. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28331-7
- Cheung, G., Chever, O., & Rouach, N. (2014). Connexons and pannexons: Newcomers in neurophysiology. En Frontiers in Cellular Neuroscience (Vol. 8, Número November, pp. 1-19). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00348
- Chever, O., Dossi, E., Pannasch, U., Derangeon, M., & Rouach, N. (2016). Astroglial networks promote neuronal coordination. *Science Signaling*, 9(410). https://doi.org/10.1126/scisignal.aad3066
- Chever, O., Lee, C. Y., & Rouach, N. (2014). Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. Journal of Neuroscience, 34(34), 11228-11232. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0015-14.2014
- Chiu, Y. H., Jin, X., Medina, C. B., Leonhardt, S. A., Kiessling, V., Bennett, B. C., Shu, S., Tamm, L. K., Yeager, M., Ravichandran, K. S., & Bayliss, D. A. (2017). A quantized mechanism for activation of pannexin channels. *Nature Communications*, 8. https://doi.org/10.1038/ncomms14324
- Chiu, Y.-H., Medina, C. B., Doyle, C. A., Zhou, M., Narahari, A. K., Sandilos, J. K., Gonye, E. C., Gao, H.-Y., Guo, S. Y., Parlak, M., Lorenz, U. M., Conrads, T. P., Desai, B. N., Ravichandran, K. S., & Bayliss, D. A. (2021). Deacetylation as a receptor-regulated direct activation switch for pannexin channels. *Nature Communications*, 12(1), 4482. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24825-y
- Cisneros-Mejorado, A., Gottlieb, M., Cavaliere, F., Magnus, T., Koch-Nolte, F., Scemes, E., Pérez-Samartín, A., & Matute, C. (2015). Blockade of P2X7 receptors or pannexin-1 channels similarly attenuates postischemic damage. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(5), 843-850. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.262
- Cohen, Z., Molinatti, G., & Hamel, E. (1997). Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 17(8), 894-904. https://doi.org/10.1097/00004647-199708000-00008
- Condorelli, D. F., Parenti, R., Spinella, F., Salinaro, A. T., Belluardo, N., Cardile, V., & Cicirata, F. (1998). Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *European Journal of Neuroscience*, 10(3), 1202-1208. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00163.x
- Connors, B. W., & Long, M. A. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. En *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 27, pp. 393-418). Annu Rev Neurosci. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131128
- Contreras, J. E., Sánchez, H. A., Eugenin, E. A., Speidel, D., Theis, M., Willecke, K., Bukauskas, F. F., Bennett, M. V. L., & Sáez, J. C. (2002). Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 495-500. https://doi.org/10.1073/pnas.012589799
- Contreras, J. E., Sánchez, H. A., Véliz, L. P., Bukauskas, F. F., Bennett, M. V. L., & Sáez, J. C. (2004). Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. *Brain Research Reviews*, 47(1-3), 290-303. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.08.002
- Coomber, B. L., & Stewart, P. A. (1985). Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvascular Research*, 30(1), 99-115. https://doi.org/10.1016/0026-2862(85)90042-1

- Correale, J., & Villa, A. (2009). Cellular elements of the blood-brain barrier. En *Neurochemical Research* (Vol. 34, Número 12, pp. 2067-2077). Neurochem Res. https://doi.org/10.1007/s11064-009-0081-y
- Cotrina, M. L., Lin, J. H. C., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C. C. G., & Nedergaard, M. (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15735-15740. https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15735
- Crawford, C., Kennedy-Lydon, T., Sprott, C., Desai, T., Sawbridge, L., Munday, J., Unwin, R. J., Wildman, S. S. P., & Peppiatt-Wildman, C. M. (2012). An intact kidney slice model to investigate vasa recta properties and function in situ. *Nephron - Physiology*, 120(3), p17. https://doi.org/10.1159/000339110
- Cuervo, H., Pereira, B., Nadeem, T., Lin, M., Lee, F., Kitajewski, J., & Lin, C.-S. (2017). PDGFRβ-P2A-CreER(T2) mice: a genetic tool to target pericytes in angiogenesis. *Angiogenesis*, 20(4), 655-662. https://doi.org/10.1007/s10456-017-9570-9
- Cuevas, P., Gutierrez-Diaz, J. A., Reimers, D., Dujovny, M., Diaz, F. G., & Ausman, J. I. (1984). Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. Anatomy and Embryology, 170(2), 155-159. https://doi.org/10.1007/BF00319000
- Dahl, G. (2015). ATP release through pannexon channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1672), 1-11. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0191
- Dai, M., Nuttall, A., Yang, Y., & Shi, X. (2009). Visualization and contractile activity of cochlear pericytes in the capillaries of the spiral ligament. *Hearing research*, 254(1-2), 100–107. https://doi.org/10.1016/j.heares.2009.04.018
- Dailey, M. E., Marrs, G. S., & Kurpius, D. (2011). Maintaining live cells and tissue slices in the imaging setup. Cold Spring Harbor Protocols, 2011(4), pdb.top105. https://doi.org/10.1101/pdb.top105
- Dalkara, T., & Alarcon-Martinez, L. (2015). Cerebral microvascular pericytes and neurogliovascular signaling in health and disease. En Brain Research (Vol. 1623, pp. 3-17). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.03.047
- Dalkara, T., Gursoy-Ozdemir, Y., & Yemisci, M. (2011). Brain microvascular pericytes in health and disease. En Acta Neuropathologica (Vol. 122, Número 1, pp. 1-9). Acta Neuropathol. https://doi.org/10.1007/s00401-011-0847-6
- Damisah, E. C., Hill, R. A., Tong, L., Murray, K. N., & Grutzendler, J. (2017). A fluoro-Nissl dye identifies pericytes as distinct vascular mural cells during in vivo brain imaging. *Nature Neuroscience*, 20(7), 1023-1032. https://doi.org/10.1038/nn.4564
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7(1). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412
- Dauphin, F., & MacKenzie, E. T. (1995). Cholinergic and vasoactive intestinal polypeptidergic innervation of the cerebral arteries. *Pharmacology & Therapeutics*, 67(3), 385-417. <u>https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)00022-4</u>
- Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, Pollock DM, Webb DJ, Maguire JJ. Endothelin. Pharmacol Rev. 2016 Apr;68(2):357-418. doi: 10.1124/pr.115.011833. Review.
- De Bock, M., Culot, M., Wang, N., Bol, M., Decrock, E., De Vuyst, E., Da Costa, A., Dauwe, I., Vinken, M., Simon, A. M., Rogiers, V., De Ley, G., Evans, W. H., Bultynck, G., Dupont, G., Cecchelli, R., & Leybaert, L. (2011). Connexin channels provide a target to manipulate brain endothelial calcium dynamics and blood-brain barrier permeability. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(9), 1942-1957. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.86
- De Mazière, A. M., Hage, W. J., & Ubbels, G. A. (1996). A method for staining of cell nuclei in Xenopus laevis embryos with cyanine dyes for wholemount confocal laser scanning microscopy. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 44(4), 399-402. <u>https://doi.org/10.1177/44.4.8601700</u>
- De Vuyst, E., Wang, N., Decrock, E., De Bock, M., Vinken, M., Van Moorhem, M., Lai, C., Culot, M., Rogiers, V., Cecchelli, R., Naus, C. C., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2009). Ca(2+) regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell calcium*, 46(3), 176–187. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.07.002
- Decrock, E., Vinken, M., De Vuyst, E., Krysko, D. V., D'Herde, K., Vanhaecke, T., Vandenabeele, P., Rogiers, V., & Leybaert, L. (2009). Connexinrelated signaling in cell death: To live or let die? En Cell Death and Differentiation (Vol. 16, Número 4, pp. 524-536). Cell Death Differ. https://doi.org/10.1038/cdd.2008.196
- Del Zoppo, G. J., Milner, R., Mabuchi, T., Hung, S., Wang, X., & Koziol, J. A. (2006). Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. Biochemical Society Transactions, 34(6), 1261-1266. <u>https://doi.org/10.1042/BST0341261</u>
- Dermietzel, R., Hertberg, E. L., Kessler, J. A., & Spray, D. C. (1991). Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 11(5), 1421–1432. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-05-01421.1991
- De Lalio, L. J., Billaud, M., Ruddiman, C. A., Johnstone, S. R., Butcher, J. T., Wolpe, A. G., Jin, X., Keller, T. C. S. 4th, Keller, A. S., Rivière, T., Good, M. E., Best, A. K., Lohman, A. W., Swayne, L. A., Penuela, S., Thompson, R. J., Lampe, P. D., Yeager, M., & Isakson, B. E. (2019). Constitutive SRC-mediated phosphorylation of pannexin 1 at tyrosine 198 occurs at the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(17), 6940-6956. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006982

- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Madrid, J. F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., Martín-Vasallo, P., & Díaz-Flores, J. (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. En *Histology and Histopathology* (Vol. 24, Número 7, pp. 909-969). Histol Histopathol. https://doi.org/10.14670/HH-24.909
- Dietrich, H. H., Kajita, Y., & Dacey, R. G. (1996). Local and conducted vasomotor responses in isolated rat cerebral arterioles. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 271(3 40-3). https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.271.3.h1109
- Domoki, F., Kis, B., Gáspár, T., Bari, F., & Busija, D. W. (2008). Cerebromicrovascular endothelial cells are resistant to L-glutamate. American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 295(4). https://doi.org/10.1152/ajpregu.90430.2008
- Donnelly-Roberts, D. L., Namovic, M. T., Surber, B., Vaidyanathan, S. X., Perez-Medrano, A., Wang, Y., Carroll, W. A., & Jarvis, M. F. (2009). [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. *Neuropharmacology*, 56(1), 223-229. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.012
- Dore-Duffy, P. (2008). Pericytes: Pluripotent Cells of the Blood Brain Barrier. Current Pharmaceutical Design, 14(16), 1581-1593. https://doi.org/10.2174/138161208784705469
- Drewes, L. R. (2012). Making connexons in the neurovascular unit. En Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism (Vol. 32, Número 8, pp. 1455-1456). J Cereb Blood Flow Metab. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.44
- Duchemin, S., Boily, M., Sadekova, N., & Girouard, H. (2012). The complex contribution of NOS interneurons in the physiology of cerebrovascular regulation. En Frontiers in Neural Circuits (Vol. 6, Número AUGUST 2012). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00051
- Dunwiddie, T V, & Masino, S. A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 31-55. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.31
- Dunwiddie, Thomas V., Diao, L., Kim, H. O., Jiang, J. L., & Jacobson, K. A. (1997). Activation of hippocampal adenosine A3 receptors produces a desensitization of A1 receptor-mediated responses in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 17(2), 607-614. https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-02-00607.1997
- Durham, J. T., Surks, H. K., Dulmovits, B. M., & Herman, I. M. (2014). Pericyte contractility controls endothelial cell cycle progression and sprouting: insights into angiogenic switch mechanics. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 307(9), C878-92. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00185.2014
- Dvoriantchikova, G., Ivanov, D., Barakat, D., Grinberg, A., Wen, R., Slepak, V. Z., & Shestopalov, V. I. (2012). Genetic ablation of Pannexin1 protects retinal neurons from ischemic injury. *PloS One*, 7(2), e31991. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031991
- Elfont, R. M., Sundaresan, P. R., & Sladek, C. D. (1989). Adrenergic receptors on cerebral microvessels: pericyte contribution. *The American Journal* of *Physiology*, 256(1 Pt 2), R224-30. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.256.1.R224
- Emerson, G. G., & Segal, S. S. (2000). Endothelial cell pathway for conduction of hyperpolarization and vasodilation along hamster feed artery. *Circulation Research*, 86(1), 94-100. https://doi.org/10.1161/01.RES.86.1.94
- Erdener, Ş. E., Küreli, G., & Dalkara, T. (2022). Contractile apparatus in CNS capillary pericytes. *Neurophotonics*, 9(2), 21904. https://doi.org/10.1117/1.NPh.9.2.021904
- Errede, M., Mangieri, D., Longo, G., Girolamo, F., De Trizio, I., Vimercati, A., Serio, G., Frei, K., Perris, R., & Virgintino, D. (2018). Tunneling nanotubes evoke pericyte/endothelial communication during normal and tumoral angiogenesis. *Fluids and Barriers of the CNS*, 15(1). https://doi.org/10.1186/s12987-018-0114-5
- Eschke, D., Wüst, M., Hauschildt, S., & Nieber, K. (2002). Pharmacological characterization of the P2X(7) receptor on human macrophages using the patch-clamp technique. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 365(2), 168-171. https://doi.org/10.1007/s00210-001-0501-2
- Estrada, C., Hamel, E., & Krause, D. N. (1983). Biochemical evidence for cholinergic innervation of intracerebral blood vessels. *Brain Research*, 266(2), 261-270. https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90657-1
- Evans, W. H., De Vuyst, E., & Leybaert, L. (2006). The gap junction cellular internet: Connexin hemichannels enter the signalling limelight. En Biochemical Journal (Vol. 397, Número 1, pp. 1-14). Biochem J. https://doi.org/10.1042/BJ20060175
- Evans, W. H., De Vuyst, E., & Leybaert, L. (2006). The gap junction cellular internet: Connexin hemichannels enter the signalling limelight. En Biochemical Journal (Vol. 397, Número 1, pp. 1-14). Biochem J. https://doi.org/10.1042/BJ20060175
- Ezan, P., André, P., Cisternino, S., Saubaméa, B., Boulay, A. C., Doutremer, S., Thomas, M. A., Quenech'Du, N., Giaume, C., & Cohen-Salmon, M. (2012). Deletion of astroglial connexins weakens the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(8), 1457-1467. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.45
- Fabbiani, G., Reali, C., Valentín-Kahan, A., Rehermann, M. I., Fagetti, J., Falco, M. V., & Russo, R. E. (2020). Connexin signaling is involved in the reactivation of a latent stem cell niche after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 40(10), 2246-2258. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2056-19.2020
- Farahani, R. M., Rezaei-Lotfi, S., Simonian, M., Xaymardan, M., & Hunter, N. (2019). Neural microvascular pericytes contribute to human adult neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 527(4), 780-796. https://doi.org/10.1002/cne.24565
- Fernández-Klett, F., & Priller, J. (2015). Diverse functions of pericytes in cerebral blood flow regulation and ischemia. En Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism (Vol. 35, Número 6, pp. 883-887). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.60

- Fernández-Klett, F., Offenhauser, N., Dirnagl, U., Priller, J., & Lindauer, U. (2010). Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(51), 22290-22295. https://doi.org/10.1073/pnas.1011321108
- Figueroa, X. F., & Duling, B. R. (2009). Gap junctions in the control of vascular function. En Antioxidants and Redox Signaling (Vol. 11, Número 2, pp. 251-266). https://doi.org/10.1089/ars.2008.2117
- Figueroa, X. F., Isakson, B. E., & Duling, B. R. (2004). Connexins: Gaps in our knowledge of vascular function. En *Physiology* (Vol. 19, Número 5, pp. 277-284). American Physiological Society. https://doi.org/10.1152/physiol.00008.2004
- Filosa, J. A., Morrison, H. W., Iddings, J. A., Du, W., & Kim, K. J. (2016). Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. En *Neuroscience* (Vol. 323, pp. 96-109). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.064
- Filosa, Jessica A., & Iddings, J. A. (2013). Astrocyte regulation of cerebral vascular tone. En American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology (Vol. 305, Número 5). Am J Physiol Heart Circ Physiol. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00359.2013
- Filosa, Jessica A., Bonev, A. D., Straub, S. V., Meredith, A. L., Wilkerson, M. K., Aldrich, R. W., & Nelson, M. T. (2006). Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nature Neuroscience*, 9(11), 1397-1403. https://doi.org/10.1038/nn1779
- Filosa. (2010). Vascular tone and neurovascular coupling: considerations toward an improved in vitro model. Frontiers in Neuroenergetics, 2. https://doi.org/10.3389/fnene.2010.00016
- Flores-Muñoz, C., García-Rojas, F., Perez, M. A., Santander, O., Mery, E., Lopez-Espíndola, D., Gonzalez-Jamett, A. M., Fuenzalida, M., Martinez, A. D., & Ardiles, Á. O. (2021). Long-term Pannexin 1 ablation promotes structural and functional modifications in hippocampal neurons through the regulation of actin cytoskeleton and Rho GTPases activity. *bioRxiv*, 2021.11.03.467134. https://doi.org/10.1101/2021.11.03.467134
- Frank, R. N., Dutta, S., & Mancini, M. A. (1987). Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 28(7), 1086-1091. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3596989/
- Freire, D., Reyes, R. E., Baghram, A., Davies, D. L., & Asatryan, L. (2019). P2X7 Receptor Antagonist A804598 Inhibits Inflammation in Brain and Liver in C57BL/6J Mice Exposed to Chronic Ethanol and High Fat Diet. *Journal of Neuroimmune Pharmacology : The Official Journal of the* Society on NeuroImmune Pharmacology, 14(2), 263-277. https://doi.org/10.1007/s11481-018-9816-3
- Frick, K. M., & Gresack, J. E. (2003). Sex differences in the behavioral response to spatial and object novelty in adult C57BL/6 mice. Behavioral Neuroscience, 117(6), 1283-1291. https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.6.1283
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376. https://doi.org/10.1038/288373a0
- Gabriels, J. E., & Paul, D. L. (1998). Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed. *Circulation Research*, 83(6), 636-643. https://doi.org/10.1161/01.RES.83.6.636
- Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A., & Betsholtz, C. (2009). Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. En Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (Vol. 29, Número 5, pp. 630-638). Arterioscler Thromb Vasc Biol. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.161521
- Gaete, P. S., Lillo, M. A., & Figueroa, X. F. (2014). Functional role of connexins and pannexins in the interaction between vascular and nervous system. *Journal of Cellular Physiology*, 229(10), 1336-1345. https://doi.org/10.1002/jcp.24563
- Gaete, P. S., Lillo, M. A., Puebla, M., Poblete, I., & Figueroa, X. F. (2019). CGRP signalling inhibits NO production through pannexin-1 channel activation in endothelial cells. *Scientific Reports*, 9(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-44333-w
- Gajardo, I., Salazar, C. S., Lopez-Espíndola, D., Estay, C., Flores-Muñoz, C., Elgueta, C., Gonzalez-Jamett, A. M., Martínez, A. D., Muñoz, P., & Ardiles, Á. O. (2018). Lack of Pannexin 1 Alters Synaptic GluN2 Subunit Composition and Spatial Reversal Learning in Mice. Frontiers in Molecular Neuroscience, 11, 114. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00114
- Garré, J. M., Retamal, M. A., Cassina, P., Barbeito, L., Bukauskas, F. F., Sáez, J. C., Bennett, M. V. L., & Abudara, V. (2010). FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of* the United States of America, 107(52), 22659-22664. https://doi.org/10.1073/pnas.1013793107
- Garré, Juan Mauricio, Silva, H. M., Lafaille, J. J., & Yang, G. (2020). P2X7 receptor inhibition ameliorates dendritic spine pathology and social behavioral deficits in Rett syndrome mice. *Nature Communications*, 11(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-15590-5
- Garthwaite, J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. En *European Journal of Neuroscience* (Vol. 27, Número 11, pp. 2783-2802). Eur J Neurosci. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x
- Gaynullina, D. K., Schubert, R., & Tarasova, O. S. (2019). Changes in Endothelial Nitric Oxide Production in Systemic Vessels during Early Ontogenesis-A Key Mechanism for the Perinatal Adaptation of the Circulatory System. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). https://doi.org/10.3390/ijms20061421
- Gaynullina, D., Shestopalov, V. I., Panchin, Y., & Tarasova, O. S. (2015). Pannexin 1 facilitates arterial relaxation via an endothelium-derived hyperpolarization mechanism. *FEBS Letters*, *589*(10), 1164-1170. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.03.018
- Giannoni, P., Badaut, J., Dargazanli, C., De Maudave, A. F. H., Klement, W., Costalat, V., & Marchi, N. (2018). The pericyte-glia interface at the blood-brain barrier. En *Clinical Science* (Vol. 132, Número 3, pp. 361-374). Portland Press Ltd. https://doi.org/10.1042/CS20171634

- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., & Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature reviews. Neuroscience*, 11(2), 87–99. https://doi.org/10.1038/nrn2757
- Giaume, C., Orellana, J. A., Abudara, V., & Sáez, J. C. (2012). Connexin-based channels in astrocytes: How to study their properties. Methods in Molecular Biology, 814, 283-303. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0 19
- Girouard, H., Bonev, A. D., Hannah, R. M., Meredith, A., Aldrich, R. W., & Nelson, M. T. (2010). Astrocytic endfoot Ca2+ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3811-3816. https://doi.org/10.1073/pnas.0914722107
- Gödecke, S., Roderigo, C., Rose, C. R., Rauch, B. H., Gödecke, A., & Schrader, J. (2012). Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 302(6). <u>https://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2010</u>
- Gonzales, A. L., Klug, N. R., Moshkforoush, A., Lee, J. C., Lee, F. K., Shui, B., Tsoukias, N. M., Kotlikoff, M. I., Hill-Eubanks, D., & Nelson, M. T. (2020). Contractile pericytes determine the direction of blood flow at capillary junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(43), 27022–27033. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1922755117</u>
- Good, M. E., Eucker, S. A., Li, J., Bacon, H. M., Lang, S. M., Butcher, J. T., Johnson, T. J., Gaykema, R. P., Patel, M. K., Zuo, Z., & Isakson, B. E. (2018). Endothelial cell Pannexin1 modulates severity of ischemic stroke by regulating cerebral inflammation and myogenic tone. *JCI Insight*, 3(6). https://doi.org/10.1172/jci.insight.96272
- Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(4), 285–294. https://doi.org/10.1038/nrm1072
- Gordon, G. R. J., Choi, H. B., Rungta, R. L., Ellis-Davies, G. C. R., & MacVicar, B. A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*, 456(7223), 745-750. https://doi.org/10.1038/nature07525
- Gordon, G. R. J., Howarth, C., & Macvicar, B. A. (2011). Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Experimental Physiology*, 96(4), 393-399. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.053132
- Gosejacob, D., Dublin, P., Bedner, P., Hüttmann, K., Zhang, J., Tress, O., Willecke, K., Pfrieger, F., Steinhäuser, C., & Theis, M. (2011). Role of astroglial connexin30 in hippocampal gap junction coupling. *GLIA*, 59(3), 511-519. https://doi.org/10.1002/glia.21120
- Grammas, P. (2000). A damaged microcirculation contributes to neuronal cell death in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 21(2), 199-205. https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00102-0
- Grant, R. I., Hartmann, D. A., Underly, R. G., Berthiaume, A. A., Bhat, N. R., & Shih, A. Y. (2019). Organizational hierarchy and structural diversity of microvascular pericytes in adult mouse cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(3), 411-425. https://doi.org/10.1177/0271678X17732229
- Grutzendler, J., & Nedergaard, M. (2019). Cellular Control of Brain Capillary Blood Flow: In Vivo Imaging Veritas. En Trends in Neurosciences (Vol. 42, Número 8, pp. 528-536). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.05.009
- Haddock, R. E., Grayson, T. H., Brackenbury, T. D., Meaney, K. R., Neylon, C. B., Sandow, S. L., & Hill, C. E. (2006). Endothelial coordination of cerebral vasomotion via myoendothelial gap junctions containing connexins 37 and 40. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 291(5). https://doi.org/10.1152/ajpheart.00484.2006
- Haefliger, I. O., Zschauer, A., & Anderson, D. R. (1994). Relaxation of retinal pericyte contractile tone through the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(3), 991–997.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science (New York, N.Y.), 279(5350), 509-514. https://doi.org/10.1126/science.279.5350.509
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., Oâ Farrell, F. M., Buchan, A. M., Lauritzen, M., & Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(1), 55-60. https://doi.org/10.1038/nature13165
- Hamel, E. (2004). Cholinergic modulation of the cortical microvascular bed. Progress in Brain Research, 145, 171-178. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)45012-7
- Hamilton, N. B. (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. Frontiers in Neuroenergetics, 2. https://doi.org/10.3389/fnene.2010.00005
- Hariharan, A., Robertson, C. D., Garcia, D. C. G., & Longden, T. A. (2022). Brain Capillary Pericytes are Metabolic Sentinels that Control Blood Flow through K<sub&gt;ATP&lt;/sub&gt; Channel Activity. *bioRxiv*, 2022.03.14.484304. https://doi.org/10.1101/2022.03.14.484304
- Hariharan, A., Weir, N., Robertson, C., He, L., Betsholtz, C., & Longden, T. A. (2020). The Ion Channel and GPCR Toolkit of Brain Capillary Pericytes. Frontiers in Cellular Neuroscience, 14, 601324. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.601324
- Hartmann, D. A., Berthiaume, A.-A., Grant, R. I., Harrill, S. A., Koski, T., Tieu, T., McDowell, K. P., Faino, A. V, Kelly, A. L., & Shih, A. Y. (2021). Brain capillary pericytes exert a substantial but slow influence on blood flow. *Nature Neuroscience*, 24(5), 633-645. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00793-2
- Hartmann, D. A., Underly, R. G., Grant, R. I., Watson, A. N., Lindner, V., & Shih, A. Y. (2015). Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice. *Neurophotonics*, 2(4), 041402. https://doi.org/10.1117/1.nph.2.4.041402

- Hashimoto, T., Kiya, M., Ohata, H., Miyazaki, T., Shibata, K., Nobe, K., & Honda, K. (2012). Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the middle cerebral artery isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Experimental Physiology*, 97(2), 265-276. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.061499
- Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. En *Pharmacological Reviews* (Vol. 57, Número 2, pp. 173-185). Pharmacol Rev. https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4
- He, L., Vanlandewijck, M., Mäe, M. A., Andrae, J., Ando, K., Gaudio, F. Del, Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., Sun, Y., Raschperger, E., Segerstolpe, Å., Liu, J., Gustafsson, S., Räsänen, M., Zarb, Y., Mochizuki, N., Keller, A., ... Betsholtz, C. (2018). Data descriptor: Singlecell RNA sequencing of mouse brain and lung vascular and vessel-associated cell types. *Scientific Data*, 5. https://doi.org/10.1038/sdata.2018.160
- He, L., Vanlandewijck, M., Raschperger, E., Andaloussi Maë, M., Jung, B., Lebouvier, T., Ando, K., Hofmann, J., Keller, A., & Betsholtz, C. (2016). Analysis of the brain mural cell transcriptome. *Scientific Reports*, 6. https://doi.org/10.1038/srep35108
- Helbig, H., Kornacker, S., Berweck, S., Stahl, F., Lepple-Wienhues, A., & Wiederholt, M. (1992). Membrane potentials in retinal capillary pericytes: Excitability and effect of vasoactive substances. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 33(7), 2105-2112. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1318866/
- Hill, C. E., Rummery, N., Hickey, H., & Sandow, S. L. (2002). Heterogeneity in the distribution of vascular gap junctions and connexins: Implications for function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29(7), 620-625. https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03699.x
- Hill, R. A., & Grutzendler, J. (2019). Uncovering the biology of myelin with optical imaging of the live brain. En GLIA (Vol. 67, Número 11, pp. 2008-2019). John Wiley and Sons Inc. <u>https://doi.org/10.1002/glia.23635</u>
- Hill RA, Tong L, Yuan P, Murikinati S, Gupta S, Grutzendler J. Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. Neuron. 2015 Jul 1;87(1):95-110. doi: 10.1016/j.neuron.2015.06.001. Epub 2015 Jun 25. PMID: 26119027; PMCID: PMC4487786.
- Hogan-Cann, A. D., Lu, P., & Anderson, C. M. (2019). Endothelial NMDA receptors mediate activity-dependent brain hemodynamic responses in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(21), 10229-10231. https://doi.org/10.1073/pnas.1902647116
- Hørlyck, S., Cai, C., Helms, H. C. C., Lauritzen, M., & Brodin, B. (2021). ATP induces contraction of cultured brain capillary pericytes via activation of P2Y-type purinergic receptors. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 320(2), H699-H712. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00560.2020
- Huang, C., Han, X., Li, X., Lam, E., Peng, W., Lou, N., Torres, A., Yang, M., Garre, J. M., Tian, G. F., Bennett, M. V. L., Nedergaard, M., & Takano, T. (2012). Critical role of connexin 43 in secondary expansion of traumatic spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 32(10), 3333-3338. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1216-11.2012
- Huang, Y., Grinspan, J. B., Abrams, C. K., & Scherer, S. S. (2007). Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional gap junctions. GLIA, 55(1), 46-56. https://doi.org/10.1002/glia.20435
- Hung, S.-C., Choi, C. H., Said-Sadier, N., Johnson, L., Atanasova, K. R., Sellami, H., Yilmaz, Ö., & Ojcius, D. M. (2013). P2X4 assembles with P2X7 and pannexin-1 in gingival epithelial cells and modulates ATP-induced reactive oxygen species production and inflammasome activation. *PloS* One, 8(7), e70210. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070210
- Iadecola, C. (1993). Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? Trends in Neurosciences, 16(6), 206-214. https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90156-G
- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. En Neuron (Vol. 96, Número 1, pp. 17-42). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030
- Iglesias, R, Locovei, S., Roque, A., Alberto, A. P., Dahl, G., Spray, D. C., & Scemes, E. (2008). P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 295(3), C752-60. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00228.2008
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D. C., & Scemes, E. (2009). Pannexin 1: The molecular substrate of astrocyte «hemichannels». Journal of Neuroscience, 29(21), 7092-7097. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6062-08.2009
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D. C., & Scemes, E. (2009). Pannexin 1: The molecular substrate of astrocyte «hemichannels». Journal of Neuroscience, 29(21), 7092-7097. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6062-08.2009
- Isakson, B. E., & Thompson, R. J. (2014). Pannexin-1 as a potentiator of ligand-gated receptor signaling. En Channels (Vol. 8, Número 2, pp. 118-123). Taylor and Francis Inc. https://doi.org/10.4161/chan.27978
- Isasi, E., Korte, N., Abudara, V., Attwell, D., & Olivera-Bravo, S. (2019). Glutaric Acid Affects Pericyte Contractility and Migration: Possible Implications for GA-I Pathogenesis. *Molecular Neurobiology*, 56(11), 7694-7707. https://doi.org/10.1007/s12035-019-1620-4
- Itakura, T., Yamamoto, K., Tohyama, M., & Shimizu, N. (1977). Central dual innervation of arterioles and capillaries in the brain. *Stroke*, 8(3), 360-365. https://doi.org/10.1161/01.str.8.3.360
- Ivanova, E., Kovacs-Oller, T., & Sagdullaev, B. T. (2017). Vascular pericyte impairment and connexin43 gap junction deficit contribute to vasomotor decline in diabetic retinopathy. *Journal of Neuroscience*, 37(32), 7580-7594. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0187-17.2017

- Ivanova, E., Kovacs-Oller, T., & Sagdullaev, B. T. (2019). Domain-specific distribution of gap junctions defines cellular coupling to establish a vascular relay in the retina. *Journal of Comparative Neurology*, 527(16), 2675-2693. https://doi.org/10.1002/cne.24699
- Jaglin, X. H., Hjerling-Leffler, J., Fishell, G., & Batista-Brito, R. (2012). The origin of neocortical nitric oxide synthase-expressing inhibitory neurons. Frontiers in Neural Circuits, 6(JULY 2012), 44. https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00044
- Jansson, D., Rustenhoven, J., Feng, S., Hurley, D., Oldfield, R. L., Bergin, P. S., Mee, E. W., Faull, R. L. M., & Dragunow, M. (2014). A role for human brain pericytes in neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 11. https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-104
- Johnstone, S. R., Billaud, M., Lohman, A. W., Taddeo, E. P., & Isakson, B. E. (2012). Posttranslational modifications in connexins and pannexins. Journal of Membrane Biology, 245(5-6), 319-332. https://doi.org/10.1007/s00232-012-9453-3
- Jung, B., Arnold, T. D., Raschperger, E., Gaengel, K., & Betsholtz, C. (2018). Visualization of vascular mural cells in developing brain using genetically labeled transgenic reporter mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 38(3), 456-468. https://doi.org/10.1177/0271678X17697720
- Kagansky, N., Levy, S., & Knobler, H. (2001). The role of hyperglycemia in acute stroke. En Archives of Neurology (Vol. 58, Número 8, pp. 1209-1212). American Medical Association. https://doi.org/10.1001/archneur.58.8.1209
- Kam, Y., Kim, D. Y., Koo, S. K., & Joe, C. O. (1998). Transfer of second messengers through gap junction connexin 43 channels reconstituted in liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1372(2), 384-388. https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00075-3
- Kamermans, M., Fahrenfort, I., Schultz, K., Janssen-Bienhold, U., Sjoerdsma, T., & Weiler, R. (2001). Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. Science, 292(5519), 1178-1180. https://doi.org/10.1126/science.1060101
- Kamouchi, M., Kitazono, T., Ago, T., Wakisaka, M., Ooboshi, H., Ibayashi, S., & Iida, M. (2004). Calcium influx pathways in rat CNS pericytes. Molecular Brain Research, 126(2), 114-120. https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.03.008
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., & Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. Journal of Neuroscience, 28(18), 4702-4711. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008
- Kauffenstein, G., Tamareille, S., Prunier, F., Roy, C., Ayer, A., Toutain, B., Billaud, M., Isakson, B. E., Grimaud, L., Loufrani, L., Rousseau, P., Abraham, P., Procaccio, V., Monyer, H., de Wit, C., Boeynaems, J. M., Robaye, B., Kwak, B. R., & Henrion, D. (2016). Central Role of P2Y6 UDP Receptor in Arteriolar Myogenic Tone. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *36*(8), 1598–1606. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307739
- Kawamura, H., Kobayashi, M., Li, Q., Yamanishi, S., Katsumura, K., Minami, M., Wu, D. M., & Puro, D. G. (2004). Effects of angiotensin II on the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *Journal of Physiology*, 561(3), 671-683. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.073098
- Kawamura, H., Sugiyama, T., Wu, D. M., Kobayashi, M., Yamanishi, S., Katsumura, K., & Puro, D. G. (2003). ATP: A vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. En *Journal of Physiology* (Vol. 551, Número 3, pp. 787-799). J Physiol. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.047977
- Kawamura, M. J., Ruskin, D. N., & Masino, S. A. (2010). Metabolic autocrine regulation of neurons involves cooperation among pannexin hemichannels, adenosine receptors, and KATP channels. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(11), 3886-3895. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0055-10.2010
- Kelley, C., D'Amore, P., Hechtman, H. B., & Shepro, D. (1987). Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall. *The Journal of Cell Biology*, 104(3), 483-490. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.104.3.483</u>
- Kiec-Wilk, B., Czech, U., Janczarska, K., Knapp, A., Goralska, J., Cialowicz, U., Malecki, M. T., & Dembinska-Kiec, A. (2012). Connexin 43 and metabolic effect of fatty acids in stressed endothelial cells. *Genes & nutrition*, 7(2), 257–263. https://doi.org/10.1007/s12263-011-0247-5
- Kisler, K., Nelson, A. R., Rege, S. V., Ramanathan, A., Wang, Y., Ahuja, A., Lazic, D., Tsai, P. S., Zhao, Z., Zhou, Y., Boas, D. A., Sakadžić, S., & Zlokovic, B. V. (2017). Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nature Neuroscience*, 20(3), 406-416. https://doi.org/10.1038/nn.4489
- Kisler, K., Nikolakopoulou, A. M., Sweeney, M. D., Lazic, D., Zhao, Z., & Zlokovic, B. V. (2020). Acute Ablation of Cortical Pericytes Leads to Rapid Neurovascular Uncoupling. Frontiers in cellular neuroscience, 14, 27. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00027
- Klaassen, L. J., Fahrenfort, I., & Kamermans, M. (2012). Connexin hemichannel mediated ephaptic inhibition in the retina. *Brain Research*, 1487, 25-38. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.04.059
- Koehler, R. C., Gebremedhin, D., & Harder, D. R. (2006). Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. En Journal of Applied Physiology (Vol. 100, Número 1, pp. 307-317). J Appl Physiol (1985). https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00938.2005
- Koehler, R. C., Roman, R. J., & Harder, D. R. (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. En Trends in Neurosciences (Vol. 32, Número 3, pp. 160-169). Trends Neurosci. https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.005
- Kolyada, A. Y., Riley, K. N., & Herman, I. M. (2003). Rho GTPase signaling modulates cell shape and contractile phenotype in an isoactin-specific manner. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 285(5), C1116-21. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00177.2003
- Korte, N., Nortley, R., & Attwell, D. (2020). Cerebral blood flow decrease as an early pathological mechanism in Alzheimer's disease. En Acta Neuropathologica (Vol. 140, Número 6). Springer. https://doi.org/10.1007/s00401-020-02215-w

- Koulakoff, A., Ezan, P., & Giaume, C. (2008). Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia*, 56(12), 1299–1311. https://doi.org/10.1002/glia.20698
- Kovacs-Oller, T., Ivanova, E., Bianchimano, P., & Sagdullaev, B. T. (2020) (a). The pericyte connectome: spatial precision of neurovascular coupling is driven by selective connectivity maps of pericytes and endothelial cells and is disrupted in diabetes. *Cell discovery*, 6(1), 39. <u>https://doi.org/10.1038/s41421-020-0180-0</u>
- Kovács-Öller, T., Ivanova, E., Szarka, G., Tengölics, Á. J., Völgyi, B., & Sagdullaev, B. T. (2020) (b). Imatinib Sets Pericyte Mosaic in the Retina. International Journal of Molecular Sciences, 21(7). https://doi.org/10.3390/ijms21072522
- Krueger, M., & Bechmann, I. (2010). CNS pericytes: Concepts, misconceptions, and a way out. En GLIA (Vol. 58, Número 1, pp. 1-10). Glia. <u>https://doi.org/10.1002/glia.20898</u>
- Kunzelmann, P., Schröder, W., Traub, O., Steinhäuser, C., Dermietzel, R., & Willecke, K. (1999). Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia*, 25(2), 111–119. https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(19990115)25:2<111::aid-glia2>3.0.co;2-i
- Kureli, G., Yilmaz-Ozcan, S., Erdener, S. E., Donmez-Demir, B., Yemisci, M., Karatas, H., & Dalkara, T. (2020). F-actin polymerization contributes to pericyte contractility in retinal capillaries. *Experimental Neurology*, 332. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113392
- Kutcher, M. E., Kolyada, A. Y., Surks, H. K., & Herman, I. M. (2007). Pericyte Rho GTPase mediates both pericyte contractile phenotype and capillary endothelial growth state. *The American Journal of Pathology*, 171(2), 693-701. https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070102
- Kwak, B. R., Mulhaupt, F., Veillard, N., Gros, D. B., & Mach, F. (2002). Altered Pattern of Vascular Connexin Expression in Atherosclerotic Plaques. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 22(2), 225-230. https://doi.org/10.1161/hq0102.104125
- Lacar, B., Herman, P., Platel, J. C., Kubera, C., Hyder, F., & Bordey, A. (2012). Neural progenitor cells regulate capillary blood flow in the postnatal subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, 32(46), 16435-16448. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1457-12.2012
- Lacombe, P., Sercombe, R., Verrecchia, C., Philipson, V., MacKenzie, E. T., & Seylaz, J. (1989). Cortical blood flow increases induced by stimulation of the substantia innominata in the unanesthetized rat. *Brain Research*, 491(1), 1-14. https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90083-8
- Laird, D. W., Castillo, M., & Kasprzak, L. (1995). Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin Atreated rat mammary tumor cells. *Journal of Cell Biology*, 131(5), 1193-1203. https://doi.org/10.1083/jcb.131.5.1193
- Laitinen, L. (1987). Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *The Histochemical Journal*, 19(4), 225-234. https://doi.org/10.1007/BF01680633
- Langer, J., Stephan, J., Theis, M., & Rose, C. R. (2012). Gap junctions mediate intercellular spread of sodium between hippocampal astrocytes in situ. GLIA, 60(2), 239-252. https://doi.org/10.1002/glia.21259
- Lapato, A., & Tiwari-Woodruff, S. (2017). Connexins and pannexins: At the junction of neuro-glial homeostasis & disease. *Journal of neuroscience research*, 96. https://doi.org/10.1002/jnr.24088
- Laranjinha, J., Santos, R. M., Lourenço, C. F., Ledo, A., & Barbosa, R. M. (2012). Nitric oxide signaling in the brain: Translation of dynamics into respiration control and neurovascular coupling. Annals of the New York Academy of Sciences, 1259(1), 10-18. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06582.x
- Larson, D. M., Carson, M. P., & Haudenschild, C. C. (1987). Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes. *Microvascular research*, 34(2), 184–199. https://doi.org/10.1016/0026-2862(87)90052-5
- Larson, D. M., Haudenschild, C. C., & Beyer, E. C. (1990). Gap junction messenger RNA expression by vascular wall cells. *Circulation Research*, 66(4), 1074-1080. https://doi.org/10.1161/01.RES.66.4.1074
- Lebeux, Y. J., & Willemot, J. (1978). Actin- and myosin-like filaments in rat brain pericytes. *The Anatomical Record*, 190(4), 811-826. https://doi.org/10.1002/ar.1091900404
- Lecrux, C., Sandoe, C. H., Neupane, S., Kropf, P., Toussay, X., Tong, X.-K., Lacalle-Aurioles, M., Shmuel, A., & Hamel, E. (2017). Impact of Altered Cholinergic Tones on the Neurovascular Coupling Response to Whisker Stimulation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(6), 1518-1531. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1784-16.2016
- Ledo, A., Barbosa, R. M., Gerhardt, G. A., Cadenas, E., & Laranjinha, J. (2005). Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of the NMDA glutamate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(48), 17483–17488. https://doi.org/10.1073/pnas.0503624102
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), 2531-2537. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155
- Leybaert, L. (2005). Neurobarrier coupling in the brain: A partner of neurovascular and neurometabolic coupling? En Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism (Vol. 25, Número 1, pp. 2-16). J Cereb Blood Flow Metab. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600001
- Li, A. F., Sato, T., Haimovici, R., Okamoto, T., & Roy, S. (2003). High Glucose Alters Connexin 43 Expression and Gap Junction Intercellular Communication Activity in Retinal Pericytes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(12), 5376-5382. https://doi.org/10.1167/iovs.03-0360

- Li, Q., & Puro, D. G. (2001). Adenosine activates ATP-sensitive K+ currents in pericytes of rat retinal microvessels: Role of A1 and A2a receptors. Brain Research, 907(1-2), 93-99. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02607-5
- Li, X., & Simard, J. M. (1999). Multiple Connexins Form Gap Junction Channels in Rat Basilar Artery Smooth Muscle Cells. Circulation Research, 84(11), 1277-1284. https://doi.org/10.1161/01.RES.84.11.1277
- Li, X., & Simard, J. M. (2001). Connexin45 gap junction channels in rat cerebral vascular smooth muscle cells. American Journal of Physiology -Heart and Circulatory Physiology, 281(5 50-5). https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.5.h1890
- Li, X., & Simard, J. M. (2002). Increase in Cx45 gap junction channels in cerebral smooth muscle cells from SHR. Hypertension, 40(6), 940-946. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000041882.39865.A8
- Lillo, M. A., Gaete, P. S., Puebla, M., Burboa, P. C., Poblete, I., & Figueroa, X. F. (2021). Novel Pannexin-1-Coupled Signaling Cascade Involved in the Control of Endothelial Cell Function and NO-Dependent Relaxation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2678134. https://doi.org/10.1155/2021/2678134
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P., & Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 277(5323), 242-245. https://doi.org/10.1126/science.277.5323.242
- Little, T. L., Beyer, E. C., & Duling, B. R. (1995). Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 268(2 37-2). https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.268.2.h729
- Locovei, S., Bao, L., & Dahl, G. (2006) (a). Pannexin 1 in erythrocytes: Function without a gap. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(20), 7655-7659. https://doi.org/10.1073/pnas.0601037103
- Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D. C., & Dahl, G. (2007). Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Letters*, 581(3), 483-488. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.12.056
- Locovei, S., Wang, J., & Dahl, G. (2006) (b). Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Letters*, 580(1), 239-244. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.004
- Lohman, A. W., & Isakson, B. E. (2014). Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Letters*, 588(8), 1379-1388. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.004
- Lohman, A. W., Leskov, I. L., Butcher, J. T., Johnstone, S. R., Stokes, T. A., Begandt, D., Delalio, L. J., Best, A. K., Penuela, S., Leitinger, N., Ravichandran, K. S., Stokes, K. Y., & Isakson, B. E. (2015). Pannexin 1 channels regulate leukocyte emigration through the venous endothelium during acute inflammation. *Nature Communications*, 6. https://doi.org/10.1038/ncomms8965
- Lohman, A. W., Weaver, J. L., Billaud, M., Sandilos, J. K., Griffiths, R., Straub, A. C., Penuela, S., Leitinger, N., Laird, D. W., Bayliss, D. A., & Isakson, B. E. (2012). S-nitrosylation inhibits pannexin 1 channel function. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39602-39612. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.397976
- Looft-Wilson, R. C., Billaud, M., Johnstone, S. R., Straub, A. C., & Isakson, B. E. (2012). Interaction between nitric oxide signaling and gap junctions: effects on vascular function. *Biochimica et biophysica acta*, 1818(8), 1895–1902. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.031
- López, X., Escamilla, R., Fernández, P., Duarte, Y., González-Nilo, F., Palacios-Prado, N., Martinez, A. D., & Sáez, J. C. (2020). Stretch-Induced Activation of Pannexin 1 Channels Can Be Prevented by PKA-Dependent Phosphorylation. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9180. https://doi.org/10.3390/ijms21239180
- López, X., Palacios-Prado, N., Güiza, J., Escamilla, R., Fernández, P., Vega, J. L., Rojas, M., Marquez-Miranda, V., Chamorro, E., Cárdenas, A. M., Maldifassi, M. C., Martínez, A. D., Duarte, Y., González-Nilo, F. D., & Sáez, J. C. (2021). A physiologic rise in cytoplasmic calcium ion signal increases pannexin1 channel activity via a C-terminus phosphorylation by CaMKII. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118(32). https://doi.org/10.1073/pnas.2108967118
- Lovick, T. A., Brown, L. A., & Key, B. J. (1999). Neurovascular relationships in hippocampal slices: Physiological and anatomical studies of mechanisms underlying flow-metabolism coupling in intraparenchymal microvessels. *Neuroscience*, 92(1), 47-60. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00737-4
- Lueptow, L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. Journal of Visualized Experiments : JoVE, 126. https://doi.org/10.3791/55718
- Ma, Q., Zhao, Z., Sagare, A. P., Wu, Y., Wang, M., Owens, N. C., Verghese, P. B., Herz, J., Holtzman, D. M., & Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier-associated pericytes internalize and clear aggregated amyloid-β42 by LRP1-dependent apolipoprotein e isoform-specific mechanism. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1). https://doi.org/10.1186/s13024-018-0286-0
- Ma, W., Hui, H., Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2009). Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(2), 409-418. <u>https://doi.org/10.1124/jpet.108.146365</u>
- McDowell, K. P., Berthiaume, A. A., Tieu, T., Hartmann, D. A., & Shih, A. Y. (2021). VasoMetrics: unbiased spatiotemporal analysis of microvascular diameter in multi-photon imaging applications. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 11(3), 969–982. <u>https://doi.org/10.21037/qims-20-920</u>
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2015). A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. En Neuron (Vol. 86, Número 4, pp. 883-901). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035

- Mai-Morente, S. P., Irigoyen, J. P., Carriquiry, V. M., Marset, V. M., Di Doménico, M., Isasi, E., & Abudara, V. (2021). Pericyte Mapping in Cerebral Slices with the Far-red Fluorophore TO-PRO-3. *Bio-Protocol*, 11(22), e4222. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4222
- Mai-Morente, S. P., Marset, V. M., Blanco, F., Isasi, E. E., & Abudara, V. (2020). A nuclear fluorescent dye identifies pericytes at the neurovascular unit. Journal of Neurochemistry, jnc.15193. https://doi.org/10.1111/jnc.15193
- Mapelli, L., Gagliano, G., Soda, T., Laforenza, U., Moccia, F., & D'Angelo, E. U. (2017). Granular Layer Neurons Control Cerebellar Neurovascular Coupling Through an NMDA Receptor/NO-Dependent System. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(5), 1340-1351. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2025-16.2016
- Markhotina, N., Liu, G. J., & Martin, D. K. (2007). Contractility of retinal pericytes grown on silicone elastomer substrates is through a protein kinase A-mediated intracellular pathway in response to vasoactive peptides. *IET Nanobiotechnology*, 1(3), 44-51. https://doi.org/10.1049/ietnbt:20060019
- Martínez, A. D., & Sáez, J. C. (1999). Arachidonic acid-induced dye uncoupling in rat cortical astrocytes is mediated by arachidonic acid byproducts. *Brain research*, 816(2), 411–423. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01016-6
- Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C., & Ottersen, O. P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction. GLIA, 58(9), 1094-1103. https://doi.org/10.1002/glia.20990
- Matsugi, T., Chen, Q., & Anderson, D. R. (1997). Contractile responses of cultured bovine retinal pericytes to angiotensin II. Archives of Ophthalmology, 115(10), 1281-1285. https://doi.org/10.1001/archopht.1997.01100160451011
- Matsugi, T., Chen, Q., & Anderson, D. R. (1997). Adenosine-induced relaxation of cultured bovine retinal pericytes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *38*(13), 2695-2701. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9418721/
- Matsushita, K., & Puro, D. G. (2006). Topographical heterogeneity of KIR currents in pericyte-containing microvessels of the rat retina: Effect of diabetes. Journal of Physiology, 573(2), 483-495. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.107102
- Matsushita, K., Fukumoto, M., Kobayashi, T., Kobayashi, M., Ishizaki, E., Minami, M., Katsumura, K., Liao, S. D., Wu, D. M., Zhang, T., & Puro, D. G. (2010). Diabetes-induced inhibition of voltage-dependent calcium channels in the retinal microvasculature: Role of spermine. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(11), 5979-5990. https://doi.org/10.1167/iovs.10-5377.
- Mazaré, N., Gilbert, A., Boulay, A. C., Rouach, N., & Cohen-Salmon, M. (2018). Connexin 30 is expressed in a subtype of mouse brain pericytes. Brain structure & function, 223(2), 1017–1024. https://doi.org/10.1007/s00429-017-1562-4
- McConnell, H. L., Kersch, C. N., Woltjer, R. L., & Neuwelt, E. A. (2017). The translational significance of the neurovascular unit. En *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 292, Número 3, pp. 762-770). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. https://doi.org/10.1074/jbc.R116.760215
- McDowell, K. P., Berthiaume, A.-A., Tieu, T., Hartmann, D. A., & Shih, A. Y. (2021). VasoMetrics: unbiased spatiotemporal analysis of microvascular diameter in multi-photon imaging applications. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 11(3), 969-982. https://doi.org/10.21037/qims-20-920
- Meng, W., Ma, J., Ayata, C., Hara, H., Huang, P. L., Fishman, M. C., & Moskowitz, M. A. (1996). ACh dilates pial arterioles in endothelial and neuronal NOS knockout mice by NO-dependent mechanisms. *The American Journal of Physiology*, 271(3 Pt 2), H1145-50. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.271.3.H1145
- Metea, M. R., & Newman, E. A. (2006). Glial cells dilate and constrict blood vessels: A mechanism of neurovascular coupling. Journal of Neuroscience, 26(11), 2862-2870. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4048-05.2006
- Metea, M. R., & Newman, E. A. (2007). Signalling within the neurovascular unit in the mammalian retina. *Experimental Physiology*, 92(4), 635-640. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.036376
- Michalski, K., Syrjanen, J. L., Henze, E., Kumpf, J., Furukawa, H., & Kawate, T. (2020). The Cryo-EM structure of a pannexin 1 reveals unique motifs for ion selection and inhibition. eLife, 9. https://doi.org/10.7554/eLife.54670
- Mishra, A., O'Farrell, F. M., Reynell, C., Hamilton, N. B., Hall, C. N., & Attwell, D. (2014). Imaging pericytes and capillary diameter in brain slices and isolated retinae. *Nature Protocols*, 9(2), 323-336. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.019
- Mishra, A., Reynolds, J. P., Chen, Y., Gourine, A. V., Rusakov, D. A., & Attwell, D. (2016). Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nature Neuroscience*, 19(12), 1619-1627. https://doi.org/10.1038/nn.4428
- Miteva, A. S., Gaydukov, A. E., Shestopalov, V. I., & Balezina, O. P. (2018). Mechanism of P2X7 receptor-dependent enhancement of neuromuscular transmission in pannexin 1 knockout mice. *Purinergic Signalling*, 14(4), 459-469. https://doi.org/10.1007/s11302-018-9630-7
- Moeini, M., Cloutier-Tremblay, C., Lu, X., Kakkar, A., & Lesage, F. (2020). Cerebral tissue pO(2) response to treadmill exercise in awake mice. Scientific Reports, 10(1), 13358. https://doi.org/10.1038/s41598-020-70413-3
- Montagne, A., Nation, D. A., Pa, J., Sweeney, M. D., Toga, A. W., & Zlokovic, B. V. (2016). Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. En Acta Neuropathologica (Vol. 131, Número 5, pp. 687-707). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1570-0
- Montagne, A., Nikolakopoulou, A. M., Zhao, Z., Sagare, A. P., Si, G., Lazic, D., Barnes, S. R., Daianu, M., Ramanathan, A., Go, A., Lawson, E. J., Wang, Y., Mack, W. J., Thompson, P. M., Schneider, J. A., Varkey, J., Langen, R., Mullins, E., Jacobs, R. E., & Zlokovic, B. V. (2018).

Pericyte degeneration causes white matter dysfunction in the mouse central nervous system. *Nature Medicine*, 24(3), 326-337. https://doi.org/10.1038/nm.4482

- Morris, D. C., Zhang, Z., Davies, K., Fenstermacher, J., & Chopp, M. (1999). High resolution quantitation of microvascular plasma perfusion in nonischemic and ischemic rat brain by laser-scanning confocal microscopy. *Brain Research. Brain Research Protocols*, 4(2), 185-191. https://doi.org/10.1016/s1385-299x(99)00020-3
- Müller, B., Lang, S., Dominietto, M., Rudin, M., Schulz, G., Deyhle, H., Germann, M., Pfeiffer, F., David, C., & Weitkamp, T. (2008). High-resolution tomographic imaging of microvessels. *Proc.SPIE*, 7078. https://doi.org/10.1117/12.794157
- Mulligan, S. J., & MacVicar, B. A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. Nature, 431(7005), 195-199. https://doi.org/10.1038/nature02827
- Munoz, M., & Figueroa, X. (2019). Propagation and Coordination of Intercellular Astrocyte Ca2+ Waves by Glutamatergic Signaling. *The FASEB Journal*, 33(S1), 736.2-736.2. https://doi.org/10.1096/FASEBJ.2019.33.1 SUPPLEMENT.736.2
- Muoio, V., Persson, P. B., & Sendeski, M. M. (2014). The neurovascular unit concept review. En Acta Physiologica (Vol. 210, Número 4, pp. 790-798). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/apha.12250
- Nagasawa, K., Chiba, H., Fujita, H., Kojima, T., Saito, T., Endo, T., & Sawada, N. (2006). Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 208(1), 123-132. https://doi.org/10.1002/jcp.20647
- Nagy, J. I., Patel, D., Ochalski, P. A., & Stelmack, G. L. (1999). Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience*, 88(2), 447–468. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00191-2
- Nagy, J. I., Pereda, A. E., & Rash, J. E. (2018). Electrical synapses in mammalian CNS: Past eras, present focus and future directions. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1860(1), 102-123. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.019
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, Á., Tanaka, K., & Niwa, M. (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry International*, 54(3-4), 253-263. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.12.002
- Nakagomi, T., Nakano-Doi, A., Kawamura, M., & Matsuyama, T. (2015). Do Vascular Pericytes Contribute to Neurovasculogenesis in the Central Nervous System as Multipotent Vascular Stem Cells? En Stem Cells and Development (Vol. 24, Número 15, pp. 1730-1739). Mary Ann Liebert Inc. https://doi.org/10.1089/scd.2015.0039
- Negoro, H., Urban-Maldonado, M., Liou, L. S., Spray, D. C., Thi, M. M., & Suadicani, S. O. (2014). Pannexin 1 channels play essential roles in urothelial mechanotransduction and intercellular signaling. *PloS One*, 9(8), e106269. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106269
- Nehls, V., & Drenckhahn, D. (1991). Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *Journal of Cell Biology*, *113*(1), 147-154. https://doi.org/10.1083/jcb.113.1.147
- Nelson, A. R., Sagare, M. A., Wang, Y., Kisler, K., Zhao, Z., & Zlokovic, B. V. (2020). Channelrhodopsin Excitation Contracts Brain Pericytes and Reduces Blood Flow in the Aging Mouse Brain in vivo. Frontiers in Aging Neuroscience, 12. https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00108
- Nielsen, B. S., Toft-Bertelsen, T. L., Lolansen, S. D., Anderson, C. L., Nielsen, M. S., Thompson, R. J., & MacAulay, N. (2020). Pannexin 1 activation and inhibition is permeant-selective. *The Journal of Physiology*, 598(2), 361-379. https://doi.org/10.1113/JP278759
- Nikolakopoulou, A. M., Montagne, A., Kisler, K., Dai, Z., Wang, Y., Huuskonen, M. T., Sagare, A. P., Lazic, D., Sweeney, M. D., Kong, P., Wang, M., Owens, N. C., Lawson, E. J., Xie, X., Zhao, Z., & Zlokovic, B. V. (2019). Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss. *Nature Neuroscience*, 22(7), 1089-1098. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0434-z
- Nippert, A. R., Biesecker, K. R., & Newman, E. A. (2018). Mechanisms Mediating Functional Hyperemia in the Brain. En Neuroscientist (Vol. 24, Número 1, pp. 73-83). SAGE Publications Inc. https://doi.org/10.1177/1073858417703033
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., & Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): Multifunctional cells with lineage plasticity. En Nature Reviews Neuroscience (Vol. 10, Número 1, pp. 9-22). Nat Rev Neurosci. https://doi.org/10.1038/nrn2495
- Nizari, S., Carare, R. O., Romero, I. A., & Hawkes, C. A. (2019). 3D Reconstruction of the Neurovascular Unit Reveals Differential Loss of Cholinergic Innervation in the Cortex and Hippocampus of the Adult Mouse Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 172. https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00172
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. Physiological Reviews, 82(4), 1013-1067. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002
- Nortley, R., Korte, N., Izquierdo, P., Hirunpattarasilp, C., Mishra, A., Jaunmuktane, Z., Kyrargyri, V., Pfeiffer, T., Khennouf, L., Madry, C., Gong, H., Richard-Loendt, A., Huang, W., Saito, T., Saido, T. C., Brandner, S., Sethi, H., & Attwell, D. (2019). Amyloid b oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to pericytes. *Science*, 365(6450). https://doi.org/10.1126/science.aav9518
- O'Brien, J. (2019). Design principles of electrical synaptic plasticity. En *Neuroscience Letters* (Vol. 695, pp. 4-11). Elsevier Ireland Ltd. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.003
- Okamoto, T., Akiyama, M., Takeda, M., Gabazza, E. C., Hayashi, T., & Suzuki, K. (2009). Connexin32 is expressed in vascular endothelial cells and participates in gap-junction intercellular communication. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(2), 264-268. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.148

- Oku, H., Kodama, T., Sakagami, K., & Puro, D. G. (2001). Diabetes-induced disruption of gap junction pathways within the retinal microvasculature. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42(8), 1915-1920.
- Orellana, J. A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J. X., Bennett, M. V. L., Naus, C. C., Giaume, C., & Sáez, J. C. (2011) (a). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *Journal of Neurochemistry*, 118(5), 826-840. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07210.
- Orellana, J. A., Figueroa, X. F., Sánchez, H. A., Contreras-Duarte, S., Velarde, V., & Sáez, J. C. (2011) (b). Hemichannels in the neurovascular unit and white matter under normal and inflamed conditions. CNS & Neurological Disorders Drug Targets, 10(3), 404-414. https://doi.org/10.2174/187152711794653869
- Orellana, J. A., Sáez, P. J., Shoji, K. F., Schalper, K. A., Palacios-Prado, N., Velarde, V., Giaume, C., Bennett, M. V. L., & Sáez, J. C. (2009). Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. En *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 11, Número 2, pp. 369-399). Mary Ann Liebert, Inc. https://doi.org/10.1089/ars.2008.2130
- Osipova, E. D., Semyachkina-Glushkovskaya, O. V., Morgun, A. V., Pisareva, N. V., Malinovskaya, N. A., Boitsova, E. B., Pozhilenkova, E. A., Belova, O. A., Salmin, V. V., Taranushenko, T. E., Noda, M., & Salmina, A. B. (2018). Gliotransmitters and cytokines in the control of bloodbrain barrier permeability. *Reviews in the Neurosciences*, 29(5), 567-591. https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0092
- Otsu, Y., Couchman, K., Lyons, D. G., Collot, M., Agarwal, A., Mallet, J. M., Pfrieger, F. W., Bergles, D. E., & Charpak, S. (2015). Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nature Neuroscience*, 18(2), 210-218. https://doi.org/10.1038/nn.3906
- Özen, I., Boix, J., & Paul, G. (2012). Perivascular mesenchymal stem cells in the adult human brain: a future target for neuroregeneration? *Clinical and Translational Medicine*, 1(1), 30. https://doi.org/10.1186/2001-1326-1-30
- Ozerdem, U., & Stallcup, W. B. (2003). Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis*, 6(3), 241-249. https://doi.org/10.1023/B:AGEN.0000021401.58039.a9
- Ozerdem, U., & Stallcup, W. B. (2003). Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis*, 6(3), 241-249. https://doi.org/10.1023/B:AGEN.0000021401.58039.a9
- Palacios-Prado, N., Soto, P. A., López, X., Choi, E. J., Marquez-Miranda, V., Rojas, M., Duarte, Y., Lee, J., González-Nilo, F. D., & Sáez, J. C. (2022). Endogenous pannexin1 channels form functional intercellular cell-cell channels with characteristic voltage-dependen properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(18), e2202104119. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.2202104119</u>
- Palea, S., Corsi, M., Pietra, C., Artibani, W., Calpista, A., Gaviraghi, G., & Trist, D. G. (1994). ADP beta S induces contraction of the human isolated urinary bladder through a purinoceptor subtype different from P2X and P2Y. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 269(1), 193-197.
- Pan, F., Keung, J., Kim, I. B., Snuggs, M. B., Mills, S. L., O'Brien, J., & Massey, S. C. (2012). Connexin 57 is expressed by the axon terminal network of B-type horizontal cells in the rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology*, 520(10), 2256-2274. <u>https://doi.org/10.1002/cne.23060</u>
- Panchin Y. V. (2005). Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *The Journal of experimental biology*, 208(Pt 8), 1415–1419. https://doi.org/10.1242/jeb.01547
- Pannasch, U., Freche, D., Dallérac, G., Ghézali, G., Escartin, C., Ezan, P., Cohen-Salmon, M., Benchenane, K., Abudara, V., Dufour, A., Lübke, J. H. R., Déglon, N., Knott, G., Holcman, D., & Rouach, N. (2014). Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nature Neuroscience*, 17(4), 549-558. https://doi.org/10.1038/nn.3662
- Pannasch, U., Sibille, J., & Rouach, N. (2012). Dual electrophysiological recordings of synaptically-evoked astroglial and neuronal responses in acute hippocampal slices. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 69, e4418. https://doi.org/10.3791/4418
- Pannasch, U., Vargová, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., Syková, E., & Rouach, N. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), 8467-8472. https://doi.org/10.1073/pnas.1016650108
- Pantaloni, D., Le Clainche, C., & Carlier, M. F. (2001). Mechanism of actin-based motility. Science (New York, N.Y.), 292(5521), 1502-1506. https://doi.org/10.1126/science.1059975
- Parnavelas, J. G., Kelly, W., & Burnstock, G. (1985). Ultrastructural localization of choline acetyltransferase in vascular endothelial cells in rat brain. *Nature*, 316(6030), 724-725. https://doi.org/10.1038/316724a0
- Patel, D., Zhang, X., & Veenstra, R. D. (2014). Connexin hemichannel and pannexin channel electrophysiology: How do they differ? FEBS Letters, 588(8), 1372-1378. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.12.023
- Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1β release by the ATP-gated P2X7 receptor. EMBO Journal, 25(21), 5071-5082. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378
- Penuela, S., Gehi, R., & Laird, D. W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. En *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* (Vol. 1828, Número 1, pp. 15-22). Biochim Biophys Acta. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.017
- Penuela, S., Lohman, A. W., Lai, W., Gyenis, L., Litchfield, D. W., Isakson, B. E., & Laird, D. W. (2014). Diverse post-translational modifications of the pannexin family of channel-forming proteins. *Channels*, 8(2), 124-130. https://doi.org/10.4161/chan.27422
- Peppiatt C, Attwell D. Neurobiology: feeding the brain. Nature. 2004 Sep 9;431(7005):137-8. doi: 10.1038/431137a.
- Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P., & Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443(7112), 700-704. <u>https://doi.org/10.1038/nature05193</u>
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. En *Trends in Neurosciences* (Vol. 32, Número 8, pp. 421-431). Trends Neurosci. https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001
- Pereda, A. E., & Macagno, E. (2017). Electrical transmission: Two structures, same functions? En Developmental Neurobiology (Vol. 77, Número 5, pp. 517-521). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/dneu.22488
- Peters, B. P., & Goldstein, I. J. (1979). The use of fluorescein-conjugated Bandeiraea simplicifolia B4-isolectin as a histochemical reagent for the detection of alpha-D-galactopyranosyl groups. Their occurrence in basement membranes. *Experimental Cell Research*, 120(2), 321-334. https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90392-6
- Phillis, J. W. (1989). Adenosine in the control of the cerebral circulation. En Cerebrovascular and brain metabolism reviews (Vol. 1, Número 1, pp. 26-54). https://europepmc.org/article/med/2701369
- Phillis, John W. (2004). Adenosine and adenine nucleotides as regulators of cerebral blood flow: Roles of acidosis, cell swelling, and KATP channels. En Critical Reviews in Neurobiology (Vol. 16, Número 4, pp. 237-270). https://doi.org/10.1615/CritRevNeurobiol.v16.i4.20
- Platania, C. B. M., Giurdanella, G., Di Paola, L., Leggio, G. M., Drago, F., Salomone, S., & Bucolo, C. (2017). P2X7 receptor antagonism: Implications in diabetic retinopathy. *Biochemical Pharmacology*, 138, 130-139. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.05.001
- Poon, I. K. H., Chiu, Y.-H., Armstrong, A. J., Kinchen, J. M., Juncadella, I. J., Bayliss, D. A., & Ravichandran, K. S. (2014). Unexpected link between an antibiotic, pannexin channels and apoptosis. *Nature*, 507(7492), 329-334. https://doi.org/10.1038/nature13147
- Porter, J. T., & McCarthy, K. D. (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. Progress in Neurobiology, 51(4), 439-455. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(96)00068-8
- Price, D. L., Ludwig, J. W., Mi, H., Schwarz, T. L., & Ellisman, M. H. (2002). Distribution of rSlo Ca2+-activated K+ channels in rat astrocyte perivascular endfeet. *Brain Research*, 956(2), 183-193. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03266-3
- Prochnow, N., Abdulazim, A., Kurtenbach, S., Wildförster, V., Dvoriantchikova, G., Hanske, J., Petrasch-Parwez, E., Shestopalov, V. I., Dermietzel, R., Manahan-Vaughan, D., & Zoidl, G. (2012b). Pannexin1 Stabilizes Synaptic Plasticity and Is Needed for Learning. *PLoS ONE*, 7(12), e51767. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051767
- Puro, D. G. (2012). Retinovascular physiology and pathophysiology: New experimental approach/new insights. En Progress in Retinal and Eye Research (Vol. 31, Número 3, pp. 258-270). https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.01.001
- Qiu, F., & Dahl, G. (2009). A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 296(2), C250-5. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00433.2008
- Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L. L., Louie, S., Cupp, J. E., Dubyak, G. R., Hackos, D., & Dixit, V. M. (2011). Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(11), 6553-6561. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100478
- Rafael, A., Cairus, A., Tizzoni, M., Abudara, V., & Vitureira, N. (2020). Glial ATP and Large Pore Channels Modulate Synaptic Strength in Response to Chronic Inactivity. *Molecular Neurobiology*, 57(6), 2856-2869. https://doi.org/10.1007/s12035-020-01919-0
- Raichle, M. E. (1998). Behind the scenes of functional brain imaging: A historical and physiological perspective. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(3), 765-772. https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.765
- Ramachandran, E., Frank, R. N., & Kennedy, A. (1993). Effects of endothelin on cultured bovine retinal microvascular pericytes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 34(3), 586-595. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8449678/
- Ransford, G. A., Fregien, N., Qiu, F., Dahl, G., Conner, G. E., & Salathe, M. (2009). Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41(5), 525-534. https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0367OC
- Retamal, M. A., Froger, N., Palacios-Prado, N., Ezan, P., Sáez, P. J., Sáez, J. C., & Giaume, C. (2007). Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *Journal of Neuroscience*, 27(50), 13781-13792. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2042-07.2007
- Ribatti, D., Nico, B., & Crivellato, E. (2011). The role of pericytes in angiogenesis. En International Journal of Developmental Biology (Vol. 55, Número 3, pp. 261-268). Int J Dev Biol. https://doi.org/10.1387/ijdb.103167dr
- Richter, K., Kiefer, K. P., Grzesik, B. A., Clauss, W. G., & Fronius, M. (2014). Hydrostatic pressure activates ATP-sensitive K+ channels in lung epithelium by ATP release through pannexin and connexin hemichannels. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(1), 45-55. https://doi.org/10.1096/fj.13-229252
- Riquelme, M. A., Cea, L. A., Vega, J. L., Boric, M. P., Monyer, H., Bennett, M. V. L., Frank, M., Willecke, K., & Sáez, J. C. (2013). The ATP required for potentiation of skeletal muscle contraction is released via pannexin hemichannels. *Neuropharmacology*, 75, 594-603. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.022
- Robertson, R. T., Levine, S. T., Haynes, S. M., Gutierrez, P., Baratta, J. L., Tan, Z., & Longmuir, K. J. (2015). Use of labeled tomato lectin for imaging vasculature structures. *Histochemistry and Cell Biology*, 143(2), 225-234. https://doi.org/10.1007/s00418-014-1301-3

- Rosehart, A. C., Longden, T. A., Weir, N., Fontaine, J. T., Joutel, A., & Dabertrand, F. (2021). Prostaglandin E(2) Dilates Intracerebral Arterioles When Applied to Capillaries: Implications for Small Vessel Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 695965. https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.695965
- Rosenblum, W. I. (1992). Endothelium-derived relaxing factor in brain blood vessels is not nitric oxide. Stroke, 23(10), 1527-1532. https://doi.org/10.1161/01.str.23.10.1527
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., & Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science*, 322(5907), 1551-1555. https://doi.org/10.1126/science.1164022
- Rouget C., (1873). Memoire sur le developpement, la structures et les proprietes des capillaires sanguins et lymphatiques. Archs Physiol Norm Pathol, 5 (1873), pp. 603-633
- Rustenhoven, J., Aalderink, M., Scotter, E. L., Oldfield, R. L., Bergin, P. S., Mee, E. W., Graham, E. S., Faull, R. L. M., Curtis, M. A., Park, T. I. H., & Dragunow, M. (2016). TGF-beta1 regulates human brain pericyte inflammatory processes involved in neurovasculature function. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1). https://doi.org/10.1186/s12974-016-0503-0
- Sáez, J. C., Berthoud, V. M., Brañes, M. C., Martínez, A. D., & Beyer, E. C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions. En *Physiological Reviews* (Vol. 83, Número 4, pp. 1359-1400). American Physiological Society.
- Sáez, J. C., Contreras, J. E., Bukauskas, F. F., Retamal, M. A., & Bennett, M. V. L. (2003). Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. En Acta Physiologica Scandinavica (Vol. 179, Número 1, pp. 9-22). Acta Physiol Scand. https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01196.x
- Sáez, J. C., Schalper, K. A., Retamal, M. A., Orellana, J. A., Shoji, K. F., & Bennett, M. V. L. (2010). Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. En *Experimental Cell Research* (Vol. 316, Número 15, pp. 2377-2389). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.026
- Sáez, J. C., Vargas, A. A., Hernández, D. E., Ortiz, F. C., Giaume, C., & Orellana, J. A. (2020). Permeation of molecules through astroglial connexin 43 hemichannels is modulated by cytokines with parameters depending on the permeant species. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11). https://doi.org/10.3390/ijms21113970
- Sakagami, K., Kawamura, H., Wu, D. M., & Puro, D. G. (2001). Nitric oxide/cGMP-induced inhibition of calcium and chloride currents in retinal pericytes. *Microvascular Research*, 62(2), 196-203. https://doi.org/10.1006/mvre.2001.2343
- Samuels, S. E., Lipitz, J. B., Wang, J., Dahl, G., & Muller, K. J. (2013). Arachidonic acid closes innexin/pannexin channels and thereby inhibits microglia cell movement to a nerve injury. *Developmental neurobiology*, 73(8), 621–631. https://doi.org/10.1002/dneu.22088
- Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Møllgård, K., & Habgood, M. D. (2015). Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Frontiers in Neuroscience*, 9, 385. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00385
- Savettieri, G., Di Liegro, I., Catania, C., Licata, L., Pitarresi, G. L., D'Agostino, S., Schiera, G., De Caro, V., Giandalia, G., Giannola, L. I., & Cestelli, A. (2000). Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *NeuroReport*, 11(5), 1081-1084. https://doi.org/10.1097/00001756-200004070-00035
- Scemes, E., Dermietzel, R., & Spray, D. C. (1998). Calcium Waves Between Astrocytes From Cx43 Knockout Mice. En Glia (Vol. 24, Número 1). https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199809)24:1<65::aid-glia7>3.0.co;2-#
- Scemes, E., Suadicani, S. O., & Spray, D. C. (2000). Intercellular communication in spinal cord astrocytes: Fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation. *Journal of Neuroscience*, 20(4), 1435-1445. https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-04-01435.2000
- Schock, S. C., LeBlanc, D., Hakim, A. M., & Thompson, C. S. (2008). ATP release by way of connexin 36 hemichannels mediates ischemic tolerance in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(1), 138-144. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.054
- Schuman, E. M., & Madison, D. V. (1994). Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. Science, 263(5146), 532-536. https://doi.org/10.1126/science.8290963
- Segal, S. S., & Jacobs, T. L. (2001). Role for endothelial cell conduction in ascending vasodilatation and exercise hyperaemia in hamster skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 536(3), 937-946. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00937.x
- Seminario-Vidal, L., Okada, S. F., Sesma, J. I., Kreda, S. M., van Heusden, C. A., Zhu, Y., Jones, L. C., O'Neal, W. K., Penuela, S., Laird, D. W., Boucher, R. C., & Lazarowski, E. R. (2011). Rho signaling regulates pannexin 1-mediated ATP release from airway epithelia. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(30), 26277-26286. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.260562
- Sengillo, J. D., Winkler, E. A., Walker, C. T., Sullivan, J. S., Johnson, M., & Zlokovic, B. V. (2013). Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in alzheimer's disease. *Brain Pathology*, 23(3), 303-310. https://doi.org/10.1111/bpa.12004
- Severs, N. J., Rothery, S., Dupont, E., Coppen, S. R., Yeh, H. I., Ko, Y. S., Matsushita, T., Kaba, R., & Halliday, D. (2001). Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system. *Microscopy Research and Technique*, 52(3), 301-322. https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010201)52:3<301::AID-JEMT1015>3.0.CO;2-Q

Shepro, D., & Morel, N. M. L. (1993). Pericyte physiology. The FASEB Journal, 7(11), 1031-1038. https://doi.org/10.1096/fasebj.7.11.8370472

Shimizu, F., Sano, Y., Maeda, T., Abe, M. A., Nakayama, H., Takahashi, R. I., Ueda, M., Ohtsuki, S., Terasaki, T., Obinata, M., & Kanda, T. (2008). Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *Journal of Cellular Physiology*, 217(2), 388-399. https://doi.org/10.1002/jcp.21508

- Siller-Jackson, A. J., Burra, S., Gu, S., Xia, X., Bonewald, L. F., Sprague, E., & Jiang, J. X. (2008). Adaptation of connexin 43-hemichannel prostaglandin release to mechanical loading. *Journal of Biological Chemistry*, 283(39), 26374-26382. https://doi.org/10.1074/jbc.M803136200
- Silverman, W. R., de Rivero Vaccari, J. P., Locovei, S., Qiu, F., Carlsson, S. K., Scemes, E., Keane, R. W., & Dahl, G. (2009). The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 18143-18151. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.004804
- Silverman, W., Locovei, S., & Dahl, G. (2008). Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 295(3), C761-7. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00227.2008
- Simandle, S. A., Kerr, B. A., Lacza, Z., Eckman, D. M., Busija, D. W., & Bari, F. (2005). Piglet pial arteries respond to N-methyl-D-aspartate in vivo but not in vitro. *Microvascular Research*, 70(1-2), 76-83. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2005.04.007
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q. S., & Nedergaard, M. (2003). Signaling at the gliovascular interface. *Journal of Neuroscience*, 23(27), 9254-9262. https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-27-09254.2003
- Simon, A. M., & McWhorter, A. R. (2002). Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. Developmental Biology, 251(2), 206-220. https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0826
- Sipos, I., Dömötör, E., Abbott, N. J., & Adam-Vizi, V. (2000). The pharmacology of nucleotide receptors on primary rat brain endothelial cells grown on a biological extracellular matrix: Effects on intracellular calcium concentration. *British Journal of Pharmacology*, 131(6), 1195-1203. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703675
- Smyth, L. C. D., Rustenhoven, J., Scotter, E. L., Schweder, P., Faull, R. L. M., Park, T. I. H., & Dragunow, M. (2018). Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 92, 48-60. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.06.001
- Söhl, G., Maxeiner, S., & Willecke, K. (2005). Expression and functions of neuronal gap junctions. Nature Reviews Neuroscience, 6(3), 191-200. https://doi.org/10.1038/nrn1627
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M. H., Patlak, C. S., Pettigrew, K. D., Sakurada, O., & Shinohara, M. (1977). The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of neurochemistry*, 28(5), 897–916. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb10649.x
- Song, S., Ewald, A. J., Stallcup, W., Werb, Z., & Bergers, G. (2005). PDGFRβ+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nature Cell Biology*, 7(9), 870-879. https://doi.org/10.1038/ncb1288
- Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Número 10, pp. 712-723). Nature Publishing Group. <a href="https://doi.org/10.1038/nri2852">https://doi.org/10.1038/nri2852</a>
- Sosinsky, G. E., Boassa, D., Dermietzel, R., Duffy, H. S., Laird, D. W., MacVicar, B., Naus, C. C., Penuela, S., Scemes, E., Spray, D. C., Thompson, R. J., Zhao, H. B., & Dahl, G. (2011). Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels (Austin, Tex.)*, 5(3), 193–197. https://doi.org/10.4161/chan.5.3.15765
- Stehberg, J., Moraga-Amaro, R., Salazar, C., Becerra, A., Echeverría, C., Orellana, J. A., Bultynck, G., Ponsaerts, R., Leybaert, L., Simon, F., Sáez, J. C., & Retamal, M. A. (2012). Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(9), 3649-3657. https://doi.org/10.1096/fj.11-198416
- Stehberg, J., Moraga-Amaro, R., Salazar, C., Becerra, A., Echeverría, C., Orellana, J. A., Bultynck, G., Ponsaerts, R., Leybaert, L., Simon, F., Sáez, J. C., & Retamal, M. A. (2012). Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(9), 3649-3657. https://doi.org/10.1096/fj.11-198416
- Steinman, J., Koletar, M. M., Stefanovic, B., & Sled, J. G. (2017). 3D morphological analysis of the mouse cerebral vasculature: Comparison of in vivo and ex vivo methods. *PloS One*, 12(10), e0186676. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186676
- Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C. G., & Charles, A. C. (2002). Intercellular Calcium Signaling in Astrocytes via ATP Release through Connexin Hemichannels. Journal of Biological Chemistry, 277(12), 10482-10488. https://doi.org/10.1074/jbc.M109902200
- Straub, S. V., Bonev, A. D., Wilkerson, M. K., & Nelson, M. T. (2006). Dynamic inositol trisphosphate-mediated calcium signals within astrocytic endfeet underlie vasodilation of cerebral arterioles. *Journal of General Physiology*, 128(6), 659-669. https://doi.org/10.1085/jgp.200609650
- Stridh, M. H., Tranberg, M., Weber, S. G., Blomstrand, F., Sandberg, M., & ¶1, ‡. (2008). Stimulated Efflux of Amino Acids and Glutathione from Cultured Hippocampal Slices by Omission of Extracellular Calcium LIKELY INVOLVEMENT OF CONNEXIN HEMICHANNELS \*. https://doi.org/10.1074/jbc.M704153200
- Suadicani, S. O., Iglesias, R., Wang, J., Dahl, G., Spray, D. C., & Scemes, E. (2012). ATP signaling is deficient in cultured pannexin1-null mouse astrocytes. GLIA, 60(7), 1106-1116. https://doi.org/10.1002/glia.22338
- Suseela, Y. V, Narayanaswamy, N., Pratihar, S., & Govindaraju, T. (2018). Far-red fluorescent probes for canonical and non-canonical nucleic acid structures: current progress and future implications. *Chemical Society Reviews*, 47(3), 1098-1131. https://doi.org/10.1039/c7cs00774d
- Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T., & Takata, K. (1997). DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 45(1), 49-53. https://doi.org/10.1177/002215549704500107

- Sweeney, M. D., Ayyadurai, S., & Zlokovic, B. V. (2016). Pericytes of the neurovascular unit: Key functions and signaling pathways. En Nature Neuroscience (Vol. 19, Número 6, pp. 771-783). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nn.4288
- Tachikawa, M., Murakami, K., Akaogi, R., Akanuma, S. ichi, Terasaki, T., & Hosoya, K. ichi. (2020). Polarized hemichannel opening of pannexin 1/connexin 43 contributes to dysregulation of transport function in blood-brain barrier endothelial cells. *Neurochemistry International*, 132. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104600
- Takano, T., Tian, G. F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., & Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature Neuroscience*, 9(2), 260-267. https://doi.org/10.1038/nn1623
- Takata, F., Dohgu, S., Nishioku, T., Takahashi, H., Harada, E., Makino, I., Nakashima, M., Yamauchi, A., & Kataoka, Y. (2009). Adrenomedullininduced relaxation of rat brain pericytes is related to the reduced phosphorylation of myosin light chain through the cAMP/PKA signaling pathway. *Neuroscience Letters*, 449(1), 71-75. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.10.082
- Tao, H. W., & Poo, M. (2001). Retrograde signaling at central synapses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(20), 11009-11015. https://doi.org/10.1073/pnas.191351698
- Taruno, A. (2018). ATP Release Channels. International Journal of Molecular Sciences, 19(3), 808. https://doi.org/10.3390/ijms19030808
- Tata, D. A., & Anderson, B. J. (2002). A new method for the investigation of capillary structure. *Journal of Neuroscience Methods*, 113(2), 199-206. https://doi.org/10.1016/s0165-0270(01)00494-0
- Thompson, R. J., Jackson, M. F., Olah, M. E., Rungta, R. L., Hines, D. J., Beazely, M. A., MacDonald, J. F., & MacVicar, B. A. (2008). Activation of Pannexin-1 Hemichannels Augments Aberrant Bursting in the Hippocampus. *Science*, 322(5907), 1555-1559. https://doi.org/10.1126/science.1165209
- Thompson, R. J., Zhou, N., & MacVicar, B. A. (2006). Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science*, *312*(5775), 924-927. https://doi.org/10.1126/science.1126241
- Thompson, Roger J., & MacVicar, B. A. (2008). Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. En *Channels* (Vol. 2, Número 2, pp. 81-86). Taylor and Francis Inc. https://doi.org/10.4161/chan.2.2.6003
- Thompson, Roger J., Zhou, N., & MacVicar, B. A. (2006). Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science*, *312*(5775), 924-927. https://doi.org/10.1126/science.1126241
- Tian, L., Ji, G., Wang, C., Bai, X., Lu, Y., & Xiong, L. (2010). Excitatory synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa is under an inhibitory tone of endogenous adenosine. *Neuroscience Letters*, 477(1), 28-32. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.04.029
- Timóteo, M. A., Carneiro, I., Silva, I., Noronha-Matos, J. B., Ferreirinha, F., Silva-Ramos, M., & Correia-De-Sá, P. (2014). ATP released via pannexin-1 hemichannels mediates bladder overactivity triggered by urothelial P2Y6 receptors. *Biochemical Pharmacology*, 87(2), 371-379. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.11.007
- Tong, L., Hill, R. A., Damisah, E. C., Murray, K. N., Yuan, P., Bordey, A., & Grutzendler, J. (2021). Imaging and optogenetic modulation of vascular mural cells in the live brain. *Nature Protocols*, 16(1), 472-496. https://doi.org/10.1038/s41596-020-00425-w
- Tong, X. K., & Hamel, E. (1999). Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 92(1), 163-175. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00750-7
- Uemura, M. T., Maki, T., Ihara, M., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2020). Brain Microvascular Pericytes in Vascular Cognitive Impairment and Dementia. Frontiers in aging neuroscience, 12, 80. https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00080
- Ujiie, H., Chaytor, A. T., Bakker, L. M., & Griffith, T. M. (2003). Essential role of gap junctions in NO- and prostanoid-independent relaxations evoked by acetylcholine in rabbit intracerebral arteries. *Stroke*, *34*(2), 544-550. https://doi.org/10.1161/01.STR.0000054158.72610.EC
- Van Hooijdonk, C. A. E. M., Glade, C. P., & Van Erp, P. E. J. (1994). TO-PRO-3 iodide: A novel HeNe laser-excitable DNA stain as an alternative for propidium iodide in multiparameter flow cytometry. Cytometry, 17(2), 185-189. https://doi.org/10.1002/cyto.990170212
- Van Kempen, M. J. A., & Jongsma, H. J. (1999). Distribution of connexin37, connexin40 and connexin43 in the aorta and coronary artery of several mammals. *Histochemistry and Cell Biology*, 112(6), 479-486. https://doi.org/10.1007/s004180050432
- van Kempen, M. J. A., Velde, I. Ten, Wessels, A., Oosthoek, P. W., Gros, D., Jongsma, H. J., Moorman, A. F. M., & Lamers, W. H. (1995). Differential connexin distribution accommodates cardiac function in different species. *Microscopy Research and Technique*, 31(5), 420-436. https://doi.org/10.1002/jemt.1070310511
- Vanlandewijck, M., He, L., Mäe, M. A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., Sun, Y., Raschperger, E., Räsänen, M., Zarb, Y., Mochizuki, N., Keller, A., Lendahl, U., & Betsholtz, C. (2018). A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature*, 554(7693), 475-480. https://doi.org/10.1038/nature25739
- Vaucher, E., & Hamel, E. (1995). Cholinergic basal forebrain neurons project to cortical microvessels in the rat: electron microscopic study with anterogradely transported Phaseolus vulgaris leucoagglutinin and choline acetyltransferase immunocytochemistry. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(11), 7427-7441. <u>https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-11-07427.1995</u>

- Vázquez, C., Tolón, R. M., Pazos, M. R., Moreno, M., Koester, E. C., Cravatt, B. F., Hillard, C. J., & Romero, J. (2015). Endocannabinoids regulate the activity of astrocytic hemichannels and the microglial response against an injury: In vivo studies. *Neurobiology of Disease*, 79, 41-50. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.005
- Ventura, R., & Harris, K. M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. Journal of Neuroscience, 19(16), 6897-6906. https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-16-06897.1999
- Vicario, N., Li Volti, G., & Parenti, R. (2020). Euromediterranean biomedical journal 2020,15 (07) 31-35 (formerly: capsula eburnea) review gap junctions, hemichannels and connexins and their role in the neurovascular unit. https://doi.org/10.3269/1970-5492.2020.15.7
- Virgintino, D., Robertson, D., Errede, M., Benagiano, V., Bertossi, M., Ambrosi, G., & Roncali, L. (2001). Expression of the gap junction protein connexin43 in human telencephalon microvessels. *Microvascular Research*, 62(3), 435-439. https://doi.org/10.1006/mvre.2001.2345
- Wallraff, A., Köhling, R., Heinemann, U., Theis, M., Willecke, K., & Steinhäuser, C. (2006). The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 26(20), 5438-5447. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0037-06.2006
- Walrave, L., Vinken, M., Albertini, G., De Bundel, D., Leybaert, L., & Smolders, I. J. (2016). Inhibition of Connexin43 Hemichannels Impairs Spatial Short-Term Memory without Affecting Spatial Working Memory. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(DEC2016), 288. https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00288
- Watano, T., Matsuoka, I., & Kimura, J. (2002). Characteristics of ATP-induced current through P2X7 receptor in NG108-15 cells: unique antagonist sensitivity and lack of pore formation. *Japanese Journal of Pharmacology*, 88(4), 428-435. https://doi.org/10.1254/jjp.88.428
- Webb, R. C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. Advances in Physiology Education, 27(1-4), 201-206. https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003
- Weilinger, N. L., Tang, P. L., & Thompson, R. J. (2012). Anoxia-induced NMDA receptor activation opens pannexin channels via Src family kinases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(36), 12579–12588. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1267-12.2012
- Wendling, W. W., Chen, D., Daniels, F. B., Monteforte, M. R., Fischer, M. B., Harakal, C., & Carlsson, C. (1996). The effects of N-methyl-D-aspartate agonists and antagonists on isolated bovine cerebral arteries. Anesthesia and Analgesia, 82(2), 264-268. https://doi.org/10.1097/00000539-199602000-00009
- Wicki-Stordeur, L. E., & Swayne, L. A. (2013). Panx1 regulates neural stem and progenitor cell behaviours associated with cytoskeletal dynamics and interacts with multiple cytoskeletal elements. Cell Communication and Signaling : CCS, 11, 62. https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-62
- Wihlborg, A.-K., Balogh, J., Wang, L., Borna, C., Dou, Y., Joshi, B. V, Lazarowski, E., Jacobson, K. A., Arner, A., & Erlinge, D. (2006). Positive inotropic effects by uridine triphosphate (UTP) and uridine diphosphate (UDP) via P2Y2 and P2Y6 receptors on cardiomyocytes and release of UTP in man during myocardial infarction. *Circulation Research*, 98(7), 970-976. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000217402.73402.cd
- Willebrords, J., Maes, M., Crespo Yanguas, S., & Vinken, M. (2017). Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 180, 144-160. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.001
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., & Fallier-Becker, P. (2009). Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. En Cell and Tissue Research (Vol. 335, Número 1, pp. 75-96). https://doi.org/10.1007/s00441-008-0658-9
- Wu, C., Ivars, F., Anderson, P., Hallmann, R., Vestweber, D., Nilsson, P., Robenek, H., Tryggvason, K., Song, J., Korpos, E., Loser, K., Beissert, S., Georges-Labouesse, E., & Sorokin, L. M. (2009). Endothelial basement membrane laminin α5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. *Nature Medicine*, 15(5), 519-527. https://doi.org/10.1038/nm.1957
- Wu, D. M., Kawamura, H., Sakagami, K., Kobayashi, M., & Puro, D. G. (2003). Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 284(6 53-6). https://doi.org/10.1152/ajpheart.01007.2002
- Wu, D., Minami, M., Kawamura, H., & Puro, D. (2006). Electrotonic transmission within pericyte-containing retinal microvessels. *Microcirculation*, 13(5), 353-363. https://doi.org/10.1080/10739680600745778
- Xu, H. L., Mao, L., Ye, S., Paisansathan, C., Vetri, F., & Pelligrino, D. A. (2008). Astrocytes are a key conduit for upstream signaling of vasodilation during cerebral cortical neuronal activation in vivo. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 294(2). https://doi.org/10.1152/ajpheart.00530.2007
- Yamamoto, T., Ochalski, A., Hertzberg, E. L., & Nagy, J. I. (1990). On the organization of astrocytic gap junctions in rat brain as suggested by LM and EM immunohistochemistry of connexin43 expression. *The Journal of comparative neurology*, 302(4), 853–883. https://doi.org/10.1002/cne.903020414
- Yamazaki, Y., & Kanekiyo, T. (2017). Blood-brain barrier dysfunction and the pathogenesis of alzheimer's disease. En International Journal of Molecular Sciences (Vol. 18, Número 9). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms18091965
- Yang, K., Xiao, Z., He, X., Weng, R., Zhao, X., & Sun, T. (2022). Mechanisms of Pannexin 1 (PANX1) Channel Mechanosensitivity and Its Pathological Roles. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). https://doi.org/10.3390/ijms23031523

Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H. D., Huizing, M., & Hoogstraten-Miller, S. (2011). Retro-orbital injections in mice. Lab Animal, 40(5), 155-160. https://doi.org/10.1038/laban0511-155

Ye, Z. C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S., & Ransom, B. R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: A novel mechanism of glutamate release. Journal of Neuroscience, 23(9), 3588-3596. https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-09-03588.2003

- Yemisci, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Vural, A., Can, A., Topalkara, K., & Dalkara, T. (2009). Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nature Medicine*, 15(9), 1031-1037. <u>https://doi.org/10.1038/nm.2022</u>
- Yen, M. R., & Saier, M. H., Jr (2007). Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. Progress in biophysics and molecular biology, 94(1-2), 5–14. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.006
- Zambach, S. A., Cai, C., Cederberg Helms, H. C., Hald, B. O., Fordsmann, J. C., Nielsen, R. M., Lønstrup, M., Brodin, B., & Lauritzen, M. J. (2020). Nitric oxide, K<sub&gt;ATP&lt;/sub&gt; channels and endothelin-1 modulate brain pericyte function, vascular tone and neurovascular coupling. *bioRxiv*, 2020.06.07.138875. https://doi.org/10.1101/2020.06.07.138875
- Zhang, C. (2011). Expression of connexin 57 in the olfactory epithelium and olfactory bulb. Neuroscience Research, 71(3), 226-234. https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.07.1832
- Zhang, C., & Restrepo, D. (2002). Expression of connexin 45 in the olfactory system. Brain Research, 929(1), 37-47. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03372-8
- Zhang, C., & Restrepo, D. (2003). Heterogeneous expression of connexin 36 in the olfactory epithelium and glomerular layer of the olfactory bulb. Journal of Comparative Neurology, 459(4), 426-439. https://doi.org/10.1002/cne.10617
- Zhang, F., Xu, S., & Iadecola, C. (1995). Role of nitric oxide and acetylcholine in neocortical hyperemia elicited by basal forebrain stimulation: evidence for an involvement of endothelial nitric oxide. *Neuroscience*, 69(4), 1195-1204. https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00302-y
- Zhang, Q., Cao, C., Mangano, M., Zhang, Z., Silldorff, E. P., Lee-Kwon, W., Payne, K., & Pallone, T. L. (2006). Descending vasa recta endothelium is an electrical syncytium. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(6), R1688-R1699. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00261.2006
- Zlokovic, B. V. (2008a). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. En Neuron (Vol. 57, Número 2, pp. 178-201). Neuron. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K. A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (2003) a. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience*, 6(1), 43-50. https://doi.org/10.1038/nn980
- Zonta, M., Sebelin, A., Gobbo, S., Fellin, T., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (2003) b. Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *Journal of Physiology*, 553(2), 407-414. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046706

#### 8. ANEXO 1

#### 8.1- Componentes de la BHE: endotelio y membrana basal

#### Células Endoteliales Capilares

Los capilares cerebrales están formados por una única capa de células endoteliales, su superficie abluminal está cubierta por la membrana basal compuesta por matriz extracelular (Bloom y Fawcett, 1988). En el sistema nervioso central (SNC) las células endoteliales no tienen fenestraciones; ellas están unidas entre sí mediante uniones estrechas (UE) y uniones adherentes (UA) que limitan la permeabilidad paracelular entre la sangre y el parénquima celular (Abbott et al., 2010; Ballabh et al., 2004; Daneman & Prat, 2015; Yamazaki & Kanekiyo, 2017). Las UE de las células endoteliales del SNC crean una barrera paracelular de alta resistencia que impide el pasaje de moléculas e iones (Daneman & Prat, 2015). Una serie de proteínas transmembrana [ej. claudinas, ocludinas, y moléculas de adhesión y unión (JAM)] son las implicadas en la construcción de las UE junto a las proteínas accesorias citoplasmáticas (ZO-1, ZO-2, ZO-3, cingulina y otras). (Ballabh et al, 2004, Abbott et al, 2010, Daneman et Prat, 2015, Yamazaki & Kenekiyo, 2017). Estas proteínas citoplasmáticas funcionan como nexo entre las UE y la proteína citoplasmática actina, que forma el citoesqueleto primario celular y es el encargado del mantenimiento, de la integridad estructural y funcional del endotelio. Las UA están formadas por complejos cadherina-catenina, los dominios extracelulares de las cadherinas de la superficie de las células endoteliales adyacentes se encuentran unidos entre sí, mientras que los dominios citoplasmáticos se unen a la catenina que está unida a la actina del citoesqueleto (Ballabh et al, 2014). Esto restringe en gran medida el tráfico vesicular impidiendo el movimiento transcelular de solutos (Coomber & Stewart, 1985). El limitado tráfico paracelular y la barrera transcelular generada por las UE y UA determinan que la célula endotelial presente una polaridad estructural y funcional entre su membrana plasmática luminal (apical) y abluminal (basal), lo cual es esencial para el correcto funcionamiento de la BHE y el preciso control del movimiento de sustancias entre la sangre y el cerebro (Daneman & Prat, 2015; Zlokovic, 2008). Múltiples moléculas específicas pueden transportarse a través de la BHE, para esto se han determinado cinco grupos de transportadores trans-endoteliales bidireccionales encargados del transporte a través de la BHE: (1) carriers (ej. Glucosa, AA, hormonas, nucleótidos), (2) transportadores iónicos (ej. bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, cotransportador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>), (3) transportadores de eflujo activo (transportadores ABC, multidrogas), (4) receptores y transportadores de péptidos y proteínas y (5) cavéolas (zonas "raft" enriquecidas en caveolina-1 contienen receptores para transferrina, insulina, albumina, etc) (Correale & Villa, 2009; Daneman & Prat, 2015; Yamazaki & Kanekiyo, 2017; Zlokovic, 2008).

#### <u>La Membrana Basal</u>

Los capilares están rodeados por dos membranas basales (MB): la MB vascular interna y MB parenquimatosa externa, también denominada glía limitante perivascular (Del Zoppo et al., 2006; Sorokin, 2010). La MB vascular interna es una matriz extracelular, secretada por las células endoteliales y por los pericitos, mientras que la MB parenquimatosa es secretada principalmente por los astrocitos mediante sus procesos (pies) que se extienden hacia la vasculatura. Estas membranas basales están compuestas por moléculas que incluyen colágeno tipo IV, proteoglicanos de sulfato de heparina, laminina y otras glicoproteínas (por ej. Nidógenos) (Wu et al., 2009; Yamazaki & Kanekiyo, 2017). Estas membranas proporcionan un ancla para las células que forman la BHE y para los receptores contribuyendo en los procesos de señalización; también proporcionan una barrera física abluminal adicional para moléculas y células antes de acceder al tejido neural (Sorokin 2010, Daneman & Prat, 2015, Yamazaki & Kenekiyo, 2017). Además, la MB contribuye en el mantenimiento y en la comunicación de las células de la BHE; la matriz extracelular media diversas señales del endotelio y de los pericitos (Sorokin, 2010). De hecho, se ha demostrado que los componentes de la membrana basal regulan la localización celular de la ocludina en las células endoteliales, lo que influye en la estabilidad de la barrera (Savettieri et al., 2000).

#### 8.2- La relación de los pericitos con las células vecinas: endotelio y astrocitos

Como se describió anteriormente, los pericitos están separados de las células endoteliales por la MB. Sin embargo, en puntos discretos, las dos células se contactan entre sí en áreas desprovistas de MB. El número y el tamaño de los contactos pericito-endotelio pueden variar entre los tejidos, pero se han descrito hasta 1.000 contactos para una sola célula endotelial. Los contactos son de tipo "peg and socket", en los que el pericito proyecta "dedos" citoplasmáticos (peg) que se insertan en las invaginaciones endoteliales (socket) (Armulik et al., 2011). En estos puntos de comunicación se han descrito uniones estrechas y adherentes, al parecer la función de estas uniones son las de soporte y transmisión de la fuerza entre los pericitos y la célula endotelial (Armulik et al., 2005). También se han descrito uniones *gap* o en hendidura principalmente de Cx43, que forman vías para el intercambio de moléculas de señalización, iones, solutos y nutrientes entre las células endoteliales y los pericitos (Armulik et al., 2011, Bonkowski et al., 2011, Ivanova et al., 2017, 2019, Kovacs-Oller et al., 2020 a,b). El conjunto de uniones permite al pericito facilitar e integrar la comunicación celular, un solo pericito a menudo contacta varias células endoteliales vecinas (Armulik et al., 2011). Recientemente se han reportado estructuras denominadas "nano-túbulos" que comunican células distantes entre sí. Los "nano-túbulos" conectan pericitos con pericitos y/o pericitos con células endoteliales. Esta estructura nanotubular parece tener un papel principal en las fases iniciales de la angiogénesis cerebral tanto fisiológica como tumoral (Errede et al., 2018) y recientemente se los ha vinculado en el acoplamiento neurovascular (Alarcon-Martinez et al., 2020).

A nivel capilar, los pies astrocitarios y los pericitos están estructuralmente entrelazados envolviendo la pared endotelial externa de los capilares. Este vínculo es estratégico ya que permite la comunicación de los pericitos con las células endoteliales y células gliales (ej., astrocitos y microglia). El ensamblaje íntimo endotelio-pericito-astrocito es mantenido por la MB y regulado a nivel celular por proteínas de unión, incluyendo conexinas y N-cadherinas (Mathiisen et al., 2010, Sweeney et al., 2016, Giannonni et al., 2018). Se ha demostrado que la interacción de estas células es necesaria para el desarrollo, la localización y la polarización de los transportadores ABC (ATP-binding cassette transporters) en las células endoteliales (Al Ahmad et al., 2009). Durante la angiogénesis, la comunicación astrocito-pericito media el depósito de MB y se ha postulado que esta comunicación es necesaria para la síntesis de fibronectina pericitaria (Giannoni et al., 2018).

# 8.3- Resultados Suplementarios: Inmuno-fluorescencia para la conexina 43 y el receptor P2X<sub>7</sub> en pericitos



**Figura anexa. Inmuno-fluorescencia para conexina 43 (Cx43) y para el receptor P2X**<sup>7</sup> **en rodajas agudas de hipocampo de ratones salvajes.** A. Los pericitos fueron evidenciados con TO-PRO-3 (verde), los astrocitos (rosados) con GFAP y la Cx43 por inmuno marcaje (blanco). En la imagen inferior se observa la ampliación de un pericito, y la cabeza de flecha (roja) marca la Cx43 a nivel de la membrana. B. El pericito se evidencia con TO-PRO-3 (verde) y el receptor purinérgico P2X<sup>7</sup> por inmuno-marcaje (rojo) en la membrana celular. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). Escala 5mm.

8.4- Publicaciones derivadas de esta tesis

#### ORIGINAL ARTICLE

Revised: 27 August 2020



#### WILEY

# A nuclear fluorescent dye identifies pericytes at the neurovascular unit

Sandra P. Mai-Morente<sup>1</sup> Verónica Abudara<sup>1</sup> 🝺

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup>Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

#### Correspondence

Verónica Abudara, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, General Flores 2125, Montevideo, CP 11800, Uruguay. Email: abudara@fmed.edu.uy

#### FUNDING INFORMATION

This work was supported by the "Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República Oriental del Uruguay" (Proyecto de Investigación y Desarrollo CSIC I+D 2014, ID 48 to VA; Proyecto de Iniciación a la Investigación 2017, ID 139 to EEI; and financial support for Full-Time researchers to VA and FB), and by "Agencia Nacional de Investigación e Innovación-ANII-Uruguay" (Proyecto de Investigación Fundamental Fondo Clemente Estable FCE\_1\_2017\_1\_136103 to VA, Doctoral Fellowship to SPM and Master Fellowship to VM).

Sandra P. Mai-Morente<sup>1</sup> | Virginia M. Marset<sup>1</sup> | Fabiana Blanco<sup>2</sup> | Eugenia E. Isasi<sup>3</sup> |

ournal of

eurochemistry

#### Abstract

Perivascular pericytes are key regulators of the blood-brain barrier, vascular development, and cerebral blood flow. Deciphering pericyte roles in health and disease requires cellular tracking; yet, pericyte identification remains challenging. A previous study reported that the far-red fluorophore TO-PRO-3 (642/661), usually employed as a nuclear dye in fixed tissue, was selectively captured by live pericytes from the subventricular zone. Herein, we validated TO-PRO-3 as a specific pericyte tracer in the nervous system (NS). Living pericytes from ex vivo murine hippocampus, cortex, spinal cord, and retina robustly incorporated TO-PRO-3. Classical pericyte immunomarkers such as chondroitin sulphate proteoglycan neuron-glial antigen 2 (NG2) and platelet-derived growth factor receptor beta antigen (PDGFr $\beta$ ) and the new pericyte dye NeuroTrace 500/525 confirmed cellular specificity of dye uptake. The TO-PRO-3 signal enabled quantification of pericytes density and morphometry; likewise, TO-PRO-3 labeling allowed visualization of pericytes associated with other components of the neurovascular unit. A subset of TO-PRO-3 stained cells expressed the contractile protein  $\alpha$ -SMA, indicative of their ability to control the capillary diameter. Uptake of TO-PRO-3 was independent of connexin/pannexin channels but was highly sensitive to temperature and showed saturation, suggesting that a yet unidentified protein-mediated active transport sustained dye incorporation. We conclude that TO-PRO-3 labeling provides a reliable and simple tool for the bioimaging of pericytes in the murine NS microvasculature.

#### KEYWORDS

blood-brain barrier, neurovascular unit, pericytes imaging, TO-PRO-3

Abbreviations: ACSF, artificial cerebrospinal fluid; AU, arbitrary units; BBB, blood-brain barrier; BSA, bovine serum albumin; CBX, carbenoxolone; CNS, central nervous system; Cx, connexin; DAPI, 2-[4-(Aminoiminomethyl) phenyl]-1H-Indole-6-carboximidamide hydrochloride; ECs, endothelial cells; FITC, fluorescein isothiocyanate; GFAP, glial fibrillary acidic protein; ISOB4, Isolectin B4; IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; NeuN, neuronal nuclear protein; NG2, chondroitin sulfate proteoglycan neuron-glial antigen 2; NVU, neurovascular unit; Panx1, Pannexin1; PBS, phosphate-buffered saline; PBST, phosphate-buffered saline with Triton; PDGFRβ, platelet-derived growth factor receptor beta; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule; PFA, paraformaldehyde; α-SMA, alpha-smooth muscle actin; TO-PRO-3, quinolinium, 4-[3-(3-methyl-2(3H)-benzothiazolylidene)-1-propenyl]-1-[3-(trimethylammonio) propyl]-, diiodide/ 157199-63-8; VSMCs, vascular smooth muscle cells.

#### Journal of <u>Neuroche</u>mistry INTRODUCTION 1

WILEY-

Capillary pericytes are essential constituents of the neurovascular unit (NVU) that play pivotal roles in the maintenance and regulation of the blood-brain barrier (BBB) (Armulik et al., 2010), vascular development (Daneman et al., 2010), and cerebral blood flow. Nonetheless, their relative contribution to hyperemia and neurovascular coupling remains under debate (Attwell et al., 2016; Fernández-Klett et al., 2010; Grutzendler & Nedergaard, 2019; Hall et al., 2014; Hill et al., 2015; Kisler et al., 2017, 2020; Kisler, et al., 2017; Mishra et al., 2016; Nelson et al., 2020; Peppiatt et al., 2006). Loss and dysfunction of contractile pericytes are believed to exacerbate neuropathological conditions associated with impairments of microvasculature and neuronal energy supply such as ischemia (Kisler, et al., 2017; Montagne et al., 2018; Nikolakopoulou et al., 2019; Yemisci et al., 2009) and Alzheimer's disease (Hamilton et al., 2010; Montagne et al., 2015, 2020; Nation et al., 2019; Nortley et al., 2019; Sagare et al., 2013).

Unravelling pericytes' functions in physiological and pathological conditions requires identification of pericytes; thus far, recognition of these mural cells is still a matter of research. Pericytes are routinely identified based on the expression of their surface antigens, typically the chondroitin sulfate proteoglycan neuron-glial antigen 2 (NG2) and the platelet-derived growth factor receptor beta antigen (PDGFr<sub>β</sub>) (Hartmann et al., 2015a, b; Lindahl et al., 1997; Ozerdem et al., 2001; Smyth et al., 2018). Accordingly, transgenic mouse lines commonly used to visualize pericytes are driven by promoters for NG2 and PDGFr<sub>β</sub>; these reporter mice allow for fluorescence imaging of cerebral pericytes ex vivo and in vivo (Mishra et al., 2014; Hartmann, et al., 2015a,b; Jung et al., 2018). However, using transgenic lines or immunohistochemistry to track pericytes in studies employing mouse models, becomes expensive and time-consuming. Moreover, PDGFr<sup>β</sup> and NG2 antigens are also present in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and oligodendrocyte progenitors (He et al., 2016; Nishiyama et al., 2009) and other pericyte molecular markers such as desmin and CD13 are also expressed by vascular cells (Armulik et al., 2010; Jung et al., 2018; Smyth et al., 2018). Then, unambiguous discrimination between pericytes and VSMCs (which is a determinant to assess their relative role in neurovascular coupling) remains a subject of study (Attwell et al., 2016; Fernández-Klett et al., 2010; Grutzendler & Nedergaard, 2019; Hall et al., 2014; Hill et al., 2015; Peppiatt et al., 2006). In the future, identification of genes exclusively expressed by pericapillary pericytes might provide cues to differentiate pericytes from VSMCs (Bondjers et al., 2006; Chasseigneaux et al., 2018; He et al., 2016; Vanlandewijck et al., 2018). Recently, the fluorophore NeuroTrace 500/525, which normally stains neurons in fixed tissue, has been shown to selectively label brain capillary pericytes if administered in vivo; so far NeuroTrace 500/525 does not trace VSMCs (Damisah et al., 2017).

In this scenario, previous work has reported that the fluorophore TO-PRO-3 lodide (642/661), usually employed as a nuclear stain in fixed sections, labels perivascular pericytes from the post-natal subventricular zone when applied to acute slices (Lacar et al., 2012). The

TO-PRO-3 dye is a carbocyanine monomer with higher affinity for DNA than for RNA that has been typically used in fixed preparations for immunofluorescence counter-staining and for measuring relative DNA content (Van Hooijdonk et al., 1994; de Mazière et al., 1996; Suzuki et al., 1997). However, in the living tissue TO-PRO-3 becomes a pericyte marker. Brain slices with TO-PRO-3-stained pericytes of the post-natal subventricular zone have been used for live imaging and immunostaining post-fixation (Lacar et al., 2012). Until now, the latter study is the only publication supporting the role of TO-PRO-3 as a pericyte tracer, but neither its specificity nor its staining properties have been further elucidated.

Herein, we show that living pericytes of the nervous system selectively uptake the fluorescent nuclear tracer TO-PRO-3 allowing their unambiguous identification. We characterized morphometry, abundance,  $\alpha$ -SMA-expression, rapports, and mechanisms supporting dve uptake of TO-PRO-3<sup>+</sup>-pericvtes. Based on our findings, we conclude that TO-PRO-3 labeling provides a powerful tool to target capillary pericytes at the neurovascular interface.

#### MATERIALS AND METHODS 2

#### 2.1 | Animals

Experimental procedures were conducted following the National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the local regulation [CDC Exp. 4332/99, Diario Oficial No. 25467, Feb. 21/00, Universidad de la República, Uruguay]. The Committee on Animal Research Ethics (Law 18.611) (Facultad de Medicina - Udelar) approved the protocol. The ARRIVE guidelines have been followed. To minimize the number of animals used and their suffering, we tested several conditions in slices derived from the same animal. Mice (Mus musculus; P20-P30 unless specified) on a C57BL/6 background and rats (Sprague-Dawley; P30) from both sexes were used (57 mice and 6 rats). Mice (RRID: IMSR\_JAX:000664) were supplied by the Jackson Laboratory and rats (SD, Strain code 400) were acquired from Charles River Laboratories. Animals were bred and housed in a temperature- and humidity-controlled room on a 12-hr light/dark cycle at the Unit of Experimental Reactives and Biomodels (URBE - Facultad de Medicina). All these animals were fed ad libitum with chow diet and water. At the time of assaying, mice and rats weighed respectively 10-13 g and 40-100 g. We conducted most experiments at 11 a.m.-3 p.m. No blinding was performed, neither during experiments nor during analysis. No exclusion criteria were pre-determined; animals were arbitrarily assigned in the study.

#### **Reagents and antibodies** 2.2

The fluorescent markers, Fluorescein isothiocyanate-dextran 70,000 (FITC-Dextran 70S; FD70S; cat.no. 46945), 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI dihydrochloride (DAPI; cat.no. D09542) and Isolectin B4 conjugated to fluorescein (FITC-ISOB4; cat.no. L2895) were acquired from Sigma-Aldrich. The dves TO-PRO<sup>™</sup>-3 lodide 642/661 (cat. no. T3605) and Neurotrace<sup>™</sup> 500/525 Green Fluorescent Nissl (cat.no. N21480) were from ThermoFisher Scientific. The connexin/pannexin blocker carbenoxolone (CBX; cat.no. C4790) was purchased from Sigma-Aldrich; the mimetic peptide against pannexin1 (<sup>10</sup>Panx1; cat.no. 707231 5) was synthesized by GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ 08854, USA). Primary antibodies rabbit polyclonal anti-PDGFr<sup>β</sup> (cat.no. ab107169, RRID: AB\_11156765), rabbit monoclonal anti-NeuN neuronal marker (cat.no. ab177487, RRID: AB\_2532109), and rabbit monoclonal anti-α-SMA (cat.no. ab124964, RRID: AB 11129103) were purchased from Abcam. Mouse monoclonal anti-NG2 (cat.no. MAB5384, RRID: AB 177646) was supplied by Millipore and mouse monoclonal anti-GFAP (cat.no. C9205, RRID: AB 476889) was purchased from Sigma-Aldrich. The mouse monoclonal anti-PECAM-1 (cat.no. 2H8, RRID: AB\_2161039) developed by Bogen, S.A. (Pathology & Lab Medicine, Boston University) was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at the University of Iowa, Department of Biology, 52242. Secondary antibodies Alexa Fluor 488 anti-rabbit (cat.no. 711-545-152, RRID: AB\_2313584) or antimouse (cat.no. 715-545-151, RRID: AB\_2341099) and Cy3 antirabbit (cat.no. 111-165-003, RRID: AB 2338000) or anti-mouse (cat.no. 115-165-003, RRID: AB\_2338680) were from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. antibodies.

### 2.3 | Hippocampal, cortical, and spinal cord acute slices

Acute brain slices (300  $\mu$ m thick) were prepared from C57BL/6 mice and *SD* rats; acute spinal slices (350  $\mu$ m thick) were prepared from *SD* rats. Animals were decapitated under inhalation anesthesia with isoflurane (4%–5%). Dissected hippocampi, brain hemispheres, and spinal cords were glued to the platform of a vibroslicer chamber containing ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) whose composition was (in mM): NaCl 134; KCl 2.8; NaHCO<sub>3</sub> 29; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1; glucose 12; MgSO<sub>4</sub> 1.5; CaCl<sub>2</sub> 2.5. Transverse hippocampal slices, coronal brain slices comprising the somatosensory cortex, and spinal cord slices from the lumbar area were transferred to a storage chamber where they rested on a nylon mesh, submerged in ACSF at room temperature (RT) for a stabilization period of 45 min before use. The ACSF solution was equilibrated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4).

#### 2.4 | Whole-mount retinas

Whole-mount retinas were prepared from C57BL/6 mice as reported (Ivanova et al., 2013). To perform retina dissection, enucleated eyes were immersed in physiological saline solution (N-HEPES) containing (in mM): NaCl 135.5; KCl 5.9; MgCl<sub>2</sub> 1.2; Hepes 11.6; Glucose 11.5; CaCl<sub>2</sub> 1.8 (pH 7.4). Eyes were held by the optic nerve while cutting and removing the cornea and sclera; the iris, lens, and vitreous were pulled out with forceps. The retina was detached from the eyecup and the optic nerve cut. The entire retina was flattened by making 3–6 small incisions in its periphery. After, the whole retina was mounted onto the membrane filter (MF-Millipore<sup>TM</sup>, 0.45  $\mu$ m pore size, gridded) and incubated in N-HEPES for a stabilization period of 20 min before incubating in TO-PRO-3.

### 2.5 | Loading spinal and cerebral slices and retinas with TO-PRO-3

Pericytes from acute slices and isolated retinas were labeled with the fluorescent tracer TO-PRO-3 following a previously reported technique with some modifications (Lacar et al., 2012). The general procedure is depicted in Figure 1a. Unless specified, the dye was added into the ACSF or N-HEPES physiological solutions at 1 µM final concentration from a 1-mM stock solution dissolved in DMSO. Acute slices and whole-mount retinas were incubated at RT in TO-PRO-3containing ASCF or N-HEPES respectively for 20 min. Then preparations were rinsed for 15 min with physiological solutions to stop dye uptake and reduce background labeling. Afterward, sections were either submerged in fixing solution (4% paraformaldehyde-PFA in PBS; 40 min) or used in living experiments. Fixed slices and retinas were rinsed twice in PBS for 15 min under shaking, labeled with DAPI (1 µM; 10 min), rinsed once again in PBS, and mounted in mounting medium. In few experiments, the dye TO-PRO-3 was applied either by retro-orbital injection of the venous sinus in the eye retro-bulbar space (Yardeni et al., 2011) under inhalation anesthesia (isoflurane 4%-5%) or by intraperitoneal injection; slices were obtained shortly after (30 min-1 hr). In both cases, we found no labeling of TO-PRO-3 in slices. Our study was not pre-registered.

### 2.6 | Blocking TO-PRO-3 uptake in acute hippocampal slices

In blocking experiments, acute slices were treated with the general Cx/Panx1 inhibitor carbenoxolone (CBX) or the blocking mimetic peptide against pannexin1 (<sup>10</sup>Panx1) during the last 20 min of uptake recording (Figure 8a). The CBX solution was prepared from a 10-mM stock solution dissolved in physiological saline, then applied to slices at 100  $\mu$ M, whereas <sup>10</sup>Panx1 was directly dissolved in ACSF, and administered at 150  $\mu$ M final concentration.

### 2.7 | Labeling TO-PRO-3-pre-loaded pericytes with Neurotrace 500/525 in acute brain slices

To evidence colocalization between TO-PRO-3 and NeuroTrace 500/525 labeling, acute hippocampal slices previously loaded with



TO-PRO-3 were incubated at RT for 20 min in ACSF containing the dye NeuroTrace 500/525 (1:25 and 1:500 dilutions). Then slices were washed in ACSF for 15 min and either fixed in fixing solution (PFA, 4%; 40 min) or employed in living experiments (Figure 5a and c).

#### 2.8 | Vessel staining

Mice were placed in the chamber of an inhalation anesthesia equipment (VETEQUIP impac 6) and rapidly anesthetized with isoflurane (4%-5%) which presents ample potency and a protective effect in vital tissues (Eger, 2004). The membrane-impermeable dye FITCdextran (FITC-Dextran-70S; 2–4 mg dissolved in 100  $\mu L$  of physiological solution) was administered by retro-orbital injection of the venous sinus in the eye retro-bulbar space (Yardeni et al., 2011) by using an insulin needle and syringe. After recovery, the mouse brain was removed to obtain acute hippocampal slices as described above. In another set of experiments, TO-PRO-3 pre-loaded slices were incubated at 37°C with Isolectin B4 (FITC-ISOB4; 5 µg/ml) for 1 hr and then rinsed in ACSF for 15 min. Next, the living slices were fixed in a fixing solution (4% paraformaldehyde in PBS; 40 min) and then rinsed twice for 15 min in PBS. Following washes, slices were exposed for 10 min to 2-[4-(Aminoiminomethyl) phenyl]-1H-Indole-6-carboximidamide hydrochloride (DAPI; 1-5 μM diluted in PBST) and rinsed again.

FIGURE 1 TO-PRO-3 labels hippocampal pericyte-like cells in slices of murine. (a) The scheme depicts the temporal course of the experimental procedure designed to label pericytes with TO-PRO-3 in acute brain slices. (b) Left: scheme of a coronal brain slice including the hippocampus (sky blue box). Right: Fluorescent microphotographs of mice hippocampus (z stacks reconstructed images from the Stratum Radiatum; the fluorescent field (picture a) and its inverted fluorescence image (picture a') illustrate TO-PRO-3<sup>+</sup> pericyte-like somas in bright green (a) and black (a') where cellular morphology and prolongations are evident. (c) Fluorescent microphotographs of mice hippocampus (Stratum Radiatum; same field in pictures a-a<sup>(')</sup> show bright TO-PRO-3<sup>+</sup> pericyte-like somas (green) giving rise to prolongations that intermix (black in the inverted fluorescent image a'). Cellular nucleus stained with DAPI was merged to (picture a) in (picture a''). Each image is representative of hippocampi from nine mice. (d) A typical pericyte is depicted by using DIC (Differential interference contrast) microscopy (see a); the DIC picture (a) was merged to fluorescent images to display the pericyte nucleus marked with DAPI (picture a') and the soma stained with TO-PRO-3 (picture a''). Image is representative of hippocampi of three mice. (e) Frequency distribution of the TO-PRO-3<sup>+</sup> pericyte-like cells density in mice hippocampus (bin 1000, n = 13 hippocampi from 3 mice). (f) TO-PRO-3 uptake by pericyte-like cells of the mouse at different ages. The graph illustrates the TO-PRO-3 uptake (mean  $\pm$  SEM) in arbitrary units (AU) for pericytes of hippocampal slices derived from mice from three different age ranges; (P06-P14, n = 112pericytes from 3 mice; P20-P30, n = 174 pericytes from 3 mice; P80-P90, n = 117 pericytes from 3 mice). ns, non-significant, comparison between 2 values indicated by horizontal bars, Kruskal-Wallis-test followed by Dunn post-test. Each dot represents the uptake value for a single cell. (g) TO-PRO-3 labels pericyte-like cells in rat hippocampus (Stratum Radiatum). The fluorescent image is representative of the hippocampi of six rats. (h) TO-PRO-3-labeled cells line up to the brain vasculature. Two different hippocampal areas displayed in fluorescent (picture a) and inverted fluorescent (picture b) images illustrate TO-PRO-3 stained pericyte-like cells in close association with vessels marked by Isolectin B₄ conjugated to fluorescein (FITC-ISOB4). Basement membranes of endothelium and pericytes marked by FITC-ISOB4 outline TO-PRO-3-labeled somas (same field in pictures c-c'). Images are representative of three mice. In all these examples, fixed slices are shown

#### 2.9 | Imaging and quantification of TO-PRO-3 uptake

Sections were mounted onto the stage of a confocal microscope (Leica SP5 TANDEM SCANNER) and labeled cells were visualized with a 40x oil immersion objective Leica N.A 1,3 with UV correction. Image stacks were captured with the LAS AF Lite Software in data mode xyz and acquired with appropriate filters for DAPI (excitation/emission 358/461 nm), NeuroTrace (excitation/emission 500/525 nm) or fluorescein (excitation/emission 488/515 nm) and TO-PRO-3 (excitation/emission 642/661 nm). Within the range of fluorescence gain used, we did not appreciate bleeding of TO-PRO-3 emission through other channels. Microscope and camera settings were set to allow measurements within the dynamic range of the fluorescence intensities and remained the same in experiments in which comparisons were made. During living experiments, acute loaded slices were held on the bottom of a homemade flow-through chamber and perfused with ACSF (1 ml/min) equilibrated with a mixture of 95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$ . To evaluate the impact of different doses of TO-PRO-3 and variations of the temperature on dye uptake, the TO-PRO-3 fluorescence was quantified in arbitrary units (AU) with image processing software Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). TO-PRO-3 intensities were evaluated as the difference (F-F<sub>0</sub>) between the fluorescence (F) from pericytes and the background fluorescence (F<sub>0</sub>) measured in the same field where no labeled cells were detected. At least three fields were selected in every slice.

#### 2.10 | Pericyte morphometry and density

To determine the length and number of longitudinal processes derived from TO-PRO-3-somas, consecutive confocal images of brain adjacent fields were superimposed to allow the reconstruction of pericyte processes. We measured the length of each prolongation from its emergence at the pericyte body until its division into primary branches using the Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA). Image stacks of the Stratum Radiatum from hippocampal slices were imported to a software (Adobe Photoshop CS6 13.0 × 64) and z stacks reconstructed and converted to a grayscale mode. Pericyte somas were counted in fields from z stacks reconstructed images; pericyte density was referred to the number of pericytes each mm<sup>3</sup> of brain volume analyzed.

#### 2.11 | Immunofluorescence

To block unspecific sites and permeabilize membranes, fixed preparations pre-loaded with TO-PRO-3 were placed in a multiwell dish and immersed for 2 hr in agitation in a blocking solution containing 2% bovine serum albumin (BSA) and 0.2 M glycine diluted in PBS with 0.5% Triton X-100 (PBST). For  $\alpha$ -SMA labeling, before fixing, some slices were incubated for 40 min in Jasplakinoide (20 µM), an F-actin stabilizing reagent that promotes actin filament polymerizing (Alarcón-Martínez et al., 2018; Holzinger, 2009), then rinsed with PBS and fixed either in PFA or in a mixture of 95% methanol and 5% acetic acid (Alarcón-Martínez et al., 2018). After three washes in PBST, fixed slices were incubated at 4°C for at least 24 hr in PBST containing 2% BSA (PBST-BSA) with primary antibodies anti-NG2 (1:250), anti-PDGFrβ (1:150), anti-GFAP (1:400), anti-NeuN (1:200), anti- $\alpha$ -SMA (1:300), and anti-PECAM-1 (1:10). Subsequently, slices were rinsed two times in PBST and incubated in dark for 2 hr in a secondary antibody diluted in the same medium (1:1,000). Following three washes with PBST, slices were treated for 10 min with DAPI (1-5  $\mu$ M diluted in PBST) and rinsed again. Finally, slices were mounted in glycerol and examined with a confocal laser-scanning microscope (Leica TBCS SP2). Confocal images were acquired with appropriate lasers and using the LAS AF Software in data mode xyz.

As a negative control, we omitted primary antibodies. In some trials, to unveil eventually masked antigen epitopes, we performed antigen retrieval for  $\alpha$ -SMA labeling by incubating fixed slices at 80°C for 30 min in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0, before the immunocytochemistry procedure.

#### 2.12 | Cell membrane integrity experiments

To assess the membrane integrity of TO-PRO-3 labeled pericytes, slices were incubated for 20 min in ACSF (95%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ ; pH 7.4) containing the membrane non-permeant FITC-dextran (FITC-Dextran-70000 kDa; 5 mg/ml). Subsequently, slices exposed to FITC-dextran were fixed (4% paraformaldehyde in PBS; 40 min), rinsed in PBS, and mounted in mounting medium until photomicrographs were taken. Labeled pericytes were visualized with a confocal laser-scanning microscope (Leica TBCS SP2) with filters appropriate for FITC (excitation/emission maxima 489/515 nm).

#### 2.13 | Statistics

Values are presented as mean  $\pm$  SEM. Analysis of distribution was done before a statistical test, using GraphPad InStat 3.06 (California Corporation). In cases where sample distribution did not pass the normality test (KS), non-parametric data were analyzed using twotailed Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn post-test. In all experiments, the level of significance was set at p < .05. Sample sizes were estimated based on reports assessing dye uptake; these require 3-4 slices per condition per animal and a minimum of three mice per condition (Abudara et al., 2015; Garré et al., 2010); no sample calculations were done. Statistical analysis/ graphics were performed with the GraphPad InStat 3.06 (California Corporation) software; figures were prepared with Adobe Photoshop CS6 13.0 × 64 and Adobe Illustrator CS6 16.0.0. We conducted no test for outliers.

#### 3 | RESULTS

### 3.1 | TO-PRO-3 strongly labels pericyte-like cells in the murine neurovascular unit

Incubation of acute hippocampal slices in TO-PRO-3-containing ACSF (Figure 1a) resulted in robust labeling of a subset of pericyte-like cells that strongly incorporated the fluorophore (TO-PRO-3<sup>+</sup> cells). The dye concentrated at spindle-shaped cellular bodies but also traced cellular processes (Figure 1b-d) that intermixed in an extensive meshed network (Figure 1(c)a'). The bright staining displayed by TO-PRO-3<sup>+</sup> cells was remarkably higher than the background, defined as the area devoid of marked cells, which gave a significant signal-to-noise ratio. The fluorescence intensity (mean  $\pm$  SEM) measured at the soma (F) was 41.93  $\pm$  1.96 (Arbitrary <sup>6</sup>└─WILEY─

Journal of Neurochemistry

Units or AU), whereas the background fluorescence  $(F_0)$  was  $1.96 \pm 0.09$  AU (p < .0001, Wilcoxon matched paired test; n = 123TO-PRO-3<sup>+</sup> cells from 4 mice); the mean signal-to-background ratio F/F<sub>o</sub> was 50.3 times. Usually, healthy slices showed high F/F<sub>o</sub> ratios. Fixed sections stored at 4°C, preserved the bright stain for at least 1-1.5 months. Increasing the fluorescence intensity gain revealed TO-PRO-3<sup>+</sup>-nucleoli in pyramidal neurons but solely pericyte-like cells displayed bright and extensive labeling. In mouse hippocampi, the mean density of TO-PRO-3<sup>+</sup> pericyte-like cells was  $4,454 \pm 451$  cells/mm<sup>3</sup>, most density values ranged between  $3x10^3$  and  $5x10^3$  TO-PRO-3<sup>+</sup> cells/mm<sup>3</sup> (n = 13 hippocampi from 9 mice) (Figure 1e). These values were consistent with the densities of pericytes previously identified with NeuroTrace 500/525 (Damisah et al., 2017). Although we typically used P20-P30 mice, TO-PRO-3 also labeled pericyte-like cells at earlier stages of development (P06-P14 mice) and during adulthood (P80-90 mice) (Figure 1f and S1). Quantification of TO-PRO-3 uptake by TO-PRO-3<sup>+</sup> pericyte-like cells yielded (mean  $\pm$  SEM) 19.5  $\pm$  0.97 AU for P06-P14 mice (n = 112 cells from 3 mice), 20.1  $\pm$  0.92 AU for P20-P30 mice (n = 174 cells from 3 mice), and 21.96  $\pm$  0.99 AU for P80-P90 mice (n = 117 cells from 3 mice). We found no differences between these groups (ns: non-significant, Kruskal-Wallistest followed by Dunn post-test) (Figure 1f). In addition to mouse areas, TO-PRO-3 also stained pericyte-like cells in the hippocampus and spinal cord of rats (Figure 1g; Figure S2).

The TO-PRO-3<sup>+</sup> pericyte-like cells typically aligned to the cerebrovasculature, specifically to the smallest caliber vessels, presumably capillaries (Figures 1h and 2). Figure 1h displays the close association between labeled cells and vessel walls identified by FITC-ISOB4 which specifically binds to  $\alpha$ -D-galactose residues in basement membranes of endothelium and pericytes (Laitinen, 1987; Peters & Goldstein, 1979; Mishra et al., 2014). As expected, FITC-ISOB4 staining outlined the somas of TO-PRO-3<sup>+</sup> pericyte-like cells (Figure 1h, c-c'). Figure 2 (a-c') depicts the general arrangement of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells in adjacency to thin hippocampal vessels. Figure 2d illustrates a representative labeled soma juxtaposed to the abluminal wall of a capillary in c presenting a diameter less than 10  $\mu$ m and devoid of a continuous layer of  $\alpha$ SMA; conversely, TO-PRO-3<sup>+</sup> cells did not show intimate association to arterioles (see picture b).

Cells labeled by TO-PRO-3 exhibited the distinctive morphological features of pericytes; somas were fusiform while giving rise to slim prolongations that extended several micrometers away as it is characteristic of pericytes (Figure 3). The TO-PRO-3<sup>+</sup> prolongations originated from somas projected longitudinally along vessels (Figure 3a and b, arrowheads) while branching out to new processes (Figure 3a and b, arrows). The length of the longitudinal TO-PRO-3<sup>+</sup> processes derived from somas ranged between 2 and 110 µm and the majority (63%) measured between 12 and 42 µm (n = 142 processes from 7 mice) (Figure 3c and c'). The characteristic fusiform cell bodies of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells were also found in other areas of the nervous system including the somatosensory cortex (Figure S1), the spinal cord (Figure S2), and the retina (Figure S3). In the mouse



FIGURE 2 TO-PRO-3-labeled cells align with blood microvessels. (a and b) Left panels represent panoramic views of mice hippocampus with TO-PRO-3-labeled pericyte-like cells associated with the brain vasculature. Right panels depict zoomed areas framed by yellow boxes in left pictures. Fluorescent images showing TO-PRO-3-stained pericytes and FITC-Dextran-marked vessels in (a) and (b) were merged to their respective DIC versions in (a') and the zoomed view of the selected area in (b); note the scarcity of pericytes adjacent to large vessels. (c-c<sup>2</sup>) TO-PRO-3<sup>+</sup> cells associate with thin vessels. A general view of a hippocampal area illustrates TO-PRO-3-labeled cells resting on thin FITC-Dextran-marked vessels; the inverted fluorescent version (c') of the fluorescent field (c) allows visualization of small vessels. (d) TO-PRO-3<sup>+</sup> cells rest on capillaries but not on arterioles. The inverted fluorescent picture (picture a) aims to show pericyte somas (green) associated with small diameter vessels (contours of vessels in dark violet). Fluorescent photographs of mice hippocampus display brightly TO-PRO-3<sup>+</sup> cells unrelated to  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> arterioles (picture b) and a TO-PRO-3-labeled pericyte soma adjacent to a microvessel (picture c). Each image is representative of five mice

retina, however, labeling seemed to span other cell types, mostly at the emergence of the optic nerve (not shown).

In summary, based on their morphology, perivascular location, and abundance, the TO-PRO- $3^+$  cells from the murine nervous system, looked like pericytes.

To confirm the identity of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells, we first addressed the specificity of TO-PRO-3 labeling by immunofluorescence. To do so, mice hippocampal slices previously loaded with TO-PRO-3 were counter-immunostained with antibodies against the classical pericyte markers transmembranous chondroitin sulfate proteoglycan neuron-glial antigen 2 and the platelet-derived growth factor receptor beta antigen (Figure 4a) (Hartmann, et al., 2015a,b; Lindahl et al., 1997; Ozerdem et al., 2001; Smyth et al., 2018). In the hippocampus, the majority of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells showed co-labeling



**FIGURE 3** TO-PRO-3 images cellular prolongations of pericytelike cells in mouse hippocampus. (a) The fluorescent photograph displays a representative field of Stratum Radiatum with TO-PRO-3 brightly labeled pericyte-like somas that originate primary longitudinal prolongations (arrowheads in zoomed yellow box) giving rise to secondary processes (arrow in zoomed yellow box). (b) Fluorescent views depict hippocampal pericyte somas giving rise to TO-PRO-3<sup>+</sup> processes (pictures a-c); to aid visualization of prolongations, the level of fluorescence was increased within white boxes. Arrowheads indicate the emergence of primary processes from pericytes somas in the zoomed area (yellow box in picture c); arrows point out the sites of bifurcations (pictures a and c). (c) Frequency distribution for primary processes length (in  $\mu$ m) of TO-PRO-3<sup>+</sup> pericytes (bin 5, n = 142 pericytes from 7 mice)

with PDGFrβ or NG2; the immunostaining pattern for both markers displayed a preferential distribution at the cell membrane unlike TO-PRO-3, which labeled the whole cell body (Figure 4b and c). The TO-PRO-3<sup>+</sup> cells protruded from the outer wall of blood vessels reminding the typical "bump-on-a-log" placement of pericytes (Rouget, 1873) (arrowheads in Figure 4b and c). In tissue sections, we found that 98% of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells were co-labeled with PDGFr $\beta$  $(n = 222 \text{ TO-PRO-3}^+ \text{ cells of } 49 \text{ fields from 5 mice})$  while 97% of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells were co-labeled with NG2 (n = 90 TO-PRO-3<sup>+</sup> cells of 22 fields from 3 mice) (Figure 4d). Importantly, most cells identified as pericytes captured TO-PRO-3. Accordingly, 91% of PDGFr $\beta^+$  cells adjacent to capillaries incorporated TO-PRO-3 ( $n = 244 \text{ PDGFr}\beta^+$ cells of 39 fields from 3 mice), 84% of NG2<sup>+</sup> cells associated to vessels took up TO-PRO-3 ( $n = 110 \text{ NG2}^+$  cells of 18 fields from 3 mice), whereas 99% of double-labeled PDGFr $\beta^+$ /NG2<sup>+</sup> cells were TO-PRO-3<sup>+</sup> (n = 88 PDGFr $\beta^+$ /NG2<sup>+</sup> cells of 30 fields from 3 mice).

A previous report has recently shown that the Green Fluorescent Nissl dye NeuroTrace 500/525 which usually stains neurons in fixed brain sections, identifies pericytes in vivo as distinct vascular mural cells, different from VSMCs (Damisah et al., 2017). We took advantage of this in vivo approach to label pericytes and adapted it to acute brain slices that we used in living or fixed experiments (procedures in Figure 5a and c). In slices, the NeuroTrace 500/525 staining concentrated at the soma and primary processes similarly as TO-PRO-3 (Figure 5b, d and e). About 95% of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells in hippocampus took up NeuroTrace 500/525 (n = 442 TO-PRO-3<sup>+</sup> cells of 55 fields from 4 mice) (Figure 5f). Double-labeled TO-PRO-3<sup>+</sup>/NeuroTrace500/525<sup>+</sup> cells were associated with blood



**FIGURE 4** Pericyte markers stain TO-PRO-3<sup>+</sup> cells in mouse hippocampus. (a) The diagram illustrates the procedure employed to stain pericytes with TO-PRO-3 and immunomarkers. (b) and (c) Fluorescent images display TO-PRO-3<sup>+</sup> cells co-stained with (b) PDGFr $\beta$  (same fields in pictures a-a' and b-b'') and (c) NG2 (same fields in pictures a-a' and b-b''). Arrowheads (a-a') point out pericytes contiguous to cerebral vessels that protrude reminding the typical "bump-on-a-log" placement of pericytes. Each image is representative of four mice. (d) The graph represents the percentage of hippocampal TO-PRO-3<sup>+</sup> cells co-labeled with the markers PDGFr $\beta$  (n = 222 TO-PRO-3<sup>+</sup> cells of 49 fields from 5 mice) and NG2 (n = 90 TO-PRO-3<sup>+</sup> cells of 22 fields from 3 mice)

vessels whose walls were occasionally delineated by prolongations (Figure 5(e)b<sup>\*\*\*</sup>). During living experiments (up to 6 hr duration), TO-PRO-3<sup>+</sup> cells showed no signs of toxicity (cellular disintegration, swelling or shrinkage) and morphological features remained stable. In time-lapse experiments, NeuroTrace 500/525 displayed a greater photostability than TO-PRO-3 labeling.

In summary, our findings demonstrated that hippocampal TO-PRO-3<sup>+</sup> cells expressed the classical pericyte immunomarkers NG2 and PDGFr $\beta$  and captured the pericyte dye NeuroTrace 500/525 providing evidence that they represented cerebral pericytes.

### 3.2 | The contractile protein $\alpha$ -SMA is detected in TO-PRO-3<sup>+</sup> cells

Consistent with the idea that capillary pericytes play a regulatory role in microcirculation, these cells are expected to express the contractile protein  $\alpha$ -SMA. Herein, we employed different strategies to identify  $\alpha$ -SMA in hippocampal TO-PRO-3<sup>+</sup> pericytes. Results



FIGURE 5 The pericyte marker NeuroTrace 500/525 stains TO-PRO-3-labeled cells in mouse hippocampus. Co-localization between NeuroTrace 500/525 and TO-PRO-3 is visualized in both fixed and living slices. (a) The diagram illustrates the experimental process employed to label pericytes with TO-PRO-3 and NeuroTrace 500/525 in hippocampal slices. Note that incorporation of both dyes into pericytes should be achieved in living tissue; slices were then fixed and analyzed. (b) Fluorescent pictures depict fixed slices with pericytes stained with TO-PRO-3 (a) and NeuroTrace 500/525 (a') in mice hippocampus (same field in a-a''; co-labeling in a+a' and a'' where the DAPI image was merged). (c) The diagram illustrates the experimental process employed to label hippocampal pericytes with TO-PRO-3 and NeuroTrace 500/525 in acute sections; living slices were then imaged and analyzed through confocal microscopy. (d) Representative fluorescent and brightfield pictures of mice hippocampal living slices display pericytes stained with TO-PRO-3 (green) and NeuroTrace 500/525 (red); co-labeling is shown in yellow. Same field in pictures (a-a+a'). Two pericytes indicated by arrows (a) were zoomed (b-b+b'+b''; same field). P: pericyte (b''; b+b'+b''). (e) Fluorescent pictures depict three different living pericapillar pericytes stained with TO-PRO-3 (green) and NeuroTrace 500/525 (red) in mouse hippocampus. Images in each file represent the same field. Note pericytes adjacent to vessels in brightfield views (a<sup>()</sup>, b<sup><math>()</sup></sup> and c<sup>()</sup>); the</sup> asterisk indicates blood accumulation in a vessel bifurcation (a<sup>('')</sup>). Each image is representative of four mice. (f) The graph represents the percentage of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells co-labeled with NeuroTrace 500/525 (*n* = 442 TO-PRO-3<sup>+</sup> cells of 55 fields from 4 mice)

were exemplified and summarized in Figure 6. Classical immunocytochemistry applied to hippocampal slices pre-loaded with TO-PRO-3 yielded immunoreactivity against the  $\alpha$ -SMA antibody in uniquely the 15% of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells (n = 106 TO-PRO-3<sup>+</sup> cells of



**FIGURE 6** TO-PRO-3 pericyte-like cells express  $\alpha$ -SMA. (a) Fluorescent pictures (a-a", same field) of pericyte-like cells identified with TO-PRO-3 show the expression of  $\alpha$ -SMA detected through conventional immunofluorescence. Note that pericytes resting on  $\alpha$ -SMA-expressing vessels (arrowheads in a-a+a') exhibit larger levels of  $\alpha$ -SMA stain than pericytes adjacent to non-expressing  $\alpha$ -SMA structures (asterisks in pictures a'-a+a'). The field within the white rectangle (pictures a-a<sup>()</sup>) was zoomed and is shown below. In zoomed views, the level of fluorescence was increased within the yellow boxes to visualize an  $\alpha$ -SMA-expressing TO-PRO-3<sup>+</sup> cell ( $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>; cell 1) next to a non-expressing TO-PRO-3<sup>+</sup> cell ( $\alpha$ -SMA<sup>-</sup>; cell 2). (b) Fluorescent pictures (a-a<sup>''</sup>, same field) show the expression of  $\alpha$ -SMA by TO-PRO-3<sup>+</sup> pericyte-like cells (1 and 2) detected through the antigen retrieval procedure. Fields within white rectangles (a-a<sup>''</sup>) were zoomed and are shown below. Note the strong stain of  $\alpha$ -SMA in pericyte 2 adjacent to the  $\alpha$ -SMA-expressing vessel as compared to pericyte 1. Note in (a) and (b) that TO-PRO-3<sup>+</sup> cells displaying more stain for  $\alpha$ -SMA exhibit lower levels of TO-PRO-3 than TO-PRO-3<sup>+</sup> cells with low or no labeling for  $\alpha$ -SMA. (c) The graph represents the percentage of hippocampal TO-PRO-3<sup>+</sup> cells co-labeled with  $\alpha$ -SMA. IF:  $\alpha$ -SMA detected by conventional immunofluorescence (n = 106TO-PRO-3<sup>+</sup> cells of 12 fields from 3 mice); AR:  $\alpha$ -SMA detected by antigen retrieval ( $n = 105 \text{ TO-PRO-3}^+$  cells of 40 fields from 3 mice) and Jasp:  $\alpha$ -SMA detected by immunofluorescence in slices pretreated with jasplakinolide ( $n = 114 \text{ TO-PRO-3}^+$  cells of 17 fields from 3 mice)

12 fields from 3 mice). Performing antigen retrieval on fixed hippocampal slices before incubation with the anti- $\alpha$ -SMA primary antibody allowed us to detect  $\alpha$ -SMA-positive immunoreaction in 48% of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells (n = 105 TO-PRO-3<sup>+</sup> cells of 40 fields from 3 mice). Finally, precluding eventual depolymerization of  $\alpha$ -SMA by pre-treating hippocampal slices with jasplakinolide before fixation (Alarcón-Martínez et al., 2018; Holzinger, 2009), further enhanced the total number of double-labeled  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>/ TO-PRO-3<sup>+</sup> cells by 66% (n = 114 TO-PRO-3<sup>+</sup> cells of 17 fields from 3 mice).

In summary, we found here that TO-PRO-3<sup>+</sup> pericytes from hippocampal slices were able to express  $\alpha$ -SMA under specific immunohistochemical conditions.

### 3.3 | TO-PRO-3<sup>+</sup> cells associate to other components of the neurovascular unit

To investigate whether TO-PRO-3<sup>+</sup> cells relate to other constituents of the NVU, hippocampal sections were counter-immunostained with specific antibodies against neurons, astrocytes, and endothelium (Figure 7). Figure 7a illustrates hippocampal TO-PRO-3<sup>+</sup> pericytes neighboring CA1 pyramidal neurons; the neuron-specific nuclear protein NeuN imaged hippocampal CA1 neurons, as expected we observed no matching between NeuN<sup>+</sup> and TO-PRO-3<sup>+</sup> cell populations (picture c). Likewise, we found non-overlapping labeling patterns between TO-PRO-3 and the glial fibrillary acidic protein (GFAP), a specific marker of astrocytes (Figure 7b). At the NVU, pericytes, vessels and astrocytes are intimately related. In line with this, GFAP<sup>+</sup> astrocyte processes either enwrapped TO-PRO-3<sup>+</sup> cells juxtaposed to the vessel wall or contacted the vessel in the vicinities of pericytes (Figure 7b). As is typical for pericytes, TO-PRO-3<sup>+</sup> cells rested on the abluminal wall of vessels as shown in Figure 7c where the vascular endothelium was identified with the specific antibody against the platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1).

# 3.4 | Which mechanisms underlie the passage of TO-PRO-3 through the pericyte membrane at the NVU?

The fluorophore TO-PRO-3 (MW 671.4 g/mol) is cell impermeant (Suzuki et al., 2007) and therefore requires relatively large pores to diffuse through the membrane or else a transport mechanism to enter into cells when applied extracellularly. Neither the injection of TO-PRO-3 in the retro-orbital venous sinus nor the intraperitoneal injection of TO-PRO-3 yielded labeled cells.

We first ruled out the possibility that the membrane integrity of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells has been impaired allowing the passage of relatively large molecules through an altered lipid bilayer. For this, we incubated slices in ACSF solution containing the membrane non-permeant FITC-dextran (70 000 kDa). The FITC-dextran disposed outside pericytes and delineated the silhouette of the TO-PRO-3<sup>+</sup> cell somas suggesting that an intact membrane impeded the entry of the dye into pericytes (Figure S4).

We then assessed the possible contribution of large pore membrane channels formed by pannexin1 (Panx1-pannexons) or connexin43 (Cx43 hemichannels or connexons); in other



FIGURE 7 TO-PRO-3<sup>+</sup> pericyte-like cells are components of the neurovascular unit in mouse hippocampus. (a) Fluorescent images display pericytes stained with DAPI (a, arrowhead) and with TO-PRO-3 (b'; arrowhead in c) and NG2 (b-b'', same field) neighboring CA1 pyramidal neurons. In picture c, neuronal bodies were immunolabeled with the neuronal marker NeuN; the nucleus of CA1 pyramidal neurons stained with DAPI are evident in a, b", and c. (b) Fluorescent images depict the rapport between TO-PRO-3-labeled pericytes and astroglial GFAP-stained prolongations. An astrocyte foot enwraps a pericyte soma, which rests on a blood vessel (a-a''', same field), whereas astrocyte feet contact vessel walls neighboring a pericyte lying on the vessel (b-b', same field). Inverted fluorescent pictures a '' and b' aim to facilitate the visualization of relationships between pericytes, astrocyte feet and vessel walls. (c) Pictures illustrate a TO-PRO-3-labeled pericyte lining up endothelial cells stained with PECAM-1 (a-a''', same field). The DIC field (a) was merged to the fluorescent image (a<sup>(')</sup>) in (a<sup>('')</sup>). Each image is representative of three mice

systems, pannexons act as pathways for TO-PRO-3 influx (Chekeni et al., 2010; Chiu et al., 2017; Good et al., 2018; Poon et al., 2014). To do so, in acute hippocampal slices, we evaluated the effects of the general Cx/Panx1 inhibitor, carbenoxolone (CBX; 100  $\mu$ M) (Ma et al., 2009) and the Panx1 blocker, the mimetic peptide <sup>10</sup>Panx1 (150  $\mu$ M) (Pelegrin & Surprenant, 2006) on TO-PRO-3 uptake (Figure 8(a)a). None of these blockers, CBX or <sup>10</sup>Panx1 prevented the capture of TO-PRO-3. The TO-PRO-3 uptake ratios for CBX and <sup>10</sup>Panx1 treatments, respectively, 1.02  $\pm$  0.03 (n = 302 pericytes from 4 mice) and 0.99  $\pm$  0.03 (n = 291 pericytes from 4 mice) were not different from control, 1.00  $\pm$  0.03 (n = 424 pericytes from 4 mice) (non-significant as compared to control, Kruskal–Wallis-test followed by Dunn post-test) (Figure 8(a)b). These results indicated that non-opposed Cx43 hemichannels and Panx1 channels were not



10

(a)

а

Control

Test

b

FIGURE 8 Mechanisms underlying TO-PRO-3 uptake by pericytes from mouse hippocampus. (a) Connexin hemichannels and pannexin channels are not the main pathways for TO-PRO-3 influx into mouse cerebral pericytes. a, Diagrams represent the experimental procedure employed to evaluate whether TO-PRO-3 uptake by hippocampal pericytes is mediated via Cx-hemichannels/ pannexons. b, The graph illustrates TO-PRO-3 uptake ratios (mean + SEM) for control (n = 424 pericytes from 4 mice). CBX-treated (n = 302 pericytes from 4 mice), and <sup>10</sup>Panx1-treated (n = 291)pericytes from 4 mice) pericytes. Uptake values were normalized to the control mean. Each dot represents the value of an individual TO-PRO-3<sup>+</sup> pericyte. ns; non-significant as compared to control, Kruskal-Wallis-test followed by Dunn post-test. (b) TO-PRO-3 uptake by mouse hippocampal pericytes shows saturation. The graph illustrates the TO-PRO-3 uptake ratios (mean  $\pm$  SEM) for pericytes exposed for 20 min to different doses (0.1–5  $\mu$ M) of TO-PRO-3 (0.1  $\mu$ M, *n* = 218 pericytes from 6 mice; 1  $\mu$ M, *n* = 132 pericytes from 3 mice; 2  $\mu$ M, n = 130 pericytes from 6 mice; 5  $\mu$ M, n = 49 pericytes from 3 mice). Each dot represents the ratio for a single pericyte. Uptake values were normalized to the mean obtained at the lower dose (0.1  $\mu$ M). \*p < .05; \*\*\*p < .001; as compared to 0.1  $\mu$ M; ns, non-significant; &&& p < .001, comparison between 2 values indicated by horizontal bars, Kruskal-Wallistest followed by Dunn post-test. (c) Uptake of TO-PRO-3 by hippocampal pericytes is temperature dependent. The graph illustrates TO-PRO-3 uptake ratios (mean  $\pm$  SEM) for pericytes obtained during incubation of slices in TO-PRO-3-containing ACSF at 20°C (n = 314 pericytes from 6 mice) and 30°C (n = 324pericytes from 6 mice). Each dot represents the ratio for a single pericyte. Uptake values were normalized to the mean obtained at 20°C. \*\*\*p < .001, Mann-Whitney test (two-tail)

the main routes for dye incorporation suggesting that an additional mechanism might account for TO-PRO-3 entry into brain pericytes.

As an approach to characterize the transport of TO-PRO-3 into pericytes, we evaluated the dye uptake kinetics, by determining the effects of different concentrations of TO-PRO-3 on uptake after 20 min of exposure. Increasing TO-PRO-3 concentrations (0.1, 1, 2, and 5  $\mu$ M) yielded increasing levels of the uptake ratio until a maximum rate of transport was achieved between 2 and 5

MAI-MORENTE ET AL.

 $\mu$ M, respectively, 2.99  $\pm$  0.11 (n = 130 pericytes from 6 mice) and  $3.29 \pm 0.14$  (n = 49 pericytes from 3 mice) (ns, non-statistically different, Kruskal-Wallis test followed by Dunn post-test) (Figure 8b). The maximal capacity to uptake TO-PRO-3, which reflected a saturation of the transport mechanism, suggested that an integral membrane protein (channel or carrier) contributed to transfer the dye into pericytes; this could have happened through either a facilitated diffusion or an active transport (Berne and Levy, 2008; Albert et al., 2002). To discriminate between both mechanisms, we assessed the effect of the temperature on TO-PRO-3 uptake. The mean uptake ratio at 30°C,  $5.02 \pm 0.18$  (n = 324 pericytes from 6 mice) was significantly higher than the one at 20°C,  $1.00 \pm 0.04$  (n = 314 pericytes from 6 mice) (p < .001, two tail Mann-Whitney test) (Figure 8c). Consequently, the calculated temperature coefficient or Q10, that is, the factor by which the mean uptake changed upon a 10°C increase in temperature (from 20°C to 30°C), was 5.02. This magnitude of OIO indicated that TO-PRO-3 uptake was highly sensitive to temperature and suggested that the transport mechanism could have involved protein conformational changes and energy expenditure.

In summary, based on our findings, we suggest that pericytes selectively captured TO-PRO-3 through an active protein-transport mediated system.

#### 4 | DISCUSSION

30 °C Temperature

In the present study, we demonstrate that the fluorescent nuclear tracer TO-PRO-3 lodide (642/661) acts as a specific dye to image capillary pericytes at the NVU of murine. After brief exposure, the fluorophore was preferentially incorporated by pericytes in live slices of the cortex, hippocampus, spinal cord, and whole-mount retinas. Selective uptake of TO-PRO-3 by cerebral pericytes has been previously reported in the mice subventricular zone from acute slices where TO-PRO-3-loaded pericytes were used for calcium imaging and immunohistochemistry post-fixation (Lacar et al., 2012). However, to our knowledge, a comprehensive study of TO-PRO-3 imaging of pericytes has not been further described.

Different pieces of evidence here obtained indicate that TO-PRO-3 specifically labels pericytes at the neurovascular interface. First, morphological features, that is, protruding spindle-shaped TO-PRO-3<sup>+</sup> somas giving origin to longitudinal processes, were typical of pericytes. In line with this, Isolectin B4 that labels the basement membrane, which encloses pericytes (Mishra et al., 2014), delineated TO-PRO-3<sup>+</sup> pericyte-like cells and disclosed their perivascular location. Besides, the length of primary longitudinal processes of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells agreed with those published for pericytes of cortices from the NG2-tdTomato transgenic mouse Cre line, which is driven by the promoter for the NG2 proteoglycan to target pericytes (Hartmann, et al., 2015a,b; Ozerdem et al., 2001). Second, TO-PRO-3<sup>+</sup> cells exhibited the classical intimate apposition to microvasculature and the characteristic anatomical rapports shown by pericytes at the NVU. Accordingly, TO-PRO-3<sup>+</sup> cells leaned on the vasculature in close association to astrocyte feet and vessel endothelium to which

they partially enwrapped. Assembly between pericytes, vessels and astrocytes is known to favor the exchange across the blood-brain interface (Mathiisen et al., 2010) that is crucial for BBB functions (Abbott et al., 2010). By using electronic microscopy 3D reconstruction in CA1 rat hippocampus, other authors showed that about onethird of endothelium is covered by pericytes (somas and processes), whereas most of the abluminal surface of pericytes is covered by astrocyte endfeet (Mathiisen et al., 2010). Recent data indicate that the vessel coverage depends on the pericyte morphology and vascular territory being maximum (95%) for ensheathing pericytes at pre-capillary arterioles and minimum (51%) for thin-strand pericytes at small diameter capillaries (Grant et al., 2019). Third, TO-PRO-3<sup>+</sup> cells expressed NG2 and PDGFr<sup>B</sup> antigens, classical markers of pericytes (Hartmann, et al., 2015a,b; Lindahl et al., 1997; Ozerdem et al., 2001; Smyth et al., 2018) and captured the recently described pericyte dye NeuroTrace 500/525 that is exclusively taken up by in vivo pericytes (Damisah et al., 2017). Fourth, almost all cells identified as pericytes (i.e., double-labeled NG2/PDGFr<sup>β</sup> cells associated with vessels), were stained by TO-PRO-3. Finally, the abundance of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells was in line with the densities of cortical pericytes as determined by NeuroTrace 500/525 labeling (Damisah et al., 2017).

A subset of TO-PRO-3<sup>+</sup> pericytes expressed the contractile protein  $\alpha$ -SMA. In line with a previous report (Alarcón-Martínez et al., 2018), preventing F-actin depolymerization allowed us to identify a larger percentage of  $\alpha$ -SMA-expressing TO-PRO-3<sup>+</sup> cells  $(\alpha$ -SMA<sup>+</sup> pericytes) than antigen retrieval or classical immunofluorescence. Despite this, we could not detect the protein in a pool of TO-PRO-3<sup>+</sup> cells ( $\alpha$ -SMA<sup>-</sup> pericytes). The differential expression of  $\alpha$ -SMA exhibited by TO-PRO-3<sup>+</sup> cells might reflect the heterogeneity of the pericyte population already described by others. Accordingly, ensheathing pericytes at pre-capillary arterioles and capillary pericytes closer to the arteriole end of capillaries would express more α-SMA than mid-capillary ones (Nehls & Drenckhahn, 1991; Ehler et al., 1995; Bandopadhyay et al., 2001; Attwell et al., 2016; Grant et al., 2019). Although we did not perform additional studies to address the precise location of  $\alpha$ -SMA-expressing TO-PRO-3<sup>+</sup> cells within the vascular tree, our data suggested that both the capillary pericytes close to arterioles ( $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> pericytes) and those located in the mid-capillary bed ( $\alpha$ -SMA<sup>-</sup> pericytes) captured TO-PRO-3 (Figure 2c; Figure 6). Moreover, pericytes located near the arteriole could exhibit lower levels of TO-PRO-3 uptake than pericytes located in the mid-capillary bed (Figure 6a and b). Previous work suggested that NeuroTrace 500/525 and  $\alpha$ -SMA labeling are inversely related (Grant et al., 2019).

While some groups successfully detected  $\alpha$ -SMA in capillary pericytes through IHC procedures and quantitative immunoblotting (Le Beux and Willemot, 1978; Bandopadhyay et al., 2001; Alarcón-Martínez et al., 2018), others obtained negative results by using antibody staining (Grant et al., 2019) or reporter lines driven by  $\alpha$ -SMA promoters (Damisah et al., 2017; Hill et al., 2015). This discrepancy could be because of experimental procedures regarding differences in the sensitivity of the detection methods employed (Alarcón-Martínez et al., 2018) or in definition of pericytes (Attwell et al., 2016; Hill et al., 2015; Grant et al., 2019; Grutzendler and Nedergaard, 2019). Alternatively, it may be because of the differential expression pattern of  $\alpha$ -SMA exhibited by some preparations (Ehler et al., 1995; Hill et al., 2015; Smyth et al., 2018; Nortley et al., 2019).

The presence of contractile machinery is consistent with pericyte function to actively modify their tone and modulate the capillary diameter and blood flow (CBF) (Kawamura et al., 2003; Peppiatt et al., 2006; Lacar et al., 2012; Hall et al., 2014; Mishra et al., 2016; Kisler, et al., 2017; Isasi et al., 2019; Nortley et al., 2019; Kisler et al., 2020; Nelson et al., 2020; Hartmann et al., 2020 Preprint; Ivanova et al., 2020 Preprint) although this role has not been established by some studies (Fernández-Klett et al., 2010; Hill et al., 2015; Wei et al., 2016). It is accepted that ensheathing pericytes from pre-capillary arterioles express  $\alpha$ -SMA and regulate blood flow (Hill et al., 2015; Hartmann et al., 2020 Preprint) but the mechanisms underiving the contractility of mid-capillary pericytes involved in CBF regulation remain unknown. How to reconcile that mid-capillary pericytes regulate the CBF if they express low or undetectable levels of  $\alpha$ -SMA? Interestingly, recent papers have proposed that pericytes may use alternative contractile proteins (Nelson et al., 2020; Hartmann et al., 2020 Preprint) expressed by them as determined by transcriptomic studies (He et al., 2018; Vanlandewijck et al., 2018). Additionally, changes in the polymerization status of cytoskeletal F-actin and α-SMA were proposed to regulate the stiffness and contractility of mid-capillary pericytes (Kureli et al., 2020). Future studies are still required to decipher this ongoing key issue.

Our results suggest that uptake of TO-PRO-3 is mediated through an yet unidentified transporter expressed by brain pericytes, namely, (a) TO-PRO-3 does not permeate membranes (Suzuki et al., 2007) and thus requires a transport system to enter into cells; (b) TO-PRO-3 concentrated into pericytes, and (c) dynamics of dye uptake displayed maximal capacity. Uptake saturation might have reflected the unavailability of additional transporters to carry more dye (Berne and Levy, 2008; Albert et al., 2002). The transporter-mediated transfer of TO-PRO-3 through the pericyte membrane might be passive (facilitated diffusion) or active depending on the sign of the net driving force generated by the electrochemical gradient. Our findings highly suggested that TO-PRO-3 incorporation into brain pericytes is an actively mediated mechanism. First, TO-PRO-3 significantly accumulated into pericytes to a higher concentration as compared to other cells/extracellular solution; second, dye uptake showed high dependence on the temperature (Q10~5.02), and third, a diffusion-based entry of TO-PRO-3 into pericytes through Panx1 channels or Cxs hemichannels was ruled out through pharmacological tools. Besides, hippocampal pericytes from global knock-out mice for Pannexin1 (Panx1<sup>-/-</sup>) were also strongly labeled by TO-PRO-3 (data not shown). That activity of Panx1 channels was dispensable for TO-PRO-3 influx was not consistent with previous studies reported in Jurkat cells where uptake of TO-PRO-3 is Panx1 dependent (Chekeni et al., 2010; Chiu et al., 2017; Good et al., 2018; Poon et al., 2014). If connexons/ pannexons eventually admitted a TO-PRO-3 influx, their contribution was negligible as compared to the active transport. Interestingly, previous studies already postulated that living pericytes can incorporate Journal of Neurochemistry

II FV

the large-molecular weight fluorescent probes dextran-conjugated fluorescent calcium indicator Calcium Green I (Hirase et al., 2004), Fluoro-Gold (Edwards et al., 2013) and NeuroTrace 500/525 (Damisah et al., 2017). Accordingly, an active transport mechanism specifically expressed by pericytes was also proposed to underlie NeuroTrace 500/525 entry into living pericytes (Damisah et al., 2017). NeuroTrace 500/525 and TO-PRO-3 lodide 642/661 share additional properties, that is, both markers stain nucleic acids in fixed sections but they shift their staining profile in living tissue where they selectively label pericytes and both display a similar labeling pattern. At present, whether they also employ the same transporter to enter into pericytes is unknown. The high expression of membrane transporters reported for capillary pericytes (Vanlandewijck et al., 2018) is consistent with the preferential uptake of fluorescent probes by these cells as compared to mural cells from other sections of the vasculature (Berthiaume et al., 2018). Finally, as aforementioned (see results), pericytes from mice aged between P06 and P90 also incorporated TO-PRO-3. These findings suggest that the transport system carrying TO-PRO-3 into pericytes might be present from the early stages of development and maintained during adulthood.

Herein, TO-PRO-3 labeled pericytes of rats and mice neural structures. We do not know whether pericytes from other species or systems (i.e., kidneys, heart) also exhibit selective uptake of TO-PRO-3. Regional differences concerning labeling properties of pericytes have been reported (Edwards et al., 2013). Interestingly, studies on human microvasculature are emerging (Hill et al., 2015; Nortley et al., 2019; Smyth et al., 2018) and using TO-PRO-3 to target pericytes in human tissues would be particularly convenient. Then, future studies might assess if TO-PRO-3 enables pericytes imaging in the human brain and other mammallian tissues.

Ex vivo, labeling pericytes with TO-PRO-3 displayed an outstanding and selective bright fluorescence, which, together with its extensive cellular filling, allowed high-resolution optical images in live and fixed murine sections. Although the TO-PRO-3 fluorescence was highly stable in PFA-fixed slices, we found photobleaching in living time-lapse experiments. Optimization of exposure times during image acquisition could overcome these limitations making TO-PRO-3 appropriate for live imaging (see Figure 5; Lacar et al., 2012). As a DNA-binding dye (Martin et al., 2005), TO-PRO-3 can interfere with cellular processes generating damage. However, herein, we did not find signs of cytotoxicity in long-term experiments (up to 6 hr). Accordingly, the far-red emitting probe TO-PRO-3 lodide (642/661) displays minimal autofluorescence and phototoxicity (Suseela et al., 2018) compared to fluorophores endowed with other excitation/emission spectra (mostly those excited with UV light). Among these dyes, the above-mentioned dextran-conjugated fluorescent calcium indicator Calcium Green I (506/531) (Hirase et al., 2004), and the neuronal markers Fluoro-Gold (UV) (Edwards et al., 2013) and NeuroTrace (500/525) (Damisah et al., 2017) also label CNS pericytes when administered to living parenchyma. As with TO-PRO-3 labeling, NeuroTrace also yields a remarkable signal-to-noise rapport stain in hippocampal slices. However, as opposed to NeuroTrace which diffuses out of pericytes during immunostaining procedures

(Damisah et al., 2017), the TO-PRO-3 mark could bear antibody labeling; this behavior of TO-PRO-3 was similar to Fluoro-Gold, whose compatibility with immunofluorescence has been reported (Edwards et al., 2013). Importantly, TO-PRO-3 displays exclusive emission at 633 excitation in the far-red channel avoiding interference with other fluorescence channels (Bink et al., 2001). This represents a benefit over probes with wider emission profiles and favors its use during multi-labeling, especially in association with widespread used FITCconjugated probes or green fluorescent protein (GFP) reporters.

#### 5 | CONCLUSIONS

We show here that low concentrations of TO-PRO-3 lodide (642/661) are selectively taken up by ex vivo living pericytes from the neurovascular unit through an active transporter-mediated process; as a result, pericytes become brightly stained. In addition to the good stability and high signal-to-background ratio exhibited by the TO-PRO-3-fluorescence, the labeling procedure is rapid, non-toxic, and affordable and shows great reproducibility making it a convenient method to trace cerebral pericytes. On top of that, this dye fluorescence microscopy. Importantly, tracking TO-PRO-3-marked pericytes circumvents the need for genetically engineered mice or immunohistochemical counter-staining and thus, it can be easily employed in transgenic murine models.

In summary, we conclude that TO-PRO-3-labeling provides a specific and reliable tool to study pericytes at the neurovascular interface. Futures studies are required to determine whether this dye also recognizes pericytes from other organs or species including human tissues.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Drs. Patricia Cassina and Patricia Lagos for providing us with, GFAP and secondary antibodies respectively, Dr. Gustavo Brum for scientific advice and Luis Vitureira, Elbio Agote<sup>\*</sup> (Departamento de Fisiología), Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE), FUNDACIBA and Unidad de Microscopía Confocal, from Facultad de Medicina - Universidad de la República Oriental del Uruguay, for technical assistance. \* deceased on February 25th, 2016.

#### CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest declared.

#### ORCID

Verónica Abudara ២ https://orcid.org/0000-0003-0703-306X

#### REFERENCES

Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley,
 D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier.
 Neurobiology of Diseases, 37(1), 13–25.

- Abudara, V., Roux, L., Dallérac, G., Matias, I., Dulong, J., Mothet, J. P., Rouach, N., & Giaume, C. (2015). Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *Glia*, 63(5), 795–811.
- Alarcón-Martínez, L., Yilmaz-Ozcan, S., Yemisci, M., Schallek, J., Kılıç, K., Can, A., Di Polo, A., & Dalkara, T. (2018). Capillary pericytes express α-smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *Elife.*, 7, pii: e34861.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. : Garland Science. Retrieved from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/.
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Betsholtz, C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 468(7323):557–561.
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C., O'Farrell, F., & Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36, 451– 455. https://doi.org/10.1177/0271678X15610340
- Bandopadhyay, R., Orte, C., Lawrenson, J. G., Reid, A. R., De Silva, S., & Allt, G. (2001). Contractile proteins in pericytes atthe blood-brain and blood-retinal barriers. *Journal of Neurocytology*, 30(1), 35–44.
- Berne, R. M., Koeppen, B. M., Stanton, B. A. (2008). Berne & levy physiology. Mosby Elsevier.
- Berthiaume, A. A., Hartmann, D. A., Majesky, M. W., Bhat, N. R., & Shih, A. Y. (2018). Pericyte structural remodeling in cerebrovascular health and homeostasis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 210.
- Bink, K., Walch, A., Feuchtinger, A., Eisenmann, H., Hutzler, P., Höfler, H., & Werner, M. (2001). TO-PRO-3 is an optimal fluorescent dye for nuclear counter-staining in dual-colour FISH on paraffin sections. *Histochemistry and Cell Biology*, 115(4), 293–299. https://doi. org/10.1007/s004180100254
- Bondjers, C., He, L., Takemoto, M., Norlin, J., Asker, N., Hellström, M., Lindahl, P., & Betsholtz, C. (2006). Microarray analysis of blood microvessels from PDGF-B and PDGF-Rbeta mutant mice identifies novel markers for brain pericytes. *The FASEB Journal*, 20(10), 1703–1705.
- Chasseigneaux, S., Moraca, Y., Cochois-Guégan, V., Boulay, A. C., Gilbert, A., Le Crom, S., Blugeon, C., Firmo, C., Cisternino, S., Laplanche, J. L., Curis, E., Declèves, X., & Saubaméa, B. (2018). Isolation and differential transcriptome of vascular smooth muscle cells and mid-capillary pericytes from the rat brain. *Scientific Reports*, 8(1), 12272.
- Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski, E. R., Armstrong, A. J., Penuela, S., Laird, D. W., Salvesen, G. S., Isakson, B. E., Bayliss, D. A., & Ravichandran, K. S. (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, 467(7317), 863–867.
- Chiu, Y. H., Jin, X., Medina, C. B., Leonhardt, S. A., Kiessling, V., Bennett, B. C., Shu, S., Tamm, L. K., Yeager, M., Ravichandran, K. S., & Bayliss, D. A. (2017). A quantized mechanism for activation of pannexin channels. *Nature Communications*, 8, 14324.
- Damisah, E. C., Hill, R. A., Tong, L., Murray, K. N., & Grutzendler, J. (2017). A fluoro-Nissl dye identifies pericytes as distinct vascular mural cells during in vivo brain imaging. *Nature Neuroscience*, 20(7), 1023–1032.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562–566.
- de Mazière, A. M., Hage, W. J., & Ubbels, G. A. (1996). A method for staining of cell nuclei in Xenopus laevis embryos with cyanine dyes for whole-mount confocal laser scanning microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 44, 399–402.
- Edwards, I. J., Singh, M., Morris, S., Osborne, L., Le Ruez, T., Fuad, M., Deuchars, S. A., & Deuchars, J. (2013). A simple method to fluorescently label pericytes in the CNS and skeletal muscle. *Microvascular Research*, 89, 164–168.

Eger, E. I. 2nd. (2004). Characteristics of anesthetic agents used for induction and maintenance of general anesthesia. *American Journal of Health-System Pharmacy*; 61(4):S3–S10.

Journal of Neurochemistry

- Ehler, E., Karlhuber, G., Bauer, H. C., & Draeger, A. (1995). Heterogeneity of smooth muscle-associated proteins in mammalian brain microvasculature. *Cell and Tissue Research*, 279(2), 393–403.
- Fernández-Klett, F., Offenhauser, N., Dirnagl, U., Priller, J., & Lindauer, U. (2010). Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(51), 22290–22295.
- Garré, J. M., Retamal, M. A., Cassina, P., Barbeito, L., Bukauskas, F. F., Sáez, J. C., Bennett, M. V., & Abudara, V. (2010). FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(52), 22659–22664.
- Good, M. E., Chiu, Y. H., Poon, I. K. H., Medina, C. B., Butcher, J. T., Mendu, S. K., DeLalio, L. J., Lohman, A. W., Leitinger, N., Barrett, E., Lorenz, U. M., Desai, B. N., Jaffe, I. Z., Bayliss, D. A., Isakson, B. E., & Ravichandran, K. S. (2018). Pannexin 1 channels as an unexpected new target of the anti-hypertensive drug spironolactone. *Circulation Research*, 122(4), 606–615.
- Grant, R. I., Hartmann, D. A., Underly, R. G., Berthiaume, A. A., Bhat, N. R., & Shih, A. Y. (2019). Organizational hierarchy and structural diversity of microvascular pericytes in adult mouse cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(3), 411–425.
- Grutzendler, J., & Nedergaard, M. (2019). Cellular control of brain capillary blood flow: Vivo imaging veritas. *Trends Neuroscience*, 42(8), 528–536.
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., O'Farrell, F. M., Buchan, A. M., Lauritzen, M., & Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(7494), 55–60.
- Hamilton, N. B., Attwell, D., & Hall, C. N. (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: A component of neurovascular coupling in health and disease. *Frontiers in Neuroenergetics*, 2, pii: 5.
- Hartmann, D. A., Berthiaume, A. -A., Grant, R. I., & Harrill, S. A., Noonan, T., Costello, J., Tieu, T., McDowell, K., Faino, A., Kelly, A., Shih, A. Y. (2020). Brain capillary pericytes exert a substantial but slow influence on blood flow. *BioRxiv* [Preprint]. https://doi. org/10.1101/2020.03.26.008763
- Hartmann, D. A., Underly, R. G., Watson, A. N., & Shih, A. Y. (2015a). A murine toolbox for imaging the neurovascular unit. *Microcirculation*, 22(3), 168–182.
- Hartmann, D. A., Underly, R. G., Grant, R. I., Watson, A. N., Lindner, V., & Shih, A. Y. (2015b). Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by highresolution imaging of transgenic mice. *Neurophotonics*, 2(4), 041402.
- He, L., Vanlandewijck, M., Mäe, M. A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., Sun, Y., Raschperger, E., Segerstolpe, Å., Liu, J., Gustafsson, S., Räsänen, M., Zarb, Y., Mochizuki, N., Keller, A., ... Betsholtz, C. (2018). Single-cell RNA sequencing of mouse brain and lung vascular and vessel-associated cell types. *Science Data*, *5*, 180160.
- He, L., Vanlandewijck, M., Raschperger, E., Andaloussi Mäe, M., Jung, B., Lebouvier, T., Ando, K., Hofmann, J., Keller, A., & Betsholtz, C. (2016). Analysis of the brain mural cell transcriptome. *Scientific Reports*, *6*, 35108.
- Hill, R. A., Tong, L., Yuan, P., Murikinati, S., Gupta, S., & Grutzendler, J. (2015). Regional blood flow in the normal and ischemic brain is controlled by arteriolar smooth muscle cell contractility and not by capillary pericytes. *Neuron*, 87(1), 95–110.
- Hirase, H., Creso, J., Singleton, M., Barthó, P., & Buzsáki, G. (2004). Twophoton imaging of brain pericytes in vivo using dextran-conjugated dyes. *Glia*, 46(1), 95–100.

WILEY Journal of Neurochemistry

14

Holzinger, A. (2009). Jasplakinolide: An actin-specific reagent that promotes actin polymerization. Methods. *Molecular Biology*, 586, 71–87.

- Isasi, E., Korte, N., Abudara, V., Attwell, D., & Olivera-Bravo, S. (2019). Glutaric acid affects pericyte contractility and migration: Possible implications for GA-I pathogenesis. *Molecular Neurobiology*, 56(11), 7694–7707.
- Ivanova, E., Corona, C., Eleftheriou, C. G., Bianchimano, P., & Sagdullaev, B. T. Retina-specific targeting of pericytes reveals structural diversity and enables control of capillary blood flow. *BioRxiv* [Preprint]. https://doi.org/10.1101/2020.05.29.124586
- Ivanova, E., Toychiev, A. H., Yee, C. W., & Sagdullaev, B. T. (2013). Optimized protocol for retinal wholemount preparation for imaging and immunohistochemistry. *Journal of Visualized Experiments: Jove*, 82, e51018.
- Jung, B., Arnold, T. D., Raschperger, E., Gaengel, K., & Betsholtz, C. (2018). Visualization of vascular mural cells in developing brain using genetically labeled transgenic reporter mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 38(3), 456–468.
- Kawamura, H., Sugiyama, T., Wu, D. M., Kobayashi, M., Yamanishi, S., Katsumura, K., & Puro, D. G. (2003). ATP: A vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *Journal of Physiology*, 551(Pt 3), 787–799.
- Kisler, K., Nelson, A. R., Montagne, A., & Zlokovic, B. V. (2017b). Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(7), 419–434. https://doi. org/10.1038/nrn.2017.48
- Kisler, K., Nelson, A. R., Rege, S. V., Ramanathan, A., Wang, Y., Ahuja, A., Lazic, D., Tsai, P. S., Zhao, Z., Zhou, Y., Boas, D. A., Sakadžić, S., & Zlokovic, B. V. (2017a). Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nature Neuroscience*, 20(3), 406–416. https://doi.org/10.1038/nn.4489
- Kisler, K., Nikolakopoulou, A. M., Sweeney, M. D., Lazic, D., Zhao, Z., & Zlokovic, B. V. (2020). Acute ablation of cortical pericytes leads to rapid neurovascular uncoupling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 27.
- Kureli, G., Yilmaz-Ozcan, S., Erdener, S. E., Donmez-Demir, B., Yemisci, M., Karatas, H., & Dalkara, T. (2020). F-actin polymerization contributes to pericyte contractility in retinal capillaries. *Experimental Neurology*, 332, 113392.
- Lacar, B., Herman, P., Platel, J. C., Kubera, C., Hyder, F., & Bordey, A. (2012). Neural progenitor cells regulate capillary blood flow in the postnatal subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, 32(46):16435–16448.
- Laitinen, L. (1987). Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochem Journal*, 19(4):225–234.
- Le Beux, Y. J., & Willemot, J. (1978). Actin- and myosin-like filaments in rat brain pericytes. *Anatomical Record*, 190(4), 811–826.
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P., & Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 277(5323), 242–245.
- Ma, W., Hui, H., Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2009). Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(2):409-418.
- Martin, R. M., Leonhardt, H., & Cardoso, M. C. (2005). DNA labeling in living cells. Cytometry A, 67(1), 45–52.
- Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C., & Ottersen, O. P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*, 58(9), 1094–1103.
- Mishra, A., O'Farrell, F. M., Reynell, C., Hamilton, N. B., Hall, C. N., & Attwell, D. (2014). Imaging pericytes and capillary diameter in brain slices and isolated retinae. *Nature Protocols*, 9(2), 323–336.
- Mishra, A., Reynolds, J. P., Chen, Y., Gourine, A. V., Rusakov, D. A., & Attwell, D. (2016). Astrocytes mediate neurovascular signaling to

capillary pericytes but not to arterioles. *Nature Neuroscience*, 19(12), 1619–1627.

- Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., Toga, A. W., Jacobs, R. E., Liu, C. Y., Amezcua, L., Harrington, M. G., Chui, H. C., Law, M., & Zlokovic, B. V. (2015). Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*, *85*(2), 296–302.
- Montagne, A., Nation, D. A., Sagare, A. P., Barisano, G., Sweeney, M. D., Chakhoyan, A., Pachicano, M., Joe, E., Nelson, A. R., D'Orazio, L. M., Buennagel, D. P., Harrington, M. G., Benzinger, T. L. S., Fagan, A. M., Ringman, J. M., Schneider, L. S., Morris, J. C., Reiman, E. M., Caselli, R. J., ... Zlokovic, B. V. (2020). APOE4 leads to blood-brain barrier dysfunction predicting cognitive decline. *Nature*, 581(7806), 71–76.
- Montagne, A., Nikolakopoulou, A. M., Zhao, Z., Sagare, A. P., Si, G., Lazic, D., Barnes, S. R., Daianu, M., Ramanathan, A., Go, A., Lawson, E. J., Wang, Y., Mack, W. J., Thompson, P. M., Schneider, J. A., Varkey, J., Langen, R., Mullins, E., Jacobs, R. E., & Zlokovic, B. V. (2018). Pericyte degeneration causes white matter dysfunction in the mouse central nervous system. *Nature Medicine*, 24(3), 326–337.
- Nation, D. A., Sweeney, M. D., Montagne, A., Sagare, A. P., D'Orazio,
  L. M., Pachicano, M., Sepehrband, F., Nelson, A. R., Buennagel, D.
  P., Harrington, M. G., Benzinger, T. L. S., Fagan, A. M., Ringman, J.
  M., Schneider, L. S., Morris, J. C., Chui, H. C., Law, M., Toga, A. W.,
  & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-brain barrier breakdown is an early
  biomarker of human cognitive dysfunction. *Nature Medicine*, 25(2),
  270–276.
- Nehls, V., & Drenckhahn, D. (1991). Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *Journal of Cell Biology*, 113(1), 147–154.
- Nelson, A. R., Sagare, M. A., Wang, Y., Kisler, K., Zhao, Z., & Zlokovic, B. V. (2020). Channelrhodopsin excitation contracts brain pericytes and reduces blood flow in the aging mouse brain *in vivo*. Frontiers in Aging Neuroscience, 12, 108.
- Nikolakopoulou, A. M., Montagne, A., Kisler, K., Dai, Z., Wang, Y., Huuskonen, M. T., Sagare, A. P., Lazic, D., Sweeney, M. D., Kong, P., Wang, M., Owens, N. C., Lawson, E. J., Xie, X., Zhao, Z., & Zlokovic, B. V. (2019). Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss. *Nature Neuroscience*, 22(7), 1089–1098.
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., & Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): Multifunctional cells with lineage plasticity.Nat. *Reviews in the Neurosciences*, 10(1):9–22.
- Nortley, R., Korte, N., Izquierdo, P., Hirunpattarasilp, C., Mishra, A., Jaunmuktane, Z., Kyrargyri, V., Pfeiffer, T., Khennouf, L., Madry, C., Gong, H., Richard-Loendt, A., Huang, W., Saito, T., Saido, T. C., Brandner, S., Sethi, H., & Attwell, D. (2019). Amyloid β oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to pericytes. *Science*, 365(6450), pii: eaav9518.
- Ozerdem, U., Grako, K. A., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E., & Stallcup, W. B. (2001). NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 222(2), 218–227.
- Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. EMBO Journal, 25, 5071–5082.
- Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P., & Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443(7112), 700–704.
- Peters, B. P., & Goldstein, I. J. (1979). The use of fluorescein-conjugated Bandeiraea simplicifolia B4-isolectin as a histochemical reagent for the detection of alpha-D-galactopyranosyl groups. Their occurrence in basement membranes. *Experimental Cell Research*, 120(2), 321–334.
- Poon, I. K., Chiu, Y. H., Armstrong, A. J., Kinchen, J. M., Juncadella, I. J., Bayliss, D. A., & Ravichandran, K. S. (2014). Unexpected link between

an antibiotic, pannexin channels and apoptosis. *Nature*, 507(7492), 329-334.

- Rouget, C. (1873). Mémoire sur le développement, la structure et les propriétés physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques. Arch Physiol Norm Path, 5, 603–663.
- Sagare, A. P., Bell, R. D., Zhao, Z., Ma, Q., Winkler, E. A., Ramanathan, A., & Zlokovic, B. V. (2013). Pericyte loss influences Alzheimer like neurodegeneration in mice. *Nature Communications*, 4, 2932.
- Smyth, L. C. D., Rustenhoven, J., Scotter, E. L., Schweder, P., Faull, R. L. M., Park, T. I. H., & Dragunow, M. (2018). Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 92, 48–60.
- Suseela, Y. V., Narayanaswamy, N., & Pratihar, S. (2018). Far-red fluorescent probes for canonical and non-canonical nucleic acid structures: Current progress and future implications. *Chemical Society Reviews*, 47(3), 1098–1131.
- Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T., & Takata, K. (1997). DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 45(1), 49–53.
- Suzuki, T., Matsuzaki, T., Hagiwara, H., Aoki, T., & Takata, K. (2007). Recent advances in fluorescent labeling techniques for fluorescence microscopy. Acta Histochemica Et Cytochemica, 40(5), 131-137.
- Van Hooijdonk, C. A., Glade, C. P., & Van Erp, P. E. (1994). TO-PRO-3 iodide: A novel HeNe laser-excitable DNA stain asan alternative for propidium iodide in multiparameter flow cytometry. *Cytometry*, 17(2), 185–189.
- Vanlandewijck, M., He, L., Mäe, M. A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., Sun, Y., Raschperger, E., Räsänen, M., Zarb, Y., Mochizuki, N., Keller, A., Lendahl, U., &

Betsholtz, C. (2018). A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature*, *554*(7693), 475–480.

- Wei, H. S., Kang, H., Rasheed, I. D., Zhou, S., Lou, N., Gershteyn, A., McConnell, E. D., Wang, Y., Richardson, K. E., Palmer, A. F., Xu, C., Wan, J., & Nedergaard, M. (2016). Erythrocytes are oxygen-sensing regulators of the cerebral microcirculation. *Neuron*, 91(4), 851–862. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.07.016
- Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H. D., Huizing, M., & Hoogstraten-Miller, S. (2011). Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim* (NY)., 40(5), 155–160.
- Yemisci, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Vural, A., Can, A., Topalkara, K., & Dalkara, T. (2009). Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nature Medicine*, 15(9), 1031–1037.

#### SUPPORTING INFORMATION

Journal of Neurochemistry

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Mai-Morente SP, Marset VM, Blanco F, Isasi EE, Abudara V. A nuclear fluorescent dye identifies pericytes at the neurovascular unit. *J Neurochem* 2020;00:1–15. https://doi.org/10.1111/jnc.15193

bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

#### Pericyte Mapping in Cerebral Slices with the Far-red Fluorophore TO-PRO-3

Sandra P. Mai-Morente<sup>1</sup>, Juan P. Irigoyen<sup>1</sup>, Victoria M. Carriquiry<sup>1</sup>

Virginia M. Marset<sup>1</sup>, Mariana Di Doménico<sup>2</sup>, Eugenia Isasi<sup>3</sup> and Verónica Abudara<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, General Flores 2125, Montevideo, CP 11 800, Uruguay
<sup>2</sup>Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, General Flores 2125, Montevideo, CP 11 800, Uruguay
<sup>3</sup>Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, General Flores 2125, Montevideo, CP 11 800, Uruguay
\*For correspondence: <u>abudara@fmed.edu.uy</u>

**[Abstract]** This protocol describes a method for high-resolution confocal imaging of pericytes with the far-red fluorophore TO-PRO<sup>TM</sup>-3 lodide 642/661 in cerebral slices of murine. Identification of pericytes with TO-PRO-3 is a short time-consuming, high cost-effective and robust technique to label pericytes with no need for immunostaining or generation of reporter mice. Since the TO-PRO-3 stain resists immunofluorescence, and lacks spectral overlap, the probe is well suited for multiple labelling. Our procedures also combine TO-PRO-3-staining of pericytes with fluorescent markers for astrocytes and vessels in brain slices. These approaches should enable the assessment of pericyte biology in gliovascular unit.

**Keywords:** Pericyte imaging, TO-PRO-3, Fluorescence confocal microscopy, Brain slices, Astrocytes, vessels

**[Background]** Fluorescence imaging at the cellular level offers an exceptional tool to track pericytes under confocal or bi-photonic microscopy. Tagging specific pericyte surface antigens, such as chondroitin sulphate proteoglycan neuron-glial 2 (NG2) and platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR $\beta$ ), proved to be an excellent approach to identify pericytes in the cerebral microvasculature. Antigen labelling is achieved via immunofluorescence with specific antibodies or through fluorescent protein expression under the control of specific promoters for NG2 and PDGFR $\beta$  (Ozerdem *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2014; Hartmann *et al.*, 2015a and 2015b; Jung *et al.*, 2018; Smyth *et al.*, 2018). Notwithstanding, immune techniques involve several steps that take place over hours or days, whereas generation of reporter mice is costly and laborious, mainly in studies employing transgenic mouse models. Herein, we describe a simple, robust and rapid (*e.g.*, min) fluorescent labelling assay to image pericytes in murine brain slices with the far-red fluorophore TO-PRO<sup>TM</sup>-3 lodide 642/661. This carbocyanine monomer probe has recently been recognized as a pericyte biomarker in both *ex vivo* (Mai-Morente *et al.*, 2021) and *in vivo* (Tong *et al.*, 2021) conditions. TO-PRO-3 stains nucleus in fixed tissue (Van Hooijdonk *et al.*, 1994; de Mazière *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1997), but is selectively incorporated by living pericytes *ex vivo* when applied into the physiological saline or *in vivo* after topical

## bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

administration (Lacar *et al.*, 2012; Mai-Morente *et al.*, 2021; Tong *et al.*, 2021). Identification of murine brain pericytes by TO-PRO-3 is unambiguous in the tested age range (P06-P90) and, as reported (Mai-Morente *et al.*, 2021), TO-PRO-3-stained pericytes express the classical pericyte immunomarkers NG2 and PDGFR $\beta$  and incorporate the pericyte dye NeuroTrace 500/525 (Damisah *et al.*, 2017). Only a subset of TO-PRO-3 pericytes expresses the contractile protein alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (Mai-Morente *et al.*, 2021). The far-red emitting TO-PRO-3 dye exhibits negligible autofluorescence and phototoxicity (Suseela *et al.*, 2018), which favours its use in live imaging; additionally, TO-PRO-3-loaded slices can be fixed and processed for immunolabelling (Lacar *et al.*, 2012; Mai-Morente *et al.*, 2021). Since TO-PRO-3 resists immunostaining and fluoresces far from the green and red fluorophores in the light spectrum, it is appropriate for multiple labelling with fluorescent-conjugated probes and antibodies or green fluorescent protein (GFP) reporters. The protocols described here include procedures to identify vessels and astroglia intimately associated with TO-PRO-3-labelled pericytes. Given the ease and reliability of the technique, mapping pericytes with TO-PRO-3 should facilitate future research on pericyte structure and function in cerebral slices.

#### Materials and Reagents

- 1. 96-well plate
- 2. 6-well plate
- 3. 12/24-well plate
- 4. Ice plastic tray with silicone bottom for domestic use
- 5. Nylon mesh of a tea plastic strainer
- 6. Plastic transfer pipettes (Biologix, catalog number: 30-0138)
- 7. Sartorius mLINE® mechanical Biohit pipettors 2, 20, 200 and 1,000 µI
- Six-well, twenty-four-well and ninety-six-well multidishes (DeltaLab, catalog numbers: 657160, 662160 and 655180, respectively)
- 9. Custom-made strainer
- 10. Perfusion chamber
- 11. Transparent (glass or polypropylene) cylindrical test tubes with rounded bottom
- 12. Conventional 21 gauge (21 G) syringe needles
- 13. BD Intramedic<sup>™</sup> Polyethylene Tubing, 100 ft × 0.034" × 0.050" (Becton Dickinson, catalog number: 427421)
- 14. Microscope glass slides (Deltalab, catalog number: D 100001)
- 15. Microscope glass coverslips (Deltalab, catalog number: D 102440) and N1.5 (Knittel Glass, catalog number: VM52440Y1A0.1)
- 16. Aluminium foil
- 17. Absorbent tissue
- 18. Adhesive tape
- 19. Permanent marker pen

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

- 20. Fine-tipped paintbrushes
- 21. Nail varnish
- 22. Hippocampal and cortical slices (300-400 μM thick) from P06-P90 male and female mice [*Mus musculus* on a C57BL/6 background (Jackson Laboratory, RRID: IMSR\_JAX: 000664)] and *Rattus norvegicus* [Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Strain code 400)]
- 23. MilliQ-water or double-distilled water (ddH<sub>2</sub>O)
- 24. Quinolinium, 4-[3-(3-methyl-2(3H)-benzothiazolylidene)-1-propenyl]-1-[3-(trimethylammonio) propyl]-, diiodide/157199-63-8 or TO-PRO<sup>™</sup>-3 lodide 642/661 (Life Thermo Fisher Scientific, catalog number: T3605)
- 25. Neurotrace<sup>™</sup> 500/525 Green Fluorescent Nissl (Life Thermo Fisher Scientific, catalog number: N21480)
- 26. Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich, catalog number: P4832)
- 27. Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin DyLight 488 (LEL-DyLight 488) (Life Thermo Fisher Scientific, catalog number: L32470)
- 28. Isolectin B4 conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC-ISOB4) (Sigma-Aldrich, catalog number: L2895)
- 29. Rabbit anti-GFAP-Cy3<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich, catalog number: C9205)
- 2-[4-(Aminoiminomethyl) phenyl]-1H-Indole-6-carboximidamide hydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich, catalog number: D09542)
- 31. Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, catalog number: 23491-45-4)
- 32. Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, catalog number: 048-46-8)
- 33. Glycine (Sigma-Aldrich, catalog number: 56-40-6)
- 34. Glycerol or Fluoromont-G<sup>™</sup> Mounting Medium (Life Thermo Fisher Scientific, catalog number: 00-4958-02)
- 35. NaCl (Sigma-Aldrich, catalog number: 7647-14-5)
- 36. KCI (Sigma-Aldrich, catalog number: 7447-40-7)
- 37. NaHCO3 (Sigma-Aldrich, catalog number: S5761)
- 38. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, catalog number: 10049-21-5)
- 39. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, catalog number: S9763)
- 40. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, catalog number: P0662)
- 41. Glucose (Sigma-Aldrich, catalog number: G5767)
- 42. MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, catalog number: M7506)
- 43. CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, catalog number: C3881)
- 44. Paraformaldehyde powder (PFA) (Sigma-Aldrich, catalog number: 158127)
- 45. NaOH and HCI
- 46. Artificial cerebrospinal fluid solution (ACSF) (see Recipes)
- 47. Blocking/permeabilizing solution (see Recipes)
- 48. Diluting solution for antibodies (see Recipes)
- 49. Fixing solution (see Recipes)

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

- 50. Phosphate buffered saline (PBS) (see Recipes)
- 51. PBST (see Recipes)

#### **Equipment**

- 1. Gas tank 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>
- 2. Digital pHmeter (ORION, model: 410A)
- 3. Digital Analytical Balance (RadWag, AS82/220.R2)
- 4. Thermolyne Type 16700 Mixer Maxi-Mix1 vortex mixer
- 5. TS-2000A VDRL Shaker
- 6. Fume hood 1300 Series A2 Class II, Type A2 Bio Safety Cabinets
- 7. Thermo Scientific<sup>™</sup> Cimarec<sup>™</sup> Basic Stirring Hotplates SP13132033 (ThermoFisher Scientific)
- 8. Confocal Laser Scanning Microscope (Leica TCS SP5 TANDEM SCANNER) equipped with:
  - a. A 40× oil immersion objective Leica N.A 1,3 with UV correction.
  - b. 405 nm diode laser, argon gas laser emission at 488 nm and HeNe lasers for 543 nm and 633 emission.
- 9. Coverslip Clamp Chamber (ALA Scientific Instruments Inc.)
- 10. HCT-10 Temperature Controller (ALA Scientific Instruments Inc.)
- 11. Peristaltic Pump (Scientific Industries Inc., Model 203)
- 12. Refrigerator and freezer
- 13. Thermostatic water bath

#### Software

- 1. Image acquisition and storage system (LAS AF Lite Software)
- 2. Image analysis software (Fiji, ImageJ version 1.53c)
- 3. Photo editing software (Adobe Photoshop CS6 13.0 × 64 and Adobe Illustrator CS6 16.0.0)

#### **Procedure**

Before getting started, obtain acute cortical and hippocampal slices (300  $\mu$ m thick) from mice and allow them to stabilize for 45 min in a storage chamber resting on a nylon mesh submerged in ACSF equilibrated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, at room temperature (RT: 22°C-25°C). Detailed protocols for preparing acute cerebral and hippocampal slices from rodents can be found elsewhere (Lein *et al.*, 2011; Pannasch *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2014; Papouin and Haydon, 2018).

Note: To obtain good quality slices, heed the following recommendations: (1) rapidly remove the brain after confirming the animal's death, (2) use chilled materials (chambers, dishes, instruments) and keep the tissue immersed in ice-cold ACSF carbogenated with 95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$  throughout dissection and slicing procedures, and (3) employ one fresh razor blade per brain to prevent tissue deformation.

bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

#### A. Vessel and pericyte labelling with lectins in brain slices

For simultaneous identification of lectin-labelled vessels and TO-PRO-3-marked pericytes, follow Procedures A and B. If not interested in visualizing vessels, proceed to Procedure B.

- In our experiments, we succeeded in visualizing vessel walls and pericyte contours using any of these two probes, (a) Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin conjugated to DyLight 488 (LEL-DyLight 488) or (b) IsolectinB<sub>4</sub> conjugated to FITC (FITC-ISOB<sub>4</sub>). Prepare the dye solution by dissolving (a) LEL-DyLight 488 in carbogenated ACSF to yield a 10 µg/ml final concentration or (b) FITC-ISOB<sub>4</sub> in carbogenated ACSF to yield a 5-10 µg/ml final concentration. Pre-warm (35°C-37°C) the dye solution in a thermostatic water bath protected from light. *Notes:*
  - a. Lectins bind to glycoconjugate residues in basement membranes of endothelium and pericytes (Peters and Goldstein, 1979; Laitinen, 1987; Mishra et al., 2014).
  - b. Vortex stock solutions prior to use.
  - c. Use freshly prepared dye solutions.
- 2. Transfer acute slices with a plastic pipette (Figure 1A) from the storage chamber to an empty cylindrical transparent tube provided with fine-tipped tubing for gas delivery (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) (Figure 1B). With a 1,000 µl pipettor, pull the ACSF out of the tube. Keep slices on the bottom and immediately add 1 ml minimum of the pre-warmed dye solution into the tube (Video 1).

Notes:

- a. Use the fine-tipped plastic pipette to transport hippocampal slices and a modified transfer pipette (without tip) for cortical slices (see Figure 1A).
- b. In one tube accommodate, at least 6-10 hippocampal slices or 3-4 cortical slices.
- c. The described procedure decreases the chances of diluting a small volume of dye solution.



#### Figure 1. Transfer pipettes and dye-loading tube.

A. Plastic pipettes (3 ml) used to transfer hippocampal (a) or cortical (b and c) acute slices. The length of the pipette in (a) is 16 cms. In (b) and (c), the fine tip of the plastic pipette has been



www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

cut and removed to prevent damage to the cortical slices during their passage through it. B. Rounded bottom dye-loading tube with fine tubing for gas delivery.



Video 1. Slice transfer procedure

 After transferring the slices, place the dye loading tube with the slices into the thermostatic water bath (35°C-37°C). Keep slices incubated in the dye solution carbogenated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> for 30 min in the dark.

Note: Maintain the fine-tip of the gas tubing as distant as possible from the bottom of the loading tube to prevent bubbling from disturbing the slices (see Video 1).

 After 30 min, remove the dye solution from the tube with a 1,000 µl pipettor while keeping slices at the bottom. Rapidly, add a minimum of 1 ml of normal ACSF into the tube to rinse slices for 15 min.

Notes:

- a. Rinsing slices will stop labelling and reduce background.
- b. During and following the rinsing period, protect slices from light.
- B. Pericyte identification with TO-PRO-3 in brain slices
  - Prepare dye-loading and rinsing chambers. To do so, fill two chambers with 10 ml of ACSF and bubble the solution with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> for at least 20 min before submerging the slices. Add 10 µl of the stock solution of TO-PRO-3 into the dye-loading chamber to yield a 1 µM final concentration. Protect solutions from light with aluminium foil. Place a little strainer into a contiguous chamber (Figures 2a-2b).

Notes:

- a. Wells of a 6-well plate can be used as adequate dye loading and rinsing chambers, as shown in Figure 2.
- b. A little homemade strainer with adequate size to fit into the well allows simultaneous transport of all slices and exchange of both slice surfaces with carbogenated ACSF during

bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

the whole procedure (Figure 2). To build the strainer, follow the procedure described in Figure 3.

- c. Place recording and rinsing chambers side by side to facilitate the rapid transfer of slices between chambers (Figure 2).
- d. Wear latex or nitrile gloves to protect yourself when manipulating TO-PRO-3.
- e. Vortex the stock vial of TO-PRO-3 before use.
- f. Use freshly and daily prepared dye solution.
- g. Agitate the dye-loading chamber to dissolve the dye into the ACSF until the dilution becomes homogenous.
- *h.* If slices from numerous animals are going to be loaded, it is convenient to prepare an additional loading chamber. In our hands, it is possible to use the same dye solution twice (up to 20 hippocampal slices each).



# Figure 2. Step-by-step procedure employed to load pericytes with TO-PRO-3 in acute hippocampal slices.

(a, a') Fill two wells of a six-well plate ( $12 \times 8$  cms) with 10 ml of ACSF each and bubble the solution with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> through a fine tubing. Place a little strainer into an empty well. (b, b') Apply a volume ( $10 \mu$ I) of the TO-PRO-3 stock solution into the dye-loading chamber and agitate to facilitate dye dissolution. (c, c') Pick up brain slices with a transfer pipette and pour them on the top of the strainer (the ACSF contained in the transfer pipette will drop into the empty chamber while the mesh will retain the slices). Rapidly incubate the strainer carrying the slices into the dye-loading chamber. (d, d') After a dye-loading period of 20 min, transfer the strainer with the TO-PRO-3-loaded slices into the rinsing chamber for 15 min. During the whole procedure, maintain slices and solutions protected from light with aluminium foil. The fields within the white rectangles in pictures (a-d) have been zoomed (2.4×) and are shown below (a', b', c' and d'). Hereinafter, acute slices with TO-PRO-3 loaded pericytes can be either fixed or used in living experiments (*e.g.*, electrophysiological recordings or calcium dynamics analysis).



**Figure 3.** Construction of a custom-built strainer to hold and transfer acute brain slices. (a) Isolate one well from a plastic ice tray and preserve an edge around the well. (b) Remove the bottom well. Be aware that the final height of the strainer measures more than 1,3 cms (shown in f). (c) Cut a round piece of nylon mesh, ensuring that the mesh diameter fits the well diameter. Glue the borders of the mesh to the outside borders of the well hole with a silicone sealer. (d) Allow the strainer to dry for 24 h and rinse with ddH<sub>2</sub>O before use. (e and f). Introduce the strainer into the 6-well plate and check that the mesh allows ACSF to pass through it with ease.

Pick up the acute slices from the tube or from a storage chamber with a plastic pipette (Figure 1), and place them over the nylon mesh of the little strainer, allowing the ACSF to drop into the empty well. Rapidly introduce the strainer carrying the slices into the loading chamber for 20 min at RT in the dark (Figure 2c).

Notes:

- a. Transferring the slices with a strainer instead of using a plastic pipette will prevent diluting the dye solution in the loading chamber.
- b. Protect slices and solutions from light with aluminium foil during dye loading and postloading periods.
- Following the incubation period with TO-PRO-3, transfer the strainer carrying the slices from the loading chamber to the rinsing chamber for 15 min (Figure 2d). *Notes:*
  - a. Rinsing slices will stop dye incorporation into cells, reduce background labelling and prevent unspecific uptake.

bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

- b. Since the TO-PRO-3 probe shows a high affinity for DNA (Suzuki et al., 1997), once bound to the nucleic acids, the dye is expected not to leak through the membrane and stay intracellular.
- 4. Following the rinsing period, counterstain with Hoechst 33342 (0.5 μM in ACSF) for 10 min at RT, if TO-PRO-3-loaded slices are to be used in living experiments (*e.g.*, electrophysiological recordings or calcium dynamics analysis).
- 5. To use fixed slices, submerge the TO-PRO-3-loaded slices in fixing solution for 40 min at RT under mild shaking. Rinse fixed slices in PBS twice, for 5-10 min each rinse. Note: Do not use materials (chambers, tubes, pipettes, tubing, and instruments) in contact with fixed tissue to manipulate living tissue.
- Counterstain with DAPI (1-5 μM in PBST) or Hoechst 33342 (0.5 μM in PBST) for 10 min at RT under gentle shaking. Rinse fixed slices in PBS, 1-2 times for 5-10 min each. *Notes:*
  - a. Use DAPI or Hoechst 33342 to label DNA in fixed slices and Hoechst 33342 to counterstain nucleus in acute slices; Hoechst 33342 is relatively nontoxic and nonmutagenic to living cells (Durand and Olive, 1982).
  - b. Counterstaining with DAPI or Hoechst 33342 favours referencing of the slice structure in the hippocampus.
  - c. For steps B5 and B6, it is convenient to employ a 12/24-well plate.
  - d. Fixed slices can be stored in PBS at 4°C, protected from light for 24-48 h before being mounted.
- 7. To mount fixed slices, pick up the sections from the well with a fine-tipped paintbrush and place them on a microscope slide. Remove the excess PBS with an absorbent tissue or dry it by incubating slides at 37°C for 5 min. Add a drop of mounting solution (glycerol or Fluoromont-G<sup>™</sup> Mounting Medium) to cover the slices. Gently apply a coverslip over the mounting media, avoiding the generation of bubbles, and seal the coverslip by applying nail varnish at its borders. Store slides at 4°C in the dark for at least 24 h before analysis with a confocal laser-scanning microscope.

Notes:

- a. Waiting overnight before taking photos decreases photobleaching.
- b. In our hands, mounted sections stored in the dark at 4°C preserve the bright TO-PRO-3 stain in pericytes for at least 1-1.5 months (Mai-Morente et al., 2021).

Figures 4 and 5 illustrate representative examples of TO-PRO-3-labelled pericytes from rodents in fixed hippocampal slices. Figure 5 shows TO-PRO-3-stained pericytes in adjacency to lectin-stained vessels.

### bio-protocol

#### www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222



#### Figure 4. TO-PRO-3-labelled pericytes in fixed slices of the murine hippocampus.

A. Confocal images of mouse hippocampus illustrate a fluorescent field of the stratum radiatum with TO-PRO-3-stained pericytes (a) and the inverted fluorescent version of the same field (a'). The area within the white rectangle in (a) has been zoomed and is shown below. Note the bright spindle-shaped TOPRO-3 somas giving origin to longitudinal processes. The inverted image in (a') evidences pericyte prolongations marked with the fluorophore. Each image is representative of the hippocampi of 40 mice. B. The fluorescent image illustrates pericytes labelled with TO-PRO-3 in the rat hippocampus. The pericytes within the white rectangles have been zoomed to facilitate the visualization of prolongations stained with TO-PRO-3. Each image is representative of the hippocampi of 10 rats. In all images, the TO-PRO-3 fluorescence is pseudo-coloured in green.


www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222



# Figure 5. TO-PRO-3-pericyte somas outline the cerebral microvasculature.

A. The fluorescent micrograph illustrates TO-PRO-3-labelled pericytes in the mouse cerebral cortex associated with Tomato Lectin-marked vasculature. The image is representative of five mice. B. Different fluorescent views of mouse hippocampus (a; b, b'; c) illustrate TO-PRO-3-labelled pericytes and Isolectin B<sub>4</sub> (FITC-ISOB<sub>4</sub>)-marked pericytes and vessels. The picture in (b') represents the same field as (b) in which the TO-PRO-3 view has been merged. The FITC-ISOB<sub>4</sub> probe stains basement membranes of endothelium and pericytes. Note the ISOB<sub>4</sub> mark shaping the contour of the TO-PRO-3-labelled soma in (b) and the TO-PRO-3 prolongations delineating the vessel wall in (b'). Each image is representative of 10 mice. In all images, the TO-PRO-3 fluorescence is pseudo-coloured in green, and the fluorescence of Tomato Lectin and ISOB<sub>4</sub> is pseudo-coloured in red.

C. Identification of astrocytes and pericytes in brain slices

For simultaneous identification of pericytes and astrocytes, follow Procedures B and C. To include vessel identification, follow Procedures A, B and C.

bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

1. Immerse fixed slices pre-loaded with TO-PRO-3 in a blocking/permeabilizing solution for 2 h in agitation at RT in the dark.

Notes:

- a. To do this step, it is possible to use a 12/24-well plate.
- b. Blocking/permeabilizing solution and antibody and fixing solutions are freshly prepared. In our experience, these solutions can be stored at 4°C for one week.
- c. The blocking/permeabilizing solution blocks unspecific sites and permeabilizes cell membranes prior to antibody application.
- 2. Wash slices three times in PBST for 5-10 min each under gentle shaking. Protect the slices from light with aluminium foil.
- Incubate slices in diluting solution for antibodies with primary antibody anti-GFAP conjugated with Cy3 (1:400) for 2 h at RT under gentle agitation and protected from light. *Notes:*
  - a. Incubate hippocampal slices in antibody solution using a 96-well plate to save antibody. The volume of the antibody solution should be sufficient to cover the slices (200 µl minimum).
  - b. Use a fine-tip paintbrush to transfer slices into the well or to remove them from it.
- 4. Rinse slices three times in PBST for 10 min each under agitation and protected from light.
- Treat slices for 10 min with DAPI (1-5 μM in PBST) or Hoechst 33342 (0.5 μM in PBST) at RT under mild agitation and rinse them again with PBST.
   Note: In steps C4 and C5, it is possible to use a 12/24-well plate.
- 6. To mount slices, follow the guidelines detailed in Step B7. Store slides at 4°C in the dark for at least 24 h before analysis with a confocal laser-scanning microscope. Figure 6 illustrates different fields of the mouse hippocampus with TO-PRO-3-stained pericytes and GFAP-labelled astrocytes. The intimate rapport between pericyte somata and astrocyte end

feet is evidenced. Triple labelling of TO-PRO-3-stained pericytes, GFAP-positive astrocytes and IsoB4-labelled vessels is also shown (Figure 6D).

bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222





(A) (a, a') A fluorescent view of a mouse hippocampus field (stratum radiatum) illustrates TO-PRO-3-labelled pericytes and GFAP-labelled astrocytes (a). The inverted fluorescent version of this field is shown in (a'). Nuclei stained with DAPI have been superimposed. (B) and (C) (a, a') Photos of mouse hippocampus illustrate the intimate relationship between GFAP-stained astrocyte foot processes and TO-PRO-3-labelled pericyte somas. The inverted fluorescent version of the field shown in (a) is revealed in (a'). The area within the white box in (B) has been zoomed to evidence the rapport between the pericyte and the astrocyte foot process. Images are representative of the hippocampi of six mice. (D) (Same field a, a') Fluorescent images illustrate TO-PRO-3-labelled pericyte somas lining a vessel in the hippocampus and GFAPstained astrocyte prolongations reaching the vasculature and the pericyte somas. The basal lamina of the vessel endothelium has been stained with ISOB<sub>4</sub>. Images are representative of hippocampi of 10 mice. In all images, the TO-PRO-3 fluorescence is pseudo-coloured in green, and the fluorescence of ISOB<sub>4</sub> is pseudo-coloured in red.

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

Notes:

- a. If required, additional immunostaining is possible (e.g., microglial or neuronal markers) in TO-PRO-3 slices (Mai-Morente et al., 2021).
- b. Waiting overnight before taking photos decreases photobleaching.
- c. Alternatively, slices derived from transgenic hGFAP-eGFP mice (Nolte et al., 2001) that allow easy identification of astrocytes can be subjected to procedures described in Item B for the simultaneous staining of astrocytes and pericytes in either acute or fixed slices.
- D. Pericyte identification with TO-PRO-3 and NeuroTrace 500/525 in acute slices
  - Repeat procedures described in Steps B1 to B3 but in addition to TO-PRO-3, apply NeuroTrace 500/525 (NeuroTr) (1:50 to 1:500 dilution of the stock solution) into the loading chamber for double labelling of pericytes (NeuroTr/TO-PRO-3). For exclusive staining with NeuroTr just dilute this probe into the loading chamber.

Notes:

- a. Adjust the optimal dilution of NeuroTr to your preparation.
- b. As for TO-PRO-3, vortex the stock solution of NeuroTr prior to use, prepare fresh dye solutions and protect solutions and slices from light during loading and post-loading periods.
- c. For simultaneous identification of pericyte somas with NeuroTr and vessels with lectins, use commercially available lectins conjugated to fluorophores other than FITC, Alexa 488 or DyLight 488 to prevent spectral overlap between these fluorophores and NeuroTr.
- d. NeuroTrace 500/525 has been recently identified as a pericyte marker in vivo (Damisah et al., 2017) and ex vivo (Mai-Morente et al., 2021).
- If desired, counterstain the nucleus by incubating acute slices in carbogenated (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) ASCF containing Hoechst 33342 (0.5 µM final concentration) at RT for 15 min. Wash once in carbogenated ASCF for 10 min at RT. After the rinsing period, the dye-loaded living slices are ready to use in living experiments.

Figure 7 illustrates live pericytes co-stained with NeuroTr and TO-PRO-3 adjoining a vessel in a mouse hippocampal acute slice.



# **Figure 7. TO-PRO-3 labels live pericytes in acute slices of mouse hippocampus**. (a-a<sup>'''</sup>) The same field of the mouse hippocampus illustrates live pericytes identified with TO-PRO-3 (a) and NeuroTrace 500/525 (a'); co-localization of both dyes plus Hoechst 33342 is shown in (a<sup>'''</sup>) where the brightfield view has been merged to fluorescent images. The pericyte

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

within the white box has been zoomed. In (a<sup>('')</sup>), pericytes lie down adjacent to a microvessel; the asterisk within the zoomed box indicates blood accumulation. Note TO-PRO-3-stained prolongations surrounding the vessel wall. Images are representative of hippocampi of 15 mice. The TO-PRO-3 fluorescence is pseudo-coloured in green, whereas the fluorescence of NeuroTr is pseudo-coloured in red.

Notes:

- a. Counterstaining with Hoechst 33342 enables referencing the slice structure in the hippocampus.
- b. In addition to NeuroTr-labelled pericytes, living astrocytes might be imaged with the fluorescent dye sulforhodamine 101 (SR101; Exc. 586/Em. 605), which enables staining of glial cells in vivo and ex vivo (Nimmerjahn et al., 2004; Nimmerjahn and Helmchen, 2012; Kafitz et al., 2008). Alternatively, for concurrent labelling of pericytes and astrocytes in living sections, slices derived from transgenic hGFAP-eGFP mice that allow detailed visualization of the astrocyte morphology (Nolte et al., 2001) can be loaded with TO-PRO-3. Notice that the same laser allows visualization of NeuroTr 500/525-loaded pericytes and hGFAP-eGFP astrocytes; therefore, NeuroTr is not appropriate to identify pericytes in acute slices derived from transgenic eGFP-mice.

#### E. Image acquisition

1. For fixed preparations, mount microscope slides with TO-PRO-3-loaded hippocampal sections onto the stage of a confocal microscope (Leica SP5 TANDEM SCANNER). Labelled cells are visualized with a 40× oil immersion objective. Capture images and z-stacks with a digital camera connected to the imaging LAS AF Lite Software in data acquisition mode "xyz", acquisition speed of 400 Hz (*i.e.*, 400 lines/s), image resolution of 1,024 × 1,024 pixels and value of "line average" equal to 2 to reduce noise. Under UV, select the field of interest and focus the area under study. Then, switch to the He-Ne 633 nm filter and tune "gain and offset" parameters in the detection system to optimize the signal intensity/noise ratio of TO-PRO-3, avoiding oversaturation so that bright fluorescent pericytes can easily be discriminated from the background and other cells. Switch to channels 488 nm and 543 nm to visualize lectin-stained vessels and GFAP-labelled astrocytes, respectively, and set up microscope parameter values. Determine the z-stack size and set the "start" and "end" values of the z-stack step. Take images at distances > 15-20 µm from the slice surface, as in surface areas reside damaged cells and reactive astrocytes due to membrane injury during slicing (Takano *et al.*, 2014). These are shown in Figure 8.

# bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222



# Figure 8. Reactivity gradient of astroglia at different distances from the slice surface.

Fluorescent photos of mouse hippocampus acquired at 12  $\mu$ m (a, a'), 10  $\mu$ m (b, b') and 8  $\mu$ m (c, c') from the slice surface are shown; note the GFAP up-regulation in the outermost areas of the slice indicative of reactive astrogliosis. Fields (a, b and c) are the same as those (a', b' and c' respectively) in which the DAPI fluorescence has been merged. Images are representative of the hippocampi of seven mice. In all images, the TO-PRO-3 fluorescence is pseudo-coloured in green.

- 2. For acute slices, after setting the perfusion system, transfer one or two slices to the bottom of the recording chamber. Mount the perfusion chamber onto the stage of a confocal microscope and perfuse with ACSF equilibrated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> at 1 ml/min. Keep the flow rate steady and set the temperature of the ACSF at 34-37°C by using a heating system. Figure 9 displays the setup employed to image brain pericytes from acute slices stained with TO-PRO-3 and NeuroTr. Under UV, select the working area; thereafter switch to 488 nm and 633 nm lasers to image stained pericytes with NeuroTr and TO-PRO-3. To decrease fading, during time-lapse experiments, acquire images at 512 x 512 pixels resolution and 800 Hz. When zooming, laser gains and exposure times should be optimized to decrease fading. *Notes:* 
  - a. In the hippocampus, the anatomical segregation of DAPI/Hoechst 33342-stained nucleus facilitates the recognition of different areas (CA1, CA2 and CA3 layers, stratum oriens, stratum radiatum, and dentate gyrus).
  - b. Minimize the exposure of living slices to UV to preclude phototoxicity (Suseela et al., 2018).
  - c. As reported by our group, in healthy slices, TO-PRO-3 labelling of pericytes exhibits an excellent signal-to-noise ratio; incorporation of TO-PRO-3 by living pericytes is mediated by an actively operated transport mechanism that concentrates the dye into pericytes, resulting in bright labelling of somas and prolongations (Mai-Morente et al., 2021). Therefore, staining with TO-PRO-3 facilitates the identification of pericyte morphology and location during fluorescence imaging. According to our experience, pericytes from unhealthy slices fail to concentrate the dye.

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

- d. The bottom of the perfusion chamber is made of a poly-L-lysine-coated coverslip (Nr 1.5), which helps to immobilize the slices.
- e. In our hands, the bright fluorescence of the TO-PRO-3-stain in pericytes is very stable in PFA-fixed slices and lasts up to 1.5 months for sections mounted on slides and stored at 4°C in the dark. Under time-lapse acquisition of living slices, TO-PRO-3 fluorescence is more labile than in fixed slices (Mai-Morente et al., 2021). Indeed, NeuroTr fluorescence is more resistant to photobleaching than TO-PRO-3 fluorescence during image acquisition in acute brain slices.
- f. Work in the same range distance (e.g., from 20 to 50 μm from the slice surface) for conditions whose data will be compared since responses might depend along a spatial gradient propagation through the slice depth (Tian et al., 2010; Hall et al., 2014; Mishra et al., 2014).



Figure 9. Setup for high-resolution imaging of TO-PRO-3-labelled and NeuroTracelabelled pericytes in acute brain slices.

(a) General overview of the setup employed for recording TO-PRO-3-labelled pericytes in living hippocampal slices. The inset in (a') illustrates the system heater employed to regulate the temperature of the recording chamber. (b) (\*) Detail of recipients containing ACSF. The solution is equilibrated by a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> delivered by the tubing shown

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

in (b') (the tubing should be introduced into the ACSF). (c and c') Zoomed views of the recording chamber without (c) and with (c') a hippocampal slice. The oil drop between the 40x oil objective and the bottom of the chamber is visible. The bottom of the chamber is made of a poly-L-lysine-coated coverslip to secure the slice. The tubing for flow perfusion of ACSF (flow IN/flow OUT) has been represented.

# Recipes

Note: Use freshly prepared solutions.

- 1. Artificial cerebrospinal fluid (ACSF)
  - In 1 L of MilliQ-water or ddH<sub>2</sub>O dissolve:
  - 7.824 g NaCl
  - 0.21 g KCl
  - 2.476 g NaHCO<sub>3</sub>
  - 0.155 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 2.23 g glucose
  - $0.36 \ g \ MgSO_4$

Bubble with 95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$  for 20 min.

Add 0.368 g CaCl<sub>2</sub> and adjust the pH to 7.4.

Test osmolarity (300-310 mOsm).

Store at 4°C.

- 2. Phosphate-buffered saline (PBS)
  - In 1 L of MilliQ-water or ddH<sub>2</sub>O, dilute:
  - 8 g NaCl
  - 0.2 g KCl
  - 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - Adjust pH to 7.4.

Store at 4°C.

- Phosphate-buffered saline with 0.5% Triton X-100 (PBST) To obtain 100 ml of PBST, add 500 μl of Triton X-100 to 99.5 ml of PBS. Store at 4°C.
- Blocking/permeabilizing solution
   Dilute 2% bovine serum albumin (BSA) and 0.2 M glycine in PBST.
   Store at 4°C.
- Diluting solution for antibodies
   Dilute 2% bovine serum albumin (BSA) in PBST.
   Store at 4°C.
- 6. Fixing solution 4% PFA in PBS

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

Note: Toxicity/Safety. PFA is a toxic, corrosive, irritant, and carcinogenic compound. To avoid skin contact and inhalation, wear protective clothing (e.g., gloves, mask, and robe) and work under a gas extraction cabinet while manipulating PFA.

Dilute 4 g PFA in 100 ml of PBS, stir the solution at 80°C, adjust pH to 7.4 using NaOH, and filter the solution.

Store at 4°C.

# Acknowledgments

This work was funded by Proyecto de Investigación y Desarrollo CSIC I+D 2014, ID 48 (Comisión Sectorial de Investigación Científica – Universidad de la República Oriental del Uruguay (CSIC-UDELAR) and Proyecto de Investigación Fundamental Fondo Clemente Estable FCE\_1\_2017\_1\_136103 (Agencia Nacional de Investigación e Innovación del Ministerio de Educación y Cultura del Uruguay (ANII–MEC) to VA. Master Fellowship to VM was funded by ANII-MEC; Doctoral Fellowship to SMM and Master Fellowships to JI and VC were supported by UDELAR.

The protocols describing labelling of cerebral pericytes, astrocytes and vessels were adapted from Mai-Morente *et al.* (2021). The authors thank Luis Vitureira (Departamento de Fisiología), Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE), FUNDACIBA and Unidad de Microscopía Confocal, from Facultad de Medicina - Universidad de la República Oriental del Uruguay, for technical assistance.

# **Competing interests**

The authors declare no competing interests.

# **Ethics**

Experimental procedures were processed following the National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the local regulation (CDC Exp. 4332/99, Diario Oficial No. 25467, Feb. 21/00, Universidad de la República, Uruguay).

# **References**

 Damisah, E. C., Hill, R. A., Tong, L., Murray, K. N. and Grutzendler, J. (2017). <u>A fluoro-Nissl</u> <u>dye identifies pericytes as distinct vascular mural cells during *in vivo* brain imaging. *Nat Neurosci* 20(7): 1023-1032.
</u>

bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

- de Mazière, A. M., Hage, W. J. and Ubbels, G. A. (1996). <u>A method for staining of cell nuclei in</u> Xenopus laevis embryos with cyanine dyes for whole-mount confocal laser scanning <u>microscopy</u>. *J Histochem Cytochem* 44(4): 399-402.
- Durand, R. E. and Olive, P. L. (1982). <u>Cytotoxicity, Mutagenicity and DNA damage by Hoechst</u> <u>33342.</u> J Histochem Cytochem 30(2):111-6.
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., O'Farrell, F. M., Buchan, A. M., Lauritzen, M. and Attwell, D. (2014). <u>Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease</u>. *Nature* 508(7494): 55-60.
- Hartmann, D. A., Underly, R. G., Grant, R. I., Watson, A. N., Lindner, V. and Shih, A. Y. (2015a). <u>Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of</u> <u>transgenic mice.</u> *Neurophotonics* 2(4): 041402.
- 6. Hartmann, D. A., Underly, R. G., Watson, A. N. and Shih, A. Y. (2015b). <u>A murine toolbox for</u> <u>imaging the neurovascular unit.</u> *Microcirculation* 22(3): 168-182.
- Jung, B., Arnold, T. D., Raschperger, E., Gaengel, K. and Betsholtz, C. (2018). <u>Visualization of</u> vascular mural cells in developing brain using genetically labeled transgenic reporter mice. J Cereb Blood Flow Metab 38(3): 456-468.
- Kafitz, K. W., Meier, S. D., Stephan, J. and Rose, C. R. (2008). <u>Developmental profile and properties of sulforhodamine 101--Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus.</u> *J Neurosci Methods* 169(1): 84-92.
- 9. Lacar, B., Herman, P., Platel, J. C., Kubera, C., Hyder, F. and Bordey, A. (2012). <u>Neural progenitor cells regulate capillary blood flow in the postnatal subventricular zone</u>. *J Neurosci* 32(46): 16435-16448.
- 10. Laitinen, L. (1987). <u>Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some</u> <u>epithelial cells in mouse tissues.</u> *Histochem J* 19(4): 225-234.
- 11. Lein, P. J., Barnhart, C. D. and Pessah, I. N. (2011). <u>Acute hippocampal slice preparation and hippocampal slice cultures.</u> *Methods Mol Biol* 758: 115-134.
- 12. Mai-Morente, S. P., Marset, V. M., Blanco, F., Isasi, E. E. and Abudara, V. (2021). <u>A nuclear</u> <u>fluorescent dye identifies pericytes at the neurovascular unit.</u> *J Neurochem* 157(4): 1377-1391.
- Mishra, A., O'Farrell, F. M., Reynell, C., Hamilton, N. B., Hall, C. N. and Attwell, D. (2014). <u>Imaging pericytes and capillary diameter in brain slices and isolated retinae</u>. *Nat Protoc* 9(2): 323-336.
- 14. Nimmerjahn, A. and Helmchen, F. (2012). <u>In vivo labeling of cortical astrocytes with</u> <u>sulforhodamine 101 (SR101).</u> *Cold Spring Harb Protoc* 2012(3): 326-334.
- 15. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N. and Helmchen, F. (2004). <u>Sulforhodamine 101 as a</u> <u>specific marker of astroglia in the neocortex *in vivo*. Nat Methods 1(1): 31-37.</u>
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U. K., Kirchhoff, F. and Kettenmann, H. (2001). <u>GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a</u> tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33(1): 72-86.

bio-protocol

www.bio-protocol.org/e4222

Bio-protocol 11(22): e4222. DOI:10.21769/BioProtoc.4222

- Ozerdem, U., Grako, K. A., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E. and Stallcup, W. B. (2001). <u>NG2</u> proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn* 222(2): 218-227.
- Pannasch, U., Sibille, J. and Rouach, N. (2012). <u>Dual electrophysiological recordings of</u> <u>synaptically-evoked astroglial and neuronal responses in acute hippocampal slices.</u> *J Vis Exp*(69): e4418.
- 19. Papouin, T. and Haydon, P. G. (2018). Obtaining Acute Brain Slices. Bio-protocol 8(2): e2699.
- Peters, B. P. and Goldstein, I. J. (1979). <u>The use of fluorescein-conjugated Bandeiraea</u> <u>simplicifolia B4-isolectin as a histochemical reagent for the detection of alpha-D-galactopyranosyl groups. Their occurrence in basement membranes.</u> *Exp Cell Res* 120(2): 321-334.
- Smyth, L. C. D., Rustenhoven, J., Scotter, E. L., Schweder, P., Faull, R. L. M., Park, T. I. H. and Dragunow, M. (2018). <u>Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells.</u> *J Chem Neuroanat* 92: 48-60.
- 22. Suseela, Y. V., Narayanaswamy, N., Pratihar, S. and Govindaraju, T. (2018). <u>Far-red fluorescent probes for canonical and non-canonical nucleic acid structures: current progress and future implications.</u> *Chem Soc Rev* 47(3): 1098-1131.
- 23. Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T. and Takata, K. (1997). <u>DNA staining for fluorescence</u> <u>and laser confocal microscopy</u>. *J Histochem Cytochem* 45(1): 49-53.
- Takano, T., He, W., Han, X., Wang, F., Xu, Q., Wang, X., Oberheim Bush, N. A., Cruz, N., Dienel, G. A. and Nedergaard, M. (2014). <u>Rapid manifestation of reactive astrogliosis in acute</u> <u>hippocampal brain slices.</u> *Glia* 62(1): 78-95.
- 25. Tian, P., Teng, I. C., May, L. D., Kurz, R., Lu, K., Scadeng, M., Hillman, E. M., De Crespigny, A. J., D'Arceuil, H. E., Mandeville, J. B., *et al.* (2010). <u>Cortical depth-specific microvascular dilation</u> <u>underlies laminar differences in blood oxygenation level-dependent functional MRI signal.</u> *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(34): 15246-15251.
- Tong, L., Hill, R. A., Damisah, E. C., Murray, K. N., Yuan, P., Bordey, A. and Grutzendler, J. (2021). <u>Imaging and optogenetic modulation of vascular mural cells in the live brain</u>. *Nat Protoc* 16(1): 472-496.
- Van Hooijdonk, C. A., Glade, C. P. and Van Erp, P. E. (1994). <u>TO-PRO-3 iodide: a novel HeNe</u> <u>laser-excitable DNA stain as an alternative for propidium iodide in multiparameter flow cytometry</u>. *Cytometry* 17(2): 185-189.