









Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas – PEDECIBA Opción Neurociencias 2023

# Rol de los canales de panexina-1 en la plasticidad sináptica homeostática

Lic. Marina Tizzoni Duarte

Laboratorio de Comunicación Sináptica Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina Universidad de la República Orientadora: Dra. Nathalia Vitureira Co-orientadora: Dra. Verónica Abudara

## Agradecimientos

A Nathalia y Verónica, por guiarme a lo largo de los años en este hermoso proceso.

A Giselle Prunell, Eugenia Isasi y Francesco M Rossi por aceptar formar parte del tribunal, y por sus aportes tan valiosos.

A Beto, Agustina, Vanina y Andrea, porque más que compañeros de laboratorio son amigos que siempre están para apoyarme en todo.

A Marcela, que siempre está para alegrarte el día con su amor, dulzura y buena onda, y es esa persona que siempre está disponible para darte una mano con lo que sea.

A todos los miembros del "Entrepiso / La isla", con quienes compartí miles de almuerzos, llenos de anécdotas e historias que me han sacado muchas sonrisas.

A Sandra, por compartir conmigo sus colonias de animales Panx1KO.

A los funcionarios de URBE, por su apoyo con los animales de experimentación.

A mis amigos, que me han acompañado durante este trayecto, ya sea recorriendo el mismo camino que yo o dedicándose a algo totalmente distinto.

A mi familia, que siempre me apoya con cada paso que doy y me motivan a hacer lo que me gusta.

## Tabla de contenidos

Abreviaturas	5
Resumen	7
Introducción	8
Sinapsis química	10
Terminal presináptica	10
Hendidura sináptica	13
Terminal postsináptica	13
Sinapsis tripartita y multipartita	14
Fuerza sináptica	15
Plasticidad sináptica	16
Plasticidad de Hebb	16
Plasticidad sináptica homeostática	18
PSH postsináptica	19
PSH presináptica	21
Canales de Panexina	25
Hipótesis	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
Materiales y métodos	32
Uso de animales y consideraciones éticas	32
Preparación de placas de cocultivos	32
Obtención de células de hipocampo	32
Preparación de monocapas gliales	32
Cultivos neuronales	33
Combinación de cocultivos	33
Inducción de la PSH	33
Farmacología	34
Inmunocitoquímica	34
Marcaje in vitro live de sinaptotagmina-1	34
Captación in vitro live de bromuro de etidio	34
Imagenología de calcio	34
Análisis de imágenes y estadística	36
Resultados	38

Cultivos neurogliales de hipocampo de ratones Panx1KO no expresan la proteína Panx1.38

Canales de Panx1 y su papel en el ajuste homeostático de la fuerza sináptica
No se observan cambios en la expresión de Cx43 en células gliales provenientes de animales Panx1KO47
La función neuronal se ve disminuida en ausencia de canales de Panx151
La actividad de los canales de Panx1 gliales y neuronales se encuentra regulada durante la PSH
Discusión
Existe un rol diferencial de los canales de Panx1 gliales y neuronales en la PSH66
El ajuste de la función presináptica depende de canales de Panx1 neuronales68
Canales de Panx1 gliales y neuronales contribuyen a la inducción y/o mantenimiento de la PSH mediante ajustes en su actividad71
Conclusiones
Perspectivas a futuro75
Bibliografía76

## **Abreviaturas**

- AMPAR: Receptor de α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
- **AraC:** Antimitótico citosina-β-D arabinofuranósido
- AU: Unidades arbitrarias
- Cxs: Canales de conexina
- DIV: Días in vitro
- GFAP: Proteína glial fibrilar ácida
- HCs: Hemicanales
- KO: Knock out
- LTD: Long term depression (Depresión a largo plazo)
- LTP: Long term potentiation (Potenciación a largo plazo)
- MAP2: Proteína asociada a microtúbulos 2
- NMDAR: Receptor de N-metil-D-aspartato
- P0-P1: Día post-natal 0 día post-natal 1
- PA: Potencial de acción
- PBS: Buffer fosfato salino
- PFA: Paraformaldehído
- pr: Probabilidad de liberación de neurotransmisores
- PSD: Densidad postsináptica
- PSH: Plasticidad sináptica homeostática

Panx1: Panexina 1

Panxs: Panexinas

P2X7R: Receptor purinérgico tipo P2X7

RRP: Ready releasable pool

- **SNC:** Sistema nervioso central
- **TA:** Temperatura ambiente
- TTX: Tetrodotoxina
- UH: Unión en hendidura (gap junctions)
- vGlut1: Transportador vesicular de glutamato 1
- VS: Vesículas sinápticas
- WT: Wild type

## Resumen

La plasticidad sináptica homeostática (PSH) es un tipo de plasticidad que actúa con el fin de estabilizar la actividad de un circuito neuronal frente a perturbaciones en el entorno que pueden llevar a un daño irreparable. Esto es llevado a cabo mediante el ajuste de la fuerza sináptica en dirección compensatoria a los cambios producidos en la actividad circuital. En los últimos años, las células gliales han sido reconocidas como socias activas de las neuronas con un rol crucial en la modulación de la función sináptica, como el ajuste de la excitabilidad neuronal y la fuerza sináptica. Esto es llevado a cabo mediante de calcio (Ca<sup>2+</sup>), así como por la vía no vesicular dependiente de hemicanales de conexinas y panexinas.

Particularmente, la panexina 1 (Panx1) forma canales transmembrana que permiten la liberación de grandes metabolitos como el ATP y el glutamato que modulan la excitabilidad neuronal; sin embargo, el rol de estos canales en la PSH ha comenzado a ser estudiado recientemente.

En el presente trabajo, se investigó el rol que tienen los canales de Panx1 neuronales y gliales en el ajuste homeostático de la función presináptica. A través de la utilización de cocultivos neurogliales de hipocampo de ratón, se observó que tanto los canales gliales como neuronales de Panx1 son necesarios para el ajuste homeostático en la densidad de contactos sinápticos, pero únicamente los canales neuronales de Panx1 son esenciales para el ajuste compensatorio de la función presináptica. Asimismo, la ausencia de canales neuronales de Panx1 previno tanto el aumento homeostático en el tamaño del pool de vesículas sinápticas listas para ser liberadas, así como en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>. Sin embargo, la simple activación de receptores purinérgicos P2X7 es suficiente para compensar la ausencia de los panexones y promover dichos ajustes homeostáticos. Interesantemente, la actividad de los canales de Panx1 gliales y neuronales se encuentra regulada durante la inducción y mantenimiento de la PSH.

En conjunto, estos resultados sugieren que los canales de Panx1 cumplen un rol esencial en el ajuste homeostático de la fuerza sináptica en condiciones de inactividad crónica.

#### Introducción

El sistema nervioso central (SNC) es esencial para el correcto funcionamiento del cuerpo humano, siendo el encargado de controlar y regular una amplia variedad de funciones, desde la respiración y la frecuencia cardíaca, hasta la cognición y el movimiento voluntario. Se estima que el cerebro y la médula espinal de humanos contienen en promedio unos 86,1 mil millones de neuronas, presentando células gliales en una proporción similar (Azevedo et al., 2009; Herculano-Houzel, 2014). Para permitir la comunicación efectiva entre este gran número de elementos, es necesario contar con mecanismos muy eficientes.

En 1897 Sherrington introdujo el término "sinapsis" para describir las uniones intercelulares específicas entre neuronas o entre neuronas y otras células excitables. Estas uniones permiten la propagación precisa y rápida de señales entre células, lo que a su vez permite la formación de circuitos que median las operaciones funcionales específicas de las diferentes regiones del cerebro (Foster & Sherrington, 1897). Se estima que solo en la neocorteza de un humano adulto hay 164 billones de sinapsis, y que en todo el SNC podría haber entre varios cientos de billones a más de mil billones de sinapsis (Silbereis et al., 2016; Tang et al., 2001).

Las sinapsis se pueden clasificar en dos grandes grupos según el mecanismo utilizado en la transferencia de información. El primer grupo son las sinapsis eléctricas, modelo propuesto por Furshpan y Potter, en las cuales la corriente eléctrica se transmite directamente entre ambas células (Figura 1 B) (Furshpan & Potter, 1958). El segundo grupo son las sinapsis químicas, modelo propuesto por Loewi, donde la transmisión de información se produce a través de un mensajero químico (Figura 1 A) (Loewi & Navratil, 1924). Tanto las sinapsis eléctricas como las químicas coexisten en la mayoría de las estructuras nerviosas.

Las uniones en hendidura o *gap* junctions (UH) son el sustrato morfológico de la transmisión eléctrica. Estas uniones consisten en canales intercelulares que conectan el interior de dos células adyacentes, permitiendo el paso bidireccional de corriente eléctrica y pequeñas moléculas, lo que se conoce respectivamente como acoplamiento eléctrico y molecular (Figura 1 B) (Bennett & Zukin, 2004). Las UHs se forman por el ensamblaje de dos hemicanales de conexina (Cx) hexaméricos, cada uno proveniente de una célula adyacente, siendo la Cx36 la más abundante en el cerebro de mamíferos (Pereda, 2014). Las sinapsis eléctricas permiten la propagación bidireccional de la señal

eléctrica y desempeñan un papel importante en la sincronización de la actividad neuronal (Bennett & Zukin, 2004).

A diferencia de la transmisión eléctrica, en las sinapsis químicas no existe continuidad citoplasmática entre las neuronas pre y postsinápticas. En su lugar, estas células se encuentran separadas por la hendidura sináptica, por una distancia de entre 20–40nm (Figura 1 A). La sinapsis química depende de la llegada de un potencial de acción (PA) a la célula presináptica, en la cual al alcanzar el umbral de despolarización se produce la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes, desencadenando así una entrada de Ca<sup>2+</sup> a la terminal presináptica. En consecuencia, se produce la liberación hacia la hendidura sináptica de un intermediario químico conocido como neurotransmisor. Este neurotransmisor actúa sobre receptores específicos anclados a la membrana postsináptica, lo que provoca cambios en el potencial de membrana postsináptico, pudiendo desencadenar la generación de un PA postsináptico. En este trabajo nos enfocaremos en este tipo de neurotransmisión mediada por mensajeros químicos.



**Figura 1. Las dos modalidades principales de transmisión sináptica. (A)** La transmisión química requiere de una maquinaria molecular presináptica sofisticada que regula la liberación de neurotransmisores en respuesta a la despolarización de la terminal presináptica, lo cual produce la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> operados por voltaje. Se requiere, además, una maquinaria molecular postsináptica de similar complejidad. Esto incluye tanto la presencia de receptores ionotrópicos como metabotrópicos específicos para el neurotransmisor capaces de detectar y traducir el mensaje presináptica (B) La transmisión eléctrica es mediada por canales intercelulares comunicantes denominados uniones en hendidura o GAP, los cuales conectan el

Página 9|87

interior de dos células adyacentes, permitiendo el pasaje bidireccional de corrientes eléctricas producidas por iones (flechas) como también por mensajeros intracelulares y pequeños metabolitos (no ilustrados). Tomado de Pereda, 2014.

## Sinapsis química

La transmisión sináptica química requiere un complejo conjunto de moléculas en la terminal presináptica que regulan la liberación probabilística de neurotransmisores en respuesta a la llegada de un PA. Asimismo, se necesita una maquinaria molecular postsináptica igualmente compleja, que incluye receptores de dos tipos: a) ionotrópicos, que permiten la entrada de iones y median acciones sinápticas rápidas, dado que ellos mismos son un canal iónico; y b) metabotrópicos, que actúan indirectamente a través de segundos mensajeros y median respuestas más lentas o moduladoras. La diversidad de estos receptores permite la adaptación de las sinapsis químicas a diferentes necesidades funcionales (Pereda, 2014).

Este trabajo se centra en las sinapsis químicas, las cuales tienen tamaños y morfologías variables, pero comparten características estructurales clave como la terminal presináptica, la hendidura sináptica y la terminal postsináptica (Figura 2 A) (Choquet & Triller, 2013).

## Terminal presináptica

La terminal presináptica es una región especializada del axón presente en la neurona presináptica. Se trata de la región responsable de la liberación de neurotransmisores presentes en vesículas sinápticas (VS), encontrándose en promedio, entre 100 y 200 VS en cada terminal, donde a su vez, cada una de estas almacena miles de moléculas neurotransmisoras (Kandel et al., 2013). Es posible distinguir una región especializada de la membrana plasmática presináptica denominada zona activa, que contiene material electrondenso debido a la gran cantidad de proteínas presentes, tiene forma de disco de 0,2-0,5mm de radio y se encuentra frente a la hendidura sináptica (Südhof, 2012b). Allí las vesículas sinápticas que contienen el neurotransmisor se encuentran ancladas y listas para ser liberadas, constituyendo el pool de VS denominado "ready releasable pool' (RRP) (Harris & Weinberg, 2012). Existen otros dos grupos de VS; el pool de reserva es el más grande y representa la mayoría de las vesículas sinápticas de la terminal presináptica. Estas vesículas se consideran "durmientes", ya que no están listas para ser liberadas inmediatamente, sino que se liberan solo en situaciones de alta demanda, como durante una estimulación intensa (generalmente no fisiológica). Por otro lado, el pool de reciclaje es el segundo en tamaño y se utiliza para reponer el RRP

durante la estimulación fisiológica, cuando las vesículas sinápticas en el RRP se liberan y se agotan (Harris & Weinberg, 2012; Rizzoli & Betz, 2005).



**Figura 2. La maquinaria de una sinapsis química. (A)** Descripción general de una sinapsis excitadora con la zona activa de la terminal presináptica (verde), la hendidura sináptica (naranja) y la terminal postsináptica (PSD, *postsynaptic density*) (azul). **(B)** Se presenta un esquema (superior) y el detalle de los componentes moleculares (inferior) del área de la zona activa presináptica. **(C)** Tomografía 3D de los complejos proteicos en vista lateral (superior) y los componentes moleculares (inferior) en la hendidura sináptica. El material proteico está distribuido de manera tal que la mayor densidad se encuentra en el anillo más externo. **(D)** Esquema de la PSD en vista lateral y desde arriba (superior) y los componentes moleculares de un único *cluster* (inferior) de la PSD. El material que compone la PSD incluyendo los receptores se organiza en ~2-3 agrupaciones diferentes por sinapsis y se dispone en capas verticales en zonas funcionales relevantes. Tomado de Biederer et al., 2017.

La nanoarquitectura molecular de la terminal presináptica es altamente compleja, tal como se ilustra en la Figura 2 B. Es posible distinguir cinco proteínas de la zona activa evolutivamente conservadas: RIM (Rab3-interacting molecules), Munc13, RIM-BP, α-liprina y ELKS. Estas proteínas forman un complejo proteico que se encarga de

organizar los sitios de fusión de las VS con la membrana de la zona activa, organizando el posicionamiento (*priming*) y el anclaje (*docking*) de las VS. Además de anclar y preparar las VS, este complejo proteico recluta canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes. Asimismo, las proteínas bassoon y piccolo guían las VS hasta la zona activa (Figura 2 B) (Biederer et al., 2017).

También se encuentran en la zona activa las proteínas SNARE, esenciales para la fusión de las VS con la membrana plasmática durante el proceso de exocitosis del neurotransmisor. Existen dos grandes grupos de proteínas SNARE: las proteínas v-SNARE (proteínas ancladas a la membrana de la vesícula; sinaptofisina y sinaptobrevina, entre otras) y las proteínas t-SNARE (proteínas ancladas a la membrana plasmática de la terminal presináptica; sintaxina 1A y SNAP-25, entre otras) (Biederer et al., 2017; Choquet & Triller, 2013; Südhof, 2012b). También se encuentran otras proteínas de membrana, como los receptores de neurotransmisor presinápticos y moléculas de adhesión celular trans-sinápticas.

De este modo, la llegada de un PA a la terminal presináptica de la neurona, provoca una despolarización que da lugar a un cambio en el potencial de membrana que desencadena la apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes enriquecidos en la membrana presináptica. Debido a que existe un gradiente electroquímico de Ca<sup>2+</sup> a ambos lados de la membrana presináptica, la apertura de estos canales genera un rápido incremento de la concentración intracelular para este ion, que se une a sinaptotagmina-1 (Stg1), una proteína de las VS considerada el sensor de Ca<sup>2+</sup>. Esto desencadena la unión de las proteínas v-SNARE y t-SNARE, dando lugar a un complejo proteico que provoca la fusión de la membrana de las VS con la membrana plasmática, permitiendo la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica (Südhof, 2012b, 2013). De esta forma, la Stg1 es esencial para la liberación de neurotransmisores rápida dependiente de Ca<sup>2+</sup>, y como tal, presenta una baja afinidad de unión por al Ca<sup>2+</sup> (Xu et al., 2007) y una rápida cinética de desacoplamiento de membrana (Hui et al., 2005). Asimismo, participa de la exocitosis espontánea de neurotransmisores (Xu et al., 2009), y a pesar de estar ampliamente vinculada a procesos de exocitosis, también participa de la endocitosis mediada por clatrina interactuando con los fosfolípidos de membrana y proteínas adaptadoras como AP-2 (X. Wu et al., 2020; Xie et al., 2017; Yao et al., 2012).

Las VS experimentan un proceso continuo de liberación, reciclaje y reutilización el cual se conoce como ciclo de las VS. Esto permite la utilización rápida y repetida durante un período de actividad sináptica sostenida, manteniendo la integridad estructural y

funcional de la terminal presináptica. Así, luego de la exocitosis, las VS sufren endocitosis y se reciclan, siendo nuevamente cargadas con el neurotransmisor específico y formando parte de un nuevo ciclo de liberación. Actualmente se reconocen tres posibles vías de reciclaje de las VS: 1) el mecanismo de *kiss and stay*, donde las VS se cargan nuevamente de neurotransmisores sin desanclarse de la membrana presináptica y, por lo tanto, permaneciendo en el RRP. Este mecanismo sería especialmente importante en la liberación de neurotransmisores en sinapsis de alta frecuencia, ya que permite una liberación más rápida y eficiente de neurotransmisores y reduce la probabilidad de agotamiento del pool de vesículas sinápticas (Südhof & Rizo, 2011); 2) el mecanismo *kiss and run*, donde las VS se fusionan parcialmente con la membrana plasmática generando un poro que permite la liberación parcial pero rápida de los neurotransmisores, reciclándose localmente (Südhof & Rizo, 2011); y, por último, 3) reciclaje completo de las VS, donde estas son endocitadas con una cubierta de clatrina, se recargan de neurotransmisores de forma directa, o bien luego de pasar por un intermediario endosomal (Südhof, 2004; Südhof & Rizo, 2011).

#### Hendidura sináptica

Se trata de un espacio que se sitúa entre las neuronas pre y postsinápticas, con un ancho que oscila entre los 20 y 40 nm, y que desempeña un papel clave en la liberación de neurotransmisores. Este espacio contiene una gran cantidad de moléculas de adhesión asociadas a las membranas pre y postsinápticas (Figura 2 C), que facilitan el proceso de sinaptogénesis y regulan la maduración y transmisión sináptica (Biederer et al., 2017). Además, la hendidura sináptica alberga componentes de la matriz extracelular, que interactúan con receptores, canales iónicos y moléculas de adhesión, y que están implicados en la plasticidad sináptica, así como en la regeneración y desarrollo del SNC (Dityatev & Schachner, 2003; Perez de Arce et al., 2015).

## Terminal postsináptica

Cuando un neurotransmisor es liberado en la hendidura sináptica, este reconoce y se une a receptores específicos ubicados en la membrana plasmática postsináptica, regulando la apertura de canales iónicos de manera directa o indirecta. El complejo macromolecular de señalización anclado en la membrana postsináptica contrapuesta a la zona activa es conocido como zona de densidad postsináptica (*postsynaptic density*, PSD). Este complejo es especialmente notorio en las sinapsis glutamatérgicas excitadoras, y se puede detectar fácilmente por microscopía electrónica debido a su alta concentración de proteínas (Holderith et al., 2012). La PSD está compuesta principalmente por receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR), ácido α-amino-3hidroxi-5-metilo-4-isoxazol propiónico (AMPAR), moléculas de andamiaje (PSD-95, proteína asociada a sinapsis 97, Shank y Homer), protein kinasas, fosfatasas y componentes del citoesqueleto (Figura 2 D) (Chen et al., 2005; Dani et al., 2010). Los receptores son muy dinámicos y se mueven constantemente dentro y fuera de la sinapsis a través de procesos regulados de difusión lateral a lo largo de la membrana, intercambios entre los sitios intra y extrasinápticos, y mediante ciclos de endocitosisexocitosis entre los depósitos intracelulares y la superficie de la membrana (Choquet & Triller, 2013).

La unión del neurotransmisor a su receptor postsináptico desencadenará un cambio en el potencial de membrana de la neurona postsináptica despolarizante (PPSE, potencial postsináptico excitador) o hiperpolarizante (PPSI, potencial postsináptico inhibidor), dependiendo del tipo de receptor activado. Generalmente los PPSE resultan de la apertura de canales de Na<sup>+</sup> dependientes de ligando, donde la entrada de Na<sup>+</sup> conduce a una disminución en la polaridad de la membrana. Por otro lado, habitualmente los PPSI resultan de la actividad de ciertos neurotransmisores sobre canales de Cl<sup>-</sup> o de K<sup>+</sup>, cuyos potenciales de equilibrio son aún más negativos que el potencial de membrana en reposo y, por lo tanto, la apertura de estos canales hiperpolariza la membrana (Kandel et al., 2013; Purves et al., 2004).

Esta modalidad de transmisión sináptica posee una latencia de aproximadamente 0,6 ms, lo que representa una velocidad más lenta en comparación con las sinapsis eléctricas (Lisman et al., 2007). No obstante, una propiedad clave de estas sinapsis es su capacidad de amplificación: dado que una pequeña cantidad de moléculas de neurotransmisor es suficiente para activar un receptor, la liberación de una sola vesícula sináptica puede desencadenar la apertura de múltiples canales iónicos, lo que permite despolarizar una célula postsináptica grande (Kandel et al., 2013; Purves et al., 2004).

## Sinapsis tripartita y multipartita

Es importante señalar que en los últimos años ha habido un cambio de paradigma en relación al papel de las células gliales en el SNC. A pesar de que en el pasado se consideraba que estas células eran simplemente responsables de brindar soporte y nutrición a las neuronas, actualmente se ha planteado que también contribuyen al desarrollo del SNC, la generación de nuevas sinapsis, la modulación de la eficiencia de las conexiones sinápticas excitadoras en el hipocampo y, en particular, en la plasticidad de Hebb. Esto sugiere que las células gliales, en particular los astrocitos, son

activamente responsables del procesamiento y almacenamiento de información sináptica (Letellier et al., 2016; Perea & Araque, 2007; Stan et al., 2010). Según este nuevo enfoque, los astrocitos se consideran socios activos de las neuronas pre y postsinápticas durante la transmisión de información, lo que ha llevado a la concepción actual de la sinapsis tripartita (Pascual et al., 2005; Perea & Araque, 2010). Este concepto se basa en la capacidad de los astrocitos en detectar cambios en la actividad neuronal, liberando gliotransmisores que a su vez influyen en la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica. Investigaciones recientes realizadas en cultivos disociados de corteza cerebral han destacado la importancia de factores liberados por astrocitos para inducir la plasticidad neuronal (Steinmetz & Turrigiano, 2010; Stellwagen & Malenka, 2006).

En los últimos años, se ha ampliado el concepto de sinapsis tripartita para incluir la matriz extracelular que se encuentra en la hendidura sináptica, así como la microglía cercana a la zona sináptica. De esta manera, se ha evolucionado hacia una visión más amplia que incluye un conjunto sináptico de múltiples partes. Se ha observado que existen relaciones complejas y multidireccionales entre todos los componentes, incluyendo las terminales pre y postsinápticas, el proceso perisináptico del astrocito, la microglía y la matriz extracelular (Nimmerjahn et al., 2005; Verkhratsky & Nedergaard, 2014; Y. Wu et al., 2015).

## Fuerza sináptica

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

De esta forma,  $F_{sináptica} = pr. n. q$ 

La *p*r se produce debido a la naturaleza estocástica de los procesos que llevan a la exocitosis de las VS (Südhof, 2004). Cada sinapsis tiene asociada una *pr* específica en un momento dado, lo que define la confiabilidad de la transmisión de señales en una

sinapsis y determina su fuerza sináptica promedio (Del Castillo & Katz, 1954). En las sinapsis del SNC, a diferencia de la unión neuromuscular (NMJ), la *pr* es relativamente baja, por ejemplo, en el hipocampo es de 0,3 en promedio, si bien existe gran variabilidad entre los botones sinápticos (Dobrunz & Stevens, 1997; Murthy et al., 1997).

De este modo, la transmisión sináptica es más eficaz si pr, n o q aumentan. Generalmente, un aumento de pr o n indica un mecanismo presináptico, mientras que un aumento de q se vincula a un mecanismo postsináptico, como un incremento en el número y/o sensibilidad de los receptores postsinápticos.

En el presente trabajo, estimaremos cambios en la fuerza sináptica centrándonos en mecanismos presinápticos que modifican tanto la *pr* como *n*.

## Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica es la propiedad que permite modificar la fuerza de la transmisión sináptica por períodos de tiempo breves o prolongados. Estos cambios pueden ser producidos por señales intrínsecas o extrínsecas; por ejemplo, una alta tasa de disparo es una señal intrínseca, mientras que las entradas sinápticas directas desde otras neuronas son señales extrínsecas. Para llevar a cabo el complejo procesamiento de la información en los circuitos neuronales, es esencial que las sinapsis puedan ser modificadas tanto estructural como funcionalmente. Existen dos formas principales de plasticidad sináptica en función de la duración temporal de los cambios en la eficiencia sináptica: 1) la plasticidad sináptica a corto plazo se produce en un lapso de milisegundos a minutos, y es esencial para que las sinapsis puedan desempeñar funciones computacionales cruciales en los circuitos neuronales (Colino et al., 2002). Algunos ejemplos típicos de esta forma de plasticidad son la facilitación, el incremento, la potenciación post-tetánica, la depresión, entre otros; y 2) la plasticidad sináptica a largo plazo, la cual implica cambios que persisten durante varias horas o días. Dos ejemplos de esta forma de plasticidad son la plasticidad de Hebb y la plasticidad sináptica homeostática (PSH), las cuales se distinguen por el tiempo que toma la inducción y expresión de los cambios, siendo más rápidos en la primera (minutos, horas) y más lentos en la segunda (horas, días). En este trabajo, nos enfocaremos en los cambios plásticos que ocurren a largo plazo, centrándonos principalmente en la PSH.

## Plasticidad de Hebb

Hebb propuso que la plasticidad sináptica es un mecanismo subyacente a la memoria, y presentó un modelo en el que dos células conectadas por una sinapsis excitadora se

refuerzan entre sí cuando una célula se activa y, a su vez, activa la otra célula. Este modelo sugiere que la actividad neuronal repetida puede modificar la fuerza sináptica y, por lo tanto, influir en la eficacia de la transmisión sináptica (Hebb, 1949; Huganir & Nicoll, 2013; Lüscher & Malenka, 2012; Malenka & Bear, 2004). Comprende tanto la potenciación a largo plazo (*long term potentiation*, LTP) como la depresión a largo plazo (*long term potentiation*, LTP) como la depresión a largo plazo (*long term depression*, LTD), y es la forma más estudiada de plasticidad sináptica dependiente de la actividad. Los mecanismos moleculares implicados tanto en su inducción, seguido de mecanismos para la expresión (durante horas) y el mantenimiento (días) han sido ampliamente estudiados (Lüscher & Malenka, 2012).

Dado que la LTP promueve el fortalecimiento de conexiones sinápticas específicas, lo que es crucial para el correcto almacenamiento de información en el cerebro, se cree que estos mecanismos hebbianos permiten que las propiedades de un circuito se afinen a través de la experiencia, siendo esto la base de los procesos de aprendizaje y memoria. Sin embargo, el requisito de actividad correlativa entre una pre y postsinapsis para reforzar la conexión, puede dar lugar a mecanismos de retroalimentación positiva dependientes de la actividad (Figura 3 A).



Figura 3. Ciertos mecanismos de potenciación sináptica son potencialmente desestabilizadores. (A) El disparo pre y postsináptico correlativo induce potenciación a largo plazo (LTP), lo que permite que la neurona presináptica impulse a la neurona postsináptica con mayor fuerza. Esto aumenta la correlación entre la activación pre y postsináptica, lo cual produce mayor LTP, generando un ciclo de retroalimentación positiva. (B) La generación de LTP sin restricciones provoca la pérdida de especificidad sináptica, ya que la inducción del LTP impulsa a la neurona postsináptica con mayor fuerza, volviendo así más fácil que otros inputs logren que la neurona postsináptica dispare, de forma que éstos comienzan a desarrollar LTP. Imagen recuperada de Turrigiano, 2008.

Conforme la actividad correlacionada de la pre y postsinapsis refuerza conexiones sinápticas específicas, la fuerza sináptica de la neurona postsináptica aumentará, permitiendo que los *inputs* presinápticos que estaban poco correlacionados con la activación de dicha postsinapsis puedan activarla con mayor facilidad (Figura 3 B) (Turrigiano, 2008). Como resultado, la generación de mecanismos de retroalimentación positiva sin restricciones puede conducir a que la actividad alcance un estado propenso a la hiperexcitabilidad (Cooper & Bear, 2012; Turrigiano, 2008; Turrigiano & Nelson, 2000, 2004; Vitureira & Goda, 2013). Lo mismo ocurre en sentido opuesto, luego de inducida la LTD aquellas sinapsis deprimidas podrán someterse más fácilmente a mayor LTD, lo cual, ocurriendo sin restricciones, podría provocar un silenciamiento patológico de las sinapsis o incluso su eliminación (Collingridge et al., 2010; Cooper & Bear, 2012; Vitureira & Goda, 2013).

## Plasticidad sináptica homeostática

La actividad neural se encuentra bajo dos requerimientos opuestos, pero igualmente importantes: la necesidad de cambiar para adaptarse a su entorno y la necesidad de estabilidad para mantener la fuerza de las conexiones dentro de un rango fisiológico. Resulta intrigante comprender cómo se mantiene cierto grado de constancia en las conexiones básicas de un circuito cuando este necesita tanto del cambio como de la estabilidad. En la década de los 90s se identificó una nueva forma de plasticidad, la plasticidad sináptica homeostática (PSH), que promueve la estabilidad de los circuitos neuronales mediante ajustes compensatorios de la fuerza sináptica cuando se producen desvíos de los niveles óptimos de actividad neural. Estos ajustes involucran tanto mecanismos pre como postsinápticos (Figura 4), y la contribución de cada uno de estos componentes depende de varios factores, como la edad del cultivo neuronal utilizado, el tipo neuronal o tejido estudiado.

Así, la PSH debe ser capaz de sensar algún aspecto común de la actividad sináptica, indistintamente del método de regulación que se implemente. Debe, además, poder integrar esta información en un lapso de tiempo largo (minutos a horas) en comparación con el tiempo que requiere la transferencia de información (milisegundos a minutos), manteniendo la actividad neuronal cercana a un valor de referencia mediante el ajuste de las propiedades que determinan la fuerza sináptica (Turrigiano, 2008).

En este trabajo, centraremos nuestra atención en los cambios plásticos compensatorios a nivel presináptico ocurridos en respuesta al bloqueo crónico de la actividad sináptica.



Figura 4. Esquema básico de la plasticidad sináptica homeostática en una sinapsis excitadora. (A) Condiciones basales. La transmisión sináptica está mediada por la liberación de neurotransmisores desde la terminal presináptica con una subsecuente activación de los receptores en la célula postsináptica. La fuerza sináptica está determinada por la eficacia tanto de la liberación de los neurotransmisores en la presinapsis, como la abundancia de sus receptores específicos en la postsinapsis. (B) La actividad neuronal presinápticamente reducida (mediante el bloqueo crónico con tetrodotoxina, TTX), es compensada mediante un incremento en el reciclaje de vesículas, el número de vesículas ancladas en la terminal y la *pr*. Postsinápticamente, se incorporan receptores de neurotransmisores adicionales mediante mecanismos de difusión lateral y exocitosis intracelular. (C) O, por el contrario, para compensar un aumento en la actividad neuronal, las neuronas presinápticas disminuyen la probabilidad de liberación de neurotransmisores, mientras que la célula postsináptica reduce el número de receptores mediante mecanismos de endocitosis o difusión lateral. Imagen tomada de Pozo & Goda, 2010.

## PSH postsináptica

El ajuste de la función postsináptica dependiente de la actividad requiere cambios en la abundancia de receptores presentes en la superficie postsináptica (Figura 4) (Vitureira & Goda, 2013). Esto implica la activación de una serie de mecanismos moleculares y celulares. Se ha demostrado que la expresión de receptores sinápticos está regulada por la actividad neuronal a través de señalización intracelular y vías de transducción de señales. Por ejemplo, la vía del factor de crecimiento neuronal (NGF) y la vía de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) están involucradas en la regulación de la densidad de

receptores AMPA en la membrana postsináptica (Kokona & Thermos, 2015; Man et al., 2003). Este mecanismo es la forma de PSH postsináptica más ampliamente estudiada, y se denomina "*synaptic scaling*" (escalado sináptico). A diferencia de otros tipos de plasticidad sináptica que modifican selectivamente la actividad de sinapsis individuales, el *synaptic scaling* modula de manera global, mediante un factor multiplicativo, la función sináptica de todas las sinapsis dentro de una neurona determinada. Este mecanismo multiplicativo preserva las diferencias relativas en la función sináptica entre sinapsis individuales, lo cual es fundamental para el almacenamiento de información (Turrigiano, 2008).

Las primeras evidencias del *synaptic scaling* fueron obtenidas *in vitro* en cultivos de neuronas corticales, hipocampales y de médula espinal, donde se utilizaron manipulaciones farmacológicas para modificar la actividad neuronal de manera crónica. Por ejemplo, se bloqueó crónicamente la descarga neuronal mediante el uso de tetrodotoxina (TTX), un bloqueante específico de los canales de Na<sup>+</sup> voltaje-dependientes, o se inhibieron los receptores de glutamato utilizando CNQX, un antagonista de los receptores de tipo AMPA. Por otro lado, se aumentó la actividad mediante el bloqueo de la transmisión inhibitoria con bicuculina, un antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub>. Estas intervenciones produjeron un aumento o una disminución compensatoria en las corrientes espontáneas en miniatura mediadas por los receptores AMPA, respectivamente (Figura 5).



Figura 5. La amplitud de los mEPSC aumenta en presencia de TTX, mientras que disminuye frente a la aplicación de bicuculina. Se muestran registros representativos de las mEPSC (corrientes espontáneas en miniatura) de cultivos control y de cultivos en presencia de TTX y bicuculina por 48hs. A la izquierda los datos sin procesar; a la derecha, la forma de la onda del promedio de mEPSC del registro crudo de la izquierda. Tomado de Turrigiano *et al.,* 1998.

Proteínas de la PSD desempeñan un papel crucial en el synaptic scaling, dado que actúan como anclas para los receptores sinápticos y ayudan a mantener la posición y

estabilidad de los receptores en la membrana plasmática. Asimismo, están implicadas en la regulación de la expresión y el tráfico de los receptores sinápticos. Por ejemplo, stargazina, una proteína transmembrana asociada a los receptores AMPA, interactúa con la PSD-95 a través de un mecanismo de fosforilación dependiente de la Ca $^{2+}$ calmodulin-kinasa II (CaMKII) y modula la movilidad de los receptores AMPA en la superficie (Bats et al., 2007). Se ha evidenciado que, frente a la inactividad crónica en neuronas corticales de cultivo, stargazina aumenta su expresión y fosforilación. La expresión de una forma mutante de stargazina que no puede ser fosforilada, previene la acumulación de receptores AMPA en respuesta a la inactividad crónica. Esto sugiere que la fosforilación de stargazina desempeña un papel crucial en el proceso de synaptic scaling (Louros et al., 2014). Por otro lado, se ha observado que la proteína Homer1 aumenta su expresión en situaciones de aumento crónico de la actividad neuronal. Este incremento en la expresión de Homer1 se ha asociado con una disminución en la expresión de los receptores AMPA sinápticos y, por lo tanto, de las mEPSCs (Hu et al., 2010). Esto indica que Homer1 está involucrado en la regulación negativa de la fuerza sináptica durante el escalado sináptico en respuesta a cambios prolongados en la actividad neuronal.

Otros mecanismos de PSH postsináptica incluyen la liberación de factores solubles tanto por neuronas como por células gliales adyacentes, proteínas de adhesión sinápticas, entre otras (Fernandes & Carvalho, 2016).

Es importante destacar que en experimentos llevados a cabo en cultivos de hipocampo y corteza visual menores a 14 días *in vitro* (DIV), la PSH inducida por inactividad crónica ocurre exclusivamente a nivel postsináptico. Sin embargo, a medida que el circuito madura emerge la expresión presináptica de la PSH (Wierenga et al., 2006).

## PSH presináptica

La PSH presináptica hace referencia al ajuste homeostático de la función presináptica en dirección compensatoria a los cambios en la actividad del circuito. Diversos parámetros presinápticos son ajustados durante la PSH presináptica, como el potencial de membrana en reposo, la función o abundancia de canales de Ca<sup>2+</sup>, la relación entre el Ca<sup>2+</sup> presináptico y la liberación del NT, el número de vesículas que componen el RRP, entre otros (Delvendahl & Müller, 2019). Estos mecanismos presinápticos que controlan la transmisión sináptica producirán modificaciones en la *pr* per se, o en la densidad de contactos sinápticos disponibles (*n*) para que ocurra la exocitosis (Figura 6). Se trata de fenómenos robustos y altamente conservados, sin embargo, los mecanismos moleculares que lo subyacen han comenzado a emerger recientemente (Delvendahl & Müller, 2019).



Figura 6. Liberación de neurotransmisores durante la plasticidad sináptica homeostática presináptica. (A) Esquema ilustrativo de los principales mecanismos que regulan la liberación de neurotransmisores y su rol en la PSH presináptica. Perturbaciones farmacológicas o genéticas sobre los receptores de glutamato causan una reducción en las respuestas postsinápticas, lo cual es compensado por un incremento en el número de vesículas sinápticas que sufren exocitosis por cada PA presináptico. Los números 1-7 (ver en B) señalan mecanismos generales que controlan la liberación de neurotransmisores. Los números en verde y verde claro indican mecanismos involucrados o implicados en la PSH presináptica, respectivamente. (B) Lista de mecanismos presinápticos que controlan la transmisión sináptica como se ilustra en (A). Mecanismos involucrados en la PSH presináptica se resaltan en color verde, genes asociados y parámetros cuantales (pr, y número de sitios de liberación n) están indicados a la derecha. Mecanismos implicados en la PSH presináptica se muestran en verde claro. Note que los mecanismos se encuentran acoplados y que varios genes han sido vinculados a más de un parámetro fisiológico. No todos los genes fueron testeados para todos los parámetros, y algunos de los mecanismos sólo fueron investigados bajo condiciones basales. Tomado de Delvendahl & Müller, 2019.

Experimentos realizados en la unión neuromuscular de *Drosophila* ponen en evidencia que el ajuste homeostático de la función presináptica depende tanto del aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> presináptico, así como un aumento en el número de VS pertenecientes al RRP. El ingreso de Ca<sup>2+</sup> a la terminal presináptica ocurre a través de los canales de tipo Cav2.1, el único canal responsable de la transmisión sináptica en la unión neuromuscular de *Drosophila*. Una mutación en la subunidad α1, que es responsable de la formación del poro del canal, bloquea por completo los cambios homeostáticos en la entrada de Ca<sup>2+</sup> y, por lo tanto, en la liberación presináptica del NT (Frank et al., 2006). Es importante destacar que esta mutación no afecta la entrada de Ca<sup>2+</sup>, ni cuando se produce un ensanchamiento del PA. Notablemente, esta mutación impide específicamente que el canal responda de manera homeostática para ajustar la liberación presináptica en función de la actividad del circuito (Müller & Davis, 2012).

En cuanto al número de VS que integran el RRP, se ha observado que las proteínas RIM y Rab3, presentes en la zona activa de la sinapsis, desempeñan un papel crucial en el ajuste homeostático del reciclado de las vesículas sinápticas. En particular, se ha descubierto que la mutación de la proteína RIM impide la modulación homeostática de la liberación presináptica al afectar el RRP. Por otro lado, las proteínas Rab3 (pequeñas GTPasas presentes en las VS) y la proteína Rab3-GAP (proteína de desactivación de la GTPasa), están involucradas en la regulación del ciclo de las VS. Se ha reportado que la mutación de Rab3-GAP bloquea la inducción y expresión de la PSH sin afectar la transmisión sináptica basal (Müller et al., 2011). Además de su interacción con las VS, las proteínas RIM también interactúan con los canales de Ca<sup>2+</sup>. Sin embargo, se ha observado que la regulación homeostática de la entrada de Ca<sup>2+</sup> no se ve afectada en los mutantes de RIM (Müller et al., 2012). Esto sugiere que la PSH presináptica requiere de dos procesos separados: por un lado, la potenciación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> y, por otro lado, la modulación del RRP dependiente de las proteínas RIM.

Asimismo, se evidenció que la expresión del transportador vesicular de glutamato de tipo 1 (vGlut1) en la terminal presináptica está incrementada frente al bloqueo prolongado de la actividad. Esto sugiere la posibilidad que más allá del aumento en la densidad de receptores postsinápticos y el número de VS en el RRP, las neuronas podrían además cargar las VS con más glutamato, potenciando aún más este mecanismo presináptico homeostático, aumentando la amplitud de los mEPSCs (De Gois et al., 2005; Wilson et al., 2005; Wojcik et al., 2004). La abundancia de vGlut1 en las VS se correlaciona directamente con la *pr* y se ajusta de forma compensatoria al

modificar los niveles de actividad del circuito (Herman et al., 2014). Así, los cambios en los niveles presinápticos de vGlut1 constituyen un mecanismo conciso para controlar la eficacia cuantal de la transmisión sináptica excitadora durante el refinamiento sináptico y los mecanismos de plasticidad (Wilson et al., 2005). Por otro lado, la reducción de la actividad excitadora o la privación sensorial, producen un aumento en el número de botones axonales y en el número de espinas dendríticas, y, de forma contraria, frente a aumentos en la actividad neuronal el número de botones axonales y espinas dendríticas disminuye (Yin & Yuan, 2015).

En humanos, la PSH presináptica puede evidenciarse en pacientes con miastenia gravis, una enfermedad autoinmune que produce debilidad muscular debido al número reducido de receptores nicotínicos. Situaciones similares pueden observarse en otros mamíferos, como ratas y ratones, e incluso en *Drosophila*. En todos los casos, perturbaciones a nivel de los receptores postsinápticos desencadenan un aumento en la liberación de neurotransmisores que restauran las respuestas postsinápticas a los niveles basales (Cull-Candy et al., 1980; J Plomp et al., 1992; Wang et al., 2010) (Figura 7).



Figura 7. Plasticidad sináptica homeostática presináptica en la unión neuromuscular de Drosophila. (A) Esquema de la fenomenología básica de la PSH presináptica en la unión neuromuscular de Drosophila. Perturbaciones en los receptores de neurotransmisores (1, medio, rojo) reduce la despolarización (flechas azules) con respecto a la situación control (izquierda). Esta perturbación es sensada (2) causando señalización retrógrada (3). La señalización retrógrada incrementa la liberación de neurotransmisores (4, vesícula sináptica verde), restaurando así la despolarización postsináptica, y por lo tanto la eficacia sináptica (derecha). (B) Ilustración esquemática de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) durante la PSH presináptica. Perturbaciones en los receptores de neurotransmisores provoca una disminución en la respuesta postsináptica a la fusión espontánea de una única vesícula sináptica (trazado superior, mEPSP, flechas rojas) y en la amplitud de las respuestas postsinápticas evocadas por PA (trazado inferior). Mecanismos homeostáticos estabilizan la

Página 24 | 87

amplitud de los EPSP evocados a través de la modulación de la liberación de neurotransmisores (trazado verde, derecha). (C) Relación entre la liberación de neurotransmisores (número de vesículas sinápticas por PA) requerido para mantener de forma precisa la amplitud de las respuestas evocadas por PA a diferentes niveles de respuestas espontáneas. Note que la PSH presináptica es bidireccional (potenciación y depresión presinápticas). Tomado de Delvendahl & Müller, 2019.

Los cocultivos disociados neuronales prevalecen como el modelo experimental utilizado en el estudio de la PSH, dado que brindan la oportunidad de explorar los mecanismos moleculares que subyacen a los cambios homeostáticos de la función presináptica a nivel de sinapsis individuales fácilmente identificables. Sin embargo, la ausencia de una red neuronal típica de cerebro intacto puede generar diferencias en algunos aspectos que se basen en patrones precisos de las conexiones sinápticas. Debido a esto, el uso de modelos intactos *in vivo* y cultivos organotípicos de rodajas cerebrales que preservan parcialmente la conectividad *in vivo* y sus propiedades, brindan un abordaje complementario para comprender mejor los descubrimientos realizados en cultivos celulares (Pozo & Goda, 2010). No obstante, su preservación y la supervivencia celular presentan grandes desafíos.

Las proteínas que forman canales transmembrana, como las conexinas (Cxs) y panexinas (Panxs), desempeñan un papel crucial en la excitabilidad neuronal y, por lo tanto, en la plasticidad sináptica. Estas proteínas son ampliamente expresadas por las neuronas y la glía, lo que permite la propagación de ondas de Ca<sup>2+</sup> astrocitarias de manera eficiente y el transporte de grandes moléculas como el ATP y glutamato a través de la membrana celular entre el interior y el exterior celular (Dahl, 2015; Giaume et al., 2013; Kang et al., 2008). El rol de los canales de Panxs en la plasticidad de Hebb ha sido ampliamente estudiado (Ardiles et al., 2014; Bhat & Sajjad, 2021; Gajardo et al., 2018; Südkamp et al., 2021), sin embargo, su rol en la PSH presináptica ha comenzado a ser explorado solo recientemente por nuestro laboratorio (Rafael et al., 2020).

#### Canales de Panexina

Las panexinas (Panxs) poseen cuatro dominios transmembrana con dominios citoplasmáticos N- y C-terminales y grupos cisteína en los dos bucles extracelulares (Shestopalov & Panchin, 2008). En mamíferos, seis subunidades proteicas de Panxs forman canales transmembrana llamados panexones. Estos operan fundamentalmente como canales de membrana, ya que sus residuos glicosilados impiden el ensamblaje en trans de dos panexones para formar una UH (Bruzzone et al., 2003) (Figura 8). Sin embargo, este punto continúa siendo controversial, ya que existen algunos reportes que

indican la existencia de UH formadas por hemicanales de Panx1 en sistemas de sobreexpresión exógena en ovocitos de *Xenopus*, o en células HeLa *knock out* para Cx45 y en la línea celular TC620 (Bunse et al., 2009; Palacios-Prado et al., 2022).



Figura 8. Organización estructural de panexinas. Cada subunidad posee cuatro dominios transmembrana conectados entre sí a través de un dominio intracelular y dos loops extracelulares. Tanto el extremo carboxilo como el amino se extienden hacia el citoplasma. La cola carboxi-terminal es el sitio de modificaciones regulatorias y fosforilación. La N-glicosilación del segundo loop extracelular impide el ensamblaje de uniones de hendidura funcionales. Imagen recuperada y modificada de Lapato & Tiwari-Woodruff, 2017.

Los vertebrados expresan las panexinas 1-3, en particular, la Panx1 se expresa ubicuamente en el SNC de mamíferos, y forma panexones en neuronas piramidales del hipocampo y astrocitos, los cuales se encuentran abiertos en ausencia de despolarización presináptica y a concentraciones fisiológicas de Ca<sup>2+</sup> (Barbe et al., 2006; Bruzzone et al., 2003; Orellana et al., 2009; Panchin et al., 2000; Thompson et al., 2008). Los canales de Panx1 presentan un poro central amplio que permite el pasaje de iones y moléculas de gran tamaño (hasta 1.2 kDa) entre el citosol y el exterior celular, brindando rutas de señalización autócrina y paracrina (Dahl, 2015); siendo su alta conductancia (~500 pS) no selectiva una vía ideal para el pasaje de neurotransmisores como el glutamato y el ATP (Bao et al., 2004; Iglesias et al., 2009; Locovei, Bao, et al., 2006; Suadicani et al., 2012; Thompson, 2006; Xing et al., 2014). Estudios recientes señalan otro estado de baja conductividad (~68 - 74 pS) permeable a los aniones y sin permeabilidad al ATP, con selectividad para los aniones de cloruro (Cl<sup>-</sup>), el cual es activado de forma dependiente de voltaje (Ma et al., 2009). Se cree que los canales de Panx1 presentan diferentes propiedades y estados conformacionales de acuerdo a las condiciones de estimulación, de forma tal que coexisten los canales de conductancia pequeña con aquellos permeables al ATP o grandes colorantes (Chiu et al., 2018; Dahl, 2015).

Las vías de activación de los canales de Panx1 incluye receptores purinérgicos (P2X4/7, P2Y<sub>1/2/6</sub>), α-adrenérgicos y glutamatérgicos (receptores NMDA (NMDAR)) (Billaud et al., 2011; Garré et al., 2010; Pelegrin & Surprenant, 2006; Thompson et al., 2008). Al ser

Página 26 | 87

activados mediante receptores purinérgicos, los canales de Panx1 desempeñan un papel fisiológico en la regulación de la liberación de ATP, lo que se conoce como "liberación de ATP inducida por ATP". Esta liberación de ATP a través de panexones promueve la apertura de nuevos canales de Panx1 a través de la estimulación de los receptores purinérgicos, lo que genera un mecanismo de retroalimentación positiva que refuerza la señal inicial producida por ATP (Isakson & Thompson, 2014; Orellana et al., 2011). Además de los cambios en la apertura/cierre de los panexones mediados por cambios en el voltaje de membrana y la activación por receptores, modificaciones postraduccionales generan cambios en la actividad y propiedades de los mismos. La fosforilación aumenta la apertura de los canales de Panx1, promoviendo una mayor liberación de moléculas como el ATP, mientras que la desfosforilación puede llevar al cierre de los mismos (López et al., 2020). Asimismo, la nitrosilación, llevada a cabo por óxido nítrico, compuesto gaseoso que actúa como molécula de señalización, también promueve la apertura del canal (Lohman & Isakson, 2014; Penuela et al., 2014).

Thompson y colaboradores fueron los primeros en reportar la interacción entre Panx1 y los receptores de glutamato de tipo NMDA. Observaron que Panx1 se encontraba activada en neuronas hipocampales aisladas en respuesta a la privación de oxígeno y glucosa, generando corrientes despolarizantes primarias y secundarias, provocando la muerte neuronal (Thompson, 2006). Posteriormente, demostraron que la corriente secundaria producida por la activación de los NMDAR era suprimida disminuyendo la expresión de Panx1 (Panx1 *knockdown*) o mediante la utilización de péptidos bloqueantes de Panx1 (Thompson et al., 2008; Weilinger et al., 2012, 2013). Asimismo, experimentos *ex vivo* en rodajas de hipocampo permitían desarrollar un estado epiléptico mediante estimulación de los NMDAR, disminuyendo la actividad neuronal a través del bloqueo de los canales de Panx1 con ARN de interferencia, la aplicación de antagonistas específicos o utilizando animales Panx1 *knockout* (Panx1KO) (Dossi et al., 2018; Santiago et al., 2011; Scemes et al., 2019; Shan et al., 2020; Thompson et al., 2008). En conjunto, estas observaciones sugieren que la activación de los NMDAR.

Típicamente, la apertura de los panexones ha sido considerada deletérea, observándose en condiciones patológicas como isquemia y produciendo muerte celular excitotóxica (Bargiotas et al., 2011; Bond & Naus, 2014; Penuela, Harland, et al., 2014). Sin embargo, recientemente se ha visto que la apertura de estos canales podría estar vinculada a procesos fisiológicos, incluyendo la señalización parácrina, a través de la activación de panexones y seguido de la liberación de moléculas de ATP al espacio

extracelular (Bennett & Zukin, 2004). A su vez, el ATP liberado puede actuar tanto en neuronas como glía iniciando diferentes cascadas de señalización (Abudara et al., 2018; Cheung et al., 2014).

Por otra parte, se ha reportado un rol esencial de Panx1 en el control de la inducción de LTP utilizando rodajas de hipocampo provenientes de animales deficientes en Panx1. Estos presentaban un aumento en la excitabilidad neuronal y una potenciación temprana y persistente de la LTP mediante una disminución en los niveles de ATP extracelular y, en consecuencia, una mayor activación de los NMDAR postsinápticos. Estas modificaciones *ex vivo* se acompañan de alteraciones *in vivo* en el comportamiento, relacionadas al deterioro de la memoria espacial y el reconocimiento de objetos, así como de un incremento en la ansiedad (Gajardo et al., 2018; Prochnow et al., 2012). Asimismo, se ha observado que el bloqueo de Panx1 no sólo altera la LTP, sino que también altera la LTD de forma dependiente de la edad. De esta forma, el bloqueo o la ablación de Panx1 modifica el umbral para la inducción de LTD, impidiendo la inducción de este tipo de plasticidad sináptica en animales adultos (Ardiles et al., 2014; Gajardo et al., 2018). Sin embargo, el rol de esta proteína en la inducción y/o mantenimiento de la PSH, solo ha comenzado a ser estudiada recientemente por nuestro laboratorio (Rafael et al., 2020).

#### Antecedes específicos

Experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio resaltan la importancia de las células gliales en la inducción de la PSH presináptica. En cocultivos neurogliales de hipocampo de rata el tratamiento crónico con TTX (1µM, 24-36hs) promovió un aumento compensatorio tanto en la función presináptica como en la densidad de contactos sinápticos excitadores (Figura 9) (Rafael et al., 2020). Sin embargo, el tratamiento crónico con TTX de cocultivos enriquecidos en neuronas no fue capaz de inducir dichos cambios homeostáticos presinápticos (Figura 9) (Rafael et al., 2020). Este resultado pone en evidencia la importancia de las células gliales en la inducción y/o mantenimiento de estos cambios homeostáticos presinápticos, y sugiere la liberación de alguna sustancia química gliotransmisora por parte de las células gliales.



Figura 9. La ausencia de células gliales no permite el ajuste de la función presináptica ni de la densidad de contactos sinápticos frente al tratamiento crónico con TTX. Se realizaron cocultivos neurogliales (A & C) y cultivos enriquecidos en neuronas (B & D) y se cuantificó la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 en cocultivos tratados con TTX (1µM, 24-36hs) (A & B) y la densidad de contactos sinápticos excitadores (C & D). Los datos fueron normalizados con respecto al control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición en cuatro experimentos independientes. \*\* p<0,01. Two-tailed Student's t-test.

Dado que los hemicanales de Cx43 son una de las proteínas transmembrana más expresadas a nivel astrocitario, y que las mismas se encuentran activas en nuestro

modelo de PSH en el cual no existe despolarización presináptica ni generación del PA presináptico por acción de la TTX, sugerimos que estos hemicanales serían una posible vía de liberación para estos gliotransmisores. Es así que, cocultivos neurogliales fueron tratados 15min previo y durante el tratamiento con TTX con GAP-19, un antagonista específico de hemicanales de Cx43. Se observó que el bloqueo de los hemicanales de Cx43 evitó el ajuste homeostático de la función presináptica y de la densidad de contactos sinápticos, lo cual si tuvo lugar frente al tratamiento crónico con TTX (Figura 10) (Rafael et al., 2020). Estos resultados sugieren que los gliotransmisores son liberado a través de hemicanales de Cx43. Asimismo, experimentos preliminares sugieren que ese gliotransmisor es el ATP (resultados no mostrados).



Figura 10. El bloqueo de hemicanales de Cx43 durante la inducción de la PSH presináptica. Cocultivos neurogliales fueron tratados con GAP19 (300µM, 15min previo y durante el tratamiento con TTX), un antagonista específico de los hemicanales de Cx43. El bloqueo de los hemicanales de Cx43 previno el aumento compensatorio tanto en la función presináptica (A) como en la densidad de contactos sinápticos excitadores (B), los cuales tienen lugar frente al tratamiento crónico con TTX.

En conjunto, estos antecedentes sugieren que los cambios presinápticos que tienen lugar durante la PSH son dependientes del ATP liberado por hemicanales de Cx43 expresados por las células gliales.

## **Hipótesis**

Teniendo presente este escenario de ausencia de despolarización presináptico y, por lo tanto, de PA presináptico por el tratamiento crónico con TTX, postulamos que ocurrirá una mayor activación de canales de Panx1 neuronales incrementando la fuerza sináptica del circuito. Esto podría involucrar un incremento en la disponibilidad de Ca<sup>2+</sup> presináptico y del pool de vesículas de reciclaje en neuronas. Asimismo, la densidad de contactos sinápticos del circuito podría verse incrementado.

## **Objetivo general**

Analizar el rol de los canales de Panx1 en el ajuste homeostático de la función presináptica.

## **Objetivos específicos**

- 1. Determinar la relevancia relativa de los canales de Panx1 neuronales y gliales en el ajuste homeostático de la función presináptica.
- Analizar la implicancia de los canales de Panx1 neuronales en la función presináptica dependiente de actividad.
- Analizar cambios en la permeabilidad de los canales de Panx1 durante la PSH.

## Materiales y métodos

<u>Uso de animales y consideraciones éticas:</u> Para cumplir con estos objetivos, se realizaron cocultivos disociados de hipocampo de ratones C57BL/6 *wild type* o *knock out* globales para Panx1 (Panx1KO; Genentech, US) a día postnatal 0-1 (P0-P1). Los animales fueron sacrificados mediante decapitación, realizando todos los esfuerzos para minimizar tanto el número de animales empleados como su sufrimiento. El protocolo de experimentación para este proyecto fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA), número 070151-500052-21, titulado: "Obtención de cocultivos neurona-glía a partir del hipocampo de ratón neonato".

<u>Preparación de placas de cocultivo:</u> Las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio (12mm) tratados con ácido nítrico *overnight*, lavados 20 veces con agua deionizada y 15 veces con etanol al 95-99%, y almacenados en esta solución hasta ser utilizados.

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

<u>Obtención de células de hipocampo:</u> Una vez sacrificados los animales neonatos por decapitación, en una cámara de flujo laminar se extrajo el cerebro y se colocó en medio de disección compuesto por HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Gibco) + HEPES (10mM, Sigma) a 4°C. Se diseccionó el hipocampo y se introdujo en 3ml de una solución enzimática incluyendo: papaína (20 unidades, Sigma), EDTA (0,5mM), CaCl<sub>2</sub> (1,5mM), L-cisteína (0,2mg/ml) y DNAsa (0,1mg/µl). Se incubó durante 18 minutos a 37°C y luego se realizaron dos lavados con medio de glía BME (Basal Medium Eagle, Gibco), suplementado con glucosa (16mM, Sigma), suero bovino fetal (FBS, 10%, Gibco), piruvato de sodio (1mM, Gibco), HEPES (0,01 M, Sigma), y penicilina/estreptomicina (100U/ml; 100µg/ml, Gibco). El tejido se disgregó mecánicamente en 1ml de medio de neurona NB (Neurobasal, Gibco), suplementado con glucosa (34mM), B<sub>27</sub> (2,5%; Gibco), glutamax (2mM, Gibco) y penicilina/estreptomicina (100U/ml; 100µg/ml; Gibco). El volumen se llevó a 5 ml para luego centrifugar durante 5 minutos a 1000 revoluciones por minuto (RPM).

<u>Preparación de monocapas gliales:</u> El pellet obtenido en el apartado anterior se resuspendió con medio de glía y se incubó en una botella (25 cm<sup>2</sup>) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> durante 7-14 DIV, hasta la formación de una monocapa confluente.

Posteriormente, las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 1 minuto en 2 ml de tripsina (Trypsin-EDTA 0,05%, Gibco) y se lavaron con 3 ml de medio de glia suplementado. Luego se centrifugaron (5 min, 1000 RPM) y resuspendieron en 2 ml de medio de glia, y se contaron en la cámara de Neubauer. Se sembraron entre  $4 - 6 \times 10^3$  células por pocillo en placas multiwell de 24 pocillos con medio de glia, se incubaron a 37°C en estufa de cultivo con un aporte de 95% de O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio muestran que nuestras monocapas gliales están compuestas por un 79% de astrocitos, 19% de microglía y un 2% de oligodendrocitos.

<u>Cultivos neuronales</u>: Cuando la glia sembrada en los cubreobjetos alcanzó un estado de confluencia (aproximadamente del 60-70%) se sembraron neuronas sobre ésta. En este caso, el pellet obtenido anteriormente se resuspendió en 2 ml de medio de neurona. Siguiendo el protocolo previamente descripto las células se contaron utilizando la cámara de Neubauer y azul de tripán (5%) para identificar las células muertas. Se plantaron  $3.5 - 4.5 \times 10^4$  células por pocillo y se incubaron a  $37^{\circ}$ C en estufa de cultivo con 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> durante 14-15 días en medio de neurona.

Combinación de cocultivos: Se crearon cuatro combinaciones de cocultivos neurogliales. a) cocultivos Panx1KO, donde la monocapa de células gliales y la población neuronal derivaron del hipocampo de ratones neonatos knock-out para la Panx1; b) cocultivos glía Panx1KO/neuronas WT, donde la monocapa glial derivó de ratones neonatos knock-out para la Panx1 y la población neuronal sembrada posteriormente provino del hipocampo de animales control; c) glia WT/neuronas Panx1KO, cocultivos donde la monocapa glial derivó del hipocampo de animales no manipulados genéticamente y la población neuronal sembrada a posteriori derivó del hipocampo de ratones neonatos knock-out para la Panx1; y d) cocultivos WT, derivados de animales no manipulados genéticamente que fueron utilizados como control.

Pasadas 24-48 horas desde la siembra de las neuronas, los cocultivos se trataron con el antimitótico citosina-β-D arabinofuranósido (AraC, 4 μM) para evitar el crecimiento excesivo de células gliales.

<u>Inducción de la PSH:</u> Transcurridos 14-15 DIV los cocultivos se trataron con TTX (tetrodotoxina, 1 µm, Tocris), bloqueante específico de los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje, durante 24-36 horas (salvo excepciones especificadas) para inducir la PSH, y cocultivos no tratados fueron utilizados como control de la función sináptica basal (Murthy et al., 2001; Thiagarajan et al., 2005; Vitureira & Goda, 2013).

<u>Farmacología</u>: Los cocultivos fueron tratados luego de 14-15 DIV con BzATP (benzoil ATP, 10  $\mu$ M, 24-36hs), agonista específico de los receptores purinérgicos del tipo P2X7; y probenecid (500  $\mu$ M, 15 min previo y durante el tratamiento con TTX), un antagonista específico de los canales de Panx1.

Inmunocitoquímica: Los cocultivos se fijaron utilizando una solución conteniendo 4% de paraformaldehído (PFA) en PBS luego de transcurridas 24-36 horas desde la inducción de la PSH con TTX. Posteriormente, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica donde las células se lavaron dos veces con PBS y una vez con PBS-0,1% tritón e incubaron durante 30 minutos en una solución conteniendo 10% suero fetal bovino (FBS) y glicina (0,2 M) en PBS-0,1% tritón a temperatura ambiente (RT). Se realizaron dos lavados con PBS-0,1% tritón e incubó durante 2 horas en una solución con 5% de FBS, PBS-0,1% tritón y los anticuerpos primarios que se detallan en la Tabla 1. A continuación, se lavó 3 veces con PBS-0,1% tritón durante 5 minutos y se incubó durante una hora con los anticuerpos secundarios detallados en la Tabla 1. Posteriormente, fueron lavados con PBS-0,1% tritón durante 5 minutos y por último se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos. Los cubreobjetos se montaron a portaobjetos utilizando FluoromountTM (Sigma-Aldrich).

*Marcaje in vitro live de sinaptotagmina-1:* Para los experimentos de captación del anticuerpo anti-sinaptotagmina-1 (Stg1), se utilizó el protocolo descripto en Vitureira et al., 2011. En resumen, se colocó cada cubreobjeto con el cocultivo neuroglial dentro de una cámara de estimulación (RC-49MFSH Cat: 64-1725, Warner Instruments) conectada a un estimulador eléctrico (GRASS SD9), y mediante estimulación de campo se estimuló a las neuronas con 600 PA a 10 Hz en presencia de un anticuerpo policional de conejo contra el dominio luminal de la Stg1, diluido en solución de baño externo (EBS) conteniendo (en mM): 137 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 D-glucosa, 5 HEPES, 0,001 glicina a RT (23-26 °C). Luego de dos lavados con EBS, las células se fijaron en una solución de PBS con 4% de PFA como fue descripto anteriormente.

*Captación in vitro live de bromuro de etidio:* Cocultivos neurogliales fueron expuestos a una solución de bromuro de etidio (BrEt, 2,5  $\mu$ M) durante 15 minutos en el medio de cultivo NB suplementado a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>. Luego de dos lavados con medio NB las células se fijaron con PFA al 4% en PBS.

<u>Imagenología de calcio:</u> Para evaluar cambios en los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico, se utilizó la pequeña molécula fluorescente Fluo-4-AM (Invitrogen; Cat: F14201) (Justet, 2019). Para preparar el reactivo, cada vial de Fluo-4-AM fue reconstituido en 50 µl de DMSO,

dando lugar a una solución stock 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Los cocultivos neurogliales fueron incubados en una solución de EBS conteniendo 0,01% de ácido plurónico y 1x10<sup>-3</sup>  $\mu$ g/ml de Fluo-4-AM durante 30 minutos a 37°C en estufa con 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>. Luego de dos lavados con EBS, las células fueron montadas en una cámara fabricada en el laboratorio.

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

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Descripción
anti vGlut1	Conejo	1:7000	Synaptic Systems #135303	Transportador vesicular de glutamato 1; marcador presináptico
anti Homer1	Ratón	1:500	Synaptic Systems #160011	Proteína Homer1; marcador postsináptico
anti MAP2	Pollo	1:1000	Abcam #ab5392	Proteína asociada a los microtúbulos 2; marcador de dendritas y soma neuronal
anti Panx1	Conejo	1:200	Alomone #ACC-234	Reconoce canales de panexina- 1
anti conexina 43	Conejo	1:100	Invitrogen #71-0700	Reconoce canales de conexina 43
anti sinaptotagmina- 1	Conejo	1:100	Synaptic Systems # 105 103	Reconoce la proteína del complejo SNARE sinaptotagmina-1
anti- GFAP-Cy3	Ratón	1:1000	Sigma #C9205	Proteína glial fibrilar ácida, conjugado al fluorocromo Cy3
DyLight 649	Pollo	1:300	Jackson #103-495- 155	Anticuerpo secundario anti-pollo conjugado a DyLight 648
Alexa Fluor 488	Conejo	1:500	Invitrogen #A-11070	Anticuerpo secundario anti- conejo conjugado a Alexa Fluor 488
Alexa Fluor 568	Ratón	1:500	Invitrogen #A10037	Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 568

Análisis de imágenes y estadística: Se adquirieron imágenes usando el microscopio confocal (modelos Zeiss Axio Observer ZM 800 o Leica TCS SP5II). Se analizó la fluorescencia derivada de hacer una proyección máxima de entre 8-18 stacks de imágenes confocales consecutivas a intervalos de 1 µm por cada experimento. Estas condiciones de adquisición de imágenes se mantuvieron constantes dentro del mismo experimento. Las imágenes se analizaron con el software libre FIJI (Fiji Is Just ImageJ). Para cuantificar la señal asociada al anticuerpo primario vGlut1, se identificaron sinapsis individuales mediante la colocalización parcial o total del marcador presináptico vGlut1 y el marcador postsináptico Homer1, sobre una dendrita positiva para el marcador del citoesqueleto neuronal MAP2. Los valores se promediaron por neurona y se extrajo la señal de fondo (regiones sin puntos), normalizando los valores frente al control de cada experimento individual. La densidad de contactos sinápticos se cuantificó dentro de las primeras 30µm desde el soma, y se promediaron los valores obtenidos por neurona.

Para cuantificar la señal asociada al anticuerpo anti Cx43, se promediaron valores para el área y el número de puntos inmunorreactivos para Cx43 por campo de imagen (144,88 x 144x88µm; área de la imagen 20.990µm<sup>2</sup>), a partir de la proyección máxima de fluorescencia de entre 8-24 stacks de imágenes confocales consecutivas a intervalos de 1 µm por cada experimento. Los valores fueron normalizados con respecto al control en cada experimento individual.

Para cuantificar la señal asociada a Stg1, se midió la fluorescencia de puntos individuales positivos para Stg1 a partir de 8-24 stacks de imágenes confocales consecutivas adquiridas cada 1 µm en cada experimento, promediando dichos valores de fluorescencia por neurona y extrayendo la señal de fondo (regiones sin marcaje). Asimismo, los valores fueron normalizados con respecto al control en cada experimento individual. Nuestro análisis se limitó a los puntos localizados dentro de células MAP2 positivas.

Para cuantificar la señal asociada a BrEt, se adquirieron imágenes por microscopía confocal y se realizó la proyección máxima de fluorescencia de entre 20-36 stacks de imágenes consecutivas adquiridas cada 1 µm por cada experimento. Se definió como región de interés el cuerpo neuronal y el núcleo astrocitario, promediando valores por célula, y normalizando los valores con respecto al control de cada experimento individual.

Para cuantificar la señal asociada a Fluo-4-AM, se adquirieron en cada experimento entre 40-80 imágenes utilizando el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E 600
de nuestro laboratorio. Se delimitaron los somas neuronales como regiones de interés, y se midió la fluorescencia dentro de estas regiones. Se promediaron los valores por neurona y se normalizaron los valores con respecto a la situación control en cada experimento individual.

Se realizó el t-test no pareado para comparar dos condiciones experimentales distintas debido a que se trata de muestras de una población que se ajusta a una distribución normal y contamos con dos grupos de muestras aleatorias e independientes; y el One-Way ANOVA para comparar la media de tres o más condiciones independientes. Para esto, se utilizó el software GraphPad Prism 5. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media. En todos los casos, se realizaron al menos tres experimentos independientes.

## **Resultados**

## Cultivos neurogliales de hipocampo de ratones Panx1KO no expresan la proteína Panx1

En primer lugar, se procedió a verificar la ausencia de expresión de Panx1 en los ratones Panx1KO, con el fin de validar este modelo experimental. Para esto, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en cultivos neurogliales de hipocampo a los 14-15 DIV, utilizando anticuerpos específicos anti Panx1 (Figura 11 A & E); MAP2, para identificar neuronas (Figura 11 C & G); y GFAP, para identificar astrocitos (Figura 11 B & F). Posteriormente, se adquirieron imágenes por microscopía confocal, las cuales en concordancia con otros estudios revelaron un marcaje punteado para Panx1 tanto en neuronas como en astrocitos (Figura 11 A & D), siendo el mismo más intenso en las neuronas con respecto a lo observado en los astrocitos (Rafael et al., 2020; Vogt et al., 2005; Zoidl et al., 2007). La Panx1 se expresa tanto en el cuerpo celular como a lo largo del árbol dendrítico. Sin embargo, no se observó marcaje contra Panx1 tanto en neuronas como en astrocitos provenientes de ratones Panx1KO (Figura 11 E & H). Así, verificamos la normal expresión y distribución de Panx1 en nuestros animales WT, y su ausencia en ratones Panx1KO.



**Figura 11: No se evidencia marcaje contra Panx1 en animales Panx1KO.** Imágenes representativas de cocultivos neurogliales control fijados a 14-15 DIV en animales WT (A-D) y Panx1KO (E-H). Se realizó un triple marcaje contra canales de Panx1 (A & E, verde); GFAP para evidenciar los procesos astrogliales (B & F, rojo); y MAP2 un marcador del citoesqueleto neuronal (C & G, gris). En D & H se muestra el merge de los tres marcadores. No hay marcaje para canales

Página 38|87

de Panx1 en neuronas ni en células gliales en cocultivos provenientes de animales Panx1KO, pero si lo hay en los cocultivos WT. Escala: 24µm.

## Canales de Panx1 y su papel en el ajuste homeostático de la fuerza sináptica

Con el propósito de determinar la importancia relativa de los canales de Panx1 gliales y neuronales en el ajuste homeostático de la función presináptica, se llevaron a cabo experimentos utilizando células provenientes de ratones C57BL/6 WT o Panx1KO. De esta forma, se estimaron cambios en la función presináptica mediante inmunocitoquímica contra vGlut1 sináptico, ya que su abundancia se correlaciona de forma directa con la pry se ajusta de forma compensatoria frente a cambios crónicos en la actividad sináptica (Mutch et al., 2011; Wilson et al., 2005). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 en sinapsis individuales y la densidad de contactos sinápticos positivos para vGlut1 (vGlut1+). En ambos casos, los contactos sinápticos excitadores fueron identificados por la presencia de una colocalización total o parcial del marcador presináptico (vGlut1) y postsináptico (Homer1) en dendritas identificadas con el marcador del citoesqueleto neuronal MAP2. Asimismo, se utilizaron distintas combinaciones de cocultivos: cocultivos WT, donde tanto las neuronas como la monocapa de células gliales provienen de ratones WT: cocultivos WT + PBD, donde neuronas y glia derivaron de animales WT pero son tratados farmacológicamente con Probenecid (PBD, antagonista específico de Panx1; 500µM, 15 minutos previo y durante el tratamiento con TTX); cocultivos Panx1KO, donde tanto las células gliales como las neuronales fueron obtenidas de animales Panx1KO; cocultivos glia Panx1KO/neuronas WT, donde la monocapa glial se originó de animales Panx1KO mientras que las neuronas procedieron de animales WT; y cocultivos glia WT/neuronas Panx1KO, donde la monocapa glial provino de animales WT mientras que las neuronas fueron obtenidas de animales Panx1KO.

En concordancia con reportes previos (Rafael et al., 2020; Wilson et al., 2005), se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 en los *cocultivos WT* tratados con TTX en comparación con cocultivos control sin tratar (Figura 12 A, E & I) (TTX: 1,41  $\pm$  0,35; control: 1,00  $\pm$  0,15; p<0,0001). De igual modo, ante el bloqueo prolongado de la actividad del circuito con TTX, se observó un aumento significativo en la densidad de contactos sinápticos con respecto a cocultivos sin tratamiento (Figura 12 J) (TTX: 11,03  $\pm$  1,69; control: 6,46  $\pm$  1,81; p<0,0001).



Figura 12: Se produce un aumento compensatorio en la función presináptica y en la densidad de contactos sinápticos de cocultivos WT luego de un período de silenciamiento prolongado de la actividad sináptica. Imágenes representativas de *cocultivos WT* control (A-D) y tratados con TTX (1µM, 24-36hs) (E-H). Se realizó un triple marcaje contra vGlut1 (verde, A, E), Homer1 (rojo, B, F), y MAP2 (azul, C, G). (D, H) Combinación de las imágenes A-C y E-G, respectivamente. Escala: 24µm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un cuadrado en la parte inferior de cada imagen, escala: 4µm. (I) Gráfico de barras que muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 en *cocultivos WT* tratados con TTX y control. Los datos se normalizaron con respecto al control. (J) Cuantificación de la densidad de sinapsis normalizada a 30µm en condiciones control y frente al tratamiento con TTX. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición en cuatro experimentos independientes. Las flechas indican

botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total entre vGlut1 y Homer1. \*\*\* p<0,0001. Two-tailed Student's t-test.

Al analizar la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 en *cocultivos WT* + *PBD*, no se evidenció el aumento compensatorio en los cocultivos tratados con TTX al bloquear farmacológicamente los canales de Panx1, obteniendo valores similares a los hallados en cocultivos control (Figura 13 A, I & M) (TTX + PBD: 0,99 ± 0,07; control: 1,00 ± 0,08; p>0,05). Sin embargo, la inducción de PSH tuvo lugar, dado que el tratamiento únicamente con TTX si produjo un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 (Figura 13 A, E & M) (TTX: 1,40 ± 0,17; control: 1,00 ± 0,13; p<0,0001). A su vez, no se evidenció un aumento compensatorio en la densidad de contactos sinápticos frente al tratamiento prolongado con TTX en presencia de PBD, pero sí fue posible observar este ajuste homeostático frente al tratamiento con TTX (Figura 13 A, E, I & N) (TTX + PBD: 7,46 ± 1,24; TTX: 11,03 ± 1,69; control: 7,63 ± 1,11; p>0,05 y p<0,0001 respectivamente). Estos resultados sugieren que los canales de Panx1 gliales y/o neuronales son necesarios para el ajuste compensatorio en la función presináptica frente a un período de inactividad prolongada del circuito.

Para nuestra sorpresa, en los *cocultivos Panx1KO* se detectó un incremento significativo en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 sináptico frente al silenciamiento prolongado del circuito con TTX, en comparación con cocultivos control (Figura 14 A, E & I) (TTX: 1,40 ± 0,17; control: 1,00 ± 0,16; p <0,0001), sugiriendo que podríamos estar frente a algún mecanismo de compensación, dado que estas observaciones discrepan con las que se evidenciaron frente al bloqueo farmacológico de Panx1. Sin embargo, no se constató un incremento en la densidad de contactos sinápticos en los cocultivos tratados con TTX en comparación con cocultivos sin tratar (Figura 14 J) (TTX: 6,41 ± 2,82; control: 6,75 ± 2,51; p>0,05). Así, este presunto mecanismo de compensación sería parcial, dado que el mismo sería capaz de compensar la función presináptica mediante el ajuste homeostático en la abundancia de vGlut1 sináptico (Figura 14 I), pero no así en la formación y/o estabilización de los contactos sinápticos (Figura 14 J).



Figura 13: El bloqueo farmacológico de los canales de Panx1 previno el aumento compensatorio de la función presináptica y la densidad de contactos sinápticos frente al silenciamiento prolongado del circuito. Imágenes representativas de cocultivos control (A-D), tratados con TTX (1µM, 24-36hs) (E-H), y tratados con PBD (500µM) 15 minutos previo y durante el tratamiento con TTX (I-L). Se realizó un triple marcaje contra vGlut1 (verde,

A, E, I), Homer1 (rojo, B, F, J), y MAP2 (azul, C, G, K). **(D, H, L)** Combinación de las imágenes A-C, E-G e I-K, respectivamente. Escala: 24µm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un cuadrado en la parte inferior de cada imagen, escala: 4µm. **(M)** Gráfico de barras donde se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 en cocultivos tratados con TTX, TTX + PBD y control, datos normalizados con respecto al control. **(N)** Cuantificación de la densidad de sinapsis normalizada a 30µm en condiciones control y frente al tratamiento con TTX y TTX + PBD. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición en cuatro experimentos independientes. Las flechas indican botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total entre vGlut1 y Homer1. \*\*\* p<0,0001; *ns*, no estadísticamente significativo. One way ANOVA, post-hoc Tukey.



Figura 14: La ausencia de canales de Panx1 gliales y neuronales no permite el ajuste compensatorio en la densidad de contactos sinápticos, pero sí de la

**función presináptica.** Imágenes representativas de *cocultivos Panx1KO* control **(A-D)** y tratados con TTX (1µM, 24-36hs) **(E-H)**. Se realizó un triple marcaje contra vGlut1 (verde, A, E), Homer1 (rojo, B, F), y MAP2 (azul, C, G). **(D, H)** Combinación de las imágenes A-C y E-G, respectivamente. Escala: 24µm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un cuadrado en la parte inferior de cada imagen, escala: 4µm. **(I)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 en *cocultivos Panx1KO* tratados con TTX y sin tratamiento, datos normalizados con respecto al control. **(J)** Cuantificación de la densidad de sinapsis normalizada a 30µm en condiciones control y frente al tratamiento con TTX. En ambos casos la línea punteada representa la situación control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición. Las flechas indican botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total entre vGlut1 y Homer1. \*\*\* p<0,0001; *ns*, no estadísticamente significativo. Two-tailed Student's t-test.

Con el fin de diferenciar la implicancia de los canales de Panx1 neuronales y gliales, y teniendo en cuenta que los agentes farmacológicos bloquean los canales presentes en ambos tipos celulares, se analizaron variaciones en la función sináptica en cocultivos *glia Panx1KO/neuronas WT*. De esta forma, se evidenció un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 en los cocultivos tratados con TTX, en comparación con cocultivos control (Figura 15 A, E & I) (TTX: 1,20 ± 0,29; control: 1,00 ± 0,16; p <0,0001). No obstante, en esta configuración de cocultivos, no se constataron variaciones significativas en la densidad de contactos sinápticos entre los cocultivos tratados con TTX y los cocultivos control (Figura 15 J) (TTX: 6,93 ± 3,24; control: 7,76 ± 3,12; p>0,05). Esto parece indicar que los canales de Panx1 gliales son necesarios en el ajuste homeostático de la densidad de contactos sinápticos, pero no son necesarios para el ajuste homeostático de la función presináptica.

Por último, en cocultivos *glia WT/neuronas Panx1KO* no se evidenciaron cambios estadísticamente significativos en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 sináptico entre cocultivos silenciados de forma prolongada con TTX y cocultivos sin tratar (Figura 16 A, E, & I) (TTX: 0,96 ± 0,18; control: 1,00 ± 0,19; p>0,05). Asimismo, tampoco se detectaron variaciones estadísticamente significativas en la densidad de contactos sinápticos entre cocultivos tratados con TTX y cocultivos control (Figura 16 J) (TTX: 5,60 ± 2,31; control: 5,16 ± 1,72; p>0,05). Esto sugiere que los canales de Panx1 neuronales son imprescindibles para el ajuste homeostático tanto de la abundancia de vGlut1 sináptico como en la densidad de contactos sinápticos.

En conjunto estos resultados sugieren la existencia de un rol esencial de los canales de Panx1 gliales y neuronales para el control homeostático de la densidad de contactos sinápticos, mientras que únicamente los canales de Panx1 neuronales son fundamentales para el control homeostático de la función presináptica.



Figura 15: La ausencia de la Panx1 glial permite el ajuste homeostático de la función presináptica, pero no así de la densidad de contactos sinápticos. Imágenes representativas de cocultivos *glia Panx1KO/neuronas WT* sin tratamiento (A-D) y tratados con TTX (1 $\mu$ M, 24-36hs) (E-H). Se realizó un triple marcaje contra vGlut1 (verde, A, E), Homer1 (rojo, B, F), y MAP2 (azul, C, G). (D, H) Combinación de las imágenes A-C y E-G, respectivamente. Escala: 24 $\mu$ m. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un cuadrado en la parte inferior de cada imagen, escala: 4 $\mu$ m. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 en cocultivos *glia Panx1KO/neuronas WT* tratados con TTX y sin tratamiento, datos normalizados con respecto al control. (J) Cuantificación de la densidad de sinapsis normalizada a 30 $\mu$ m en condiciones control y frente al tratamiento con TTX. En ambos casos la línea punteada representa la situación control. Los números dentro de las barras refieren al

Página 45 | 87

número de neuronas analizadas para cada condición. Las flechas indican botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total entre vGlut1 y Homer1. \*\*\*p<0.0001; *ns*, no estadísticamente significativo. Two-tailed Student's t-test.



Figura 16: La ausencia de canales neuronales de Panx1 previno el ajuste homeostático de la función presináptica y de la densidad de contactos sinápticos. Imágenes representativas de cocultivos *glia WT/neuronas Panx1KO* sin tratamiento (A-D) y tratados con TTX (1µM, 24-36hs) (E-H). Se realizó un triple marcaje contra vGlut1 (verde, A, E), Homer1 (rojo, B, F), y MAP2 (azul, C, G). (D, H) Combinación de las imágenes A-C y E-G, respectivamente. Escala: 24µm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un cuadrado en la parte inferior de cada imagen, escala: 4µm. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 en cocultivos *glia WT/neuronas Panx1KO* tratados con TTX y cocultivos sin tratamiento, datos normalizados con respecto al control. (J) Cuantificación de la

XL

Control

Página 46 | 87

densidad de sinapsis normalizada a 30µm en condiciones control y frente al tratamiento con TTX. En ambos casos la línea punteada representa la situación control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición. Las flechas indican botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total entre vGlut1 y Homer1. *ns*, no estadísticamente significativo. Two-tailed Student´s t-test.

# No se observan cambios en la expresión de Cx43 en células gliales provenientes de animales Panx1KO

Teniendo en cuenta que la Cx43 es la isoforma de las Cxs más ampliamente expresada en células gliales, y que los astrocitos llevan a cabo importantes funciones como la remoción de glutamato y K<sup>+</sup> durante la actividad sináptica, la modulación de la excitabilidad neuronal, la *pr* y la inserción de receptores AMPA en el hipocampo (Pannasch et al., 2011), sospechamos que quizás frente a la ausencia de Panx1 glial, se desencadene un mecanismo compensatorio mediado por Cx43 astrocitaria. Así, se estudió si existían variaciones en la expresión Cx43 en células gliales en los *cocultivos Panx1KO* y *glia Panx1KO/neuronas WT*, dado que estos cultivos son capaces de realizar el ajuste homeostático en la función presináptica a pesar de no poseer canales de Panx1 gliales, lo cual no ocurre en los *cocultivos WT* + *PBD*.

De esta forma, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica contra Cx43 en cocultivos neurogliales *glia Panx1KO/neuronas WT* y *cocultivos Panx1KO* (Figura 17 A & D; Figura 18 A & D); GFAP, que identifica la proteína glial fibrilar ácida de los astrocitos (Figura 17 B & E; Figura 18 B & E); y DAPI, un marcador de los núcleos celulares (Figura 17 C & F; Figura 18 C & F). Se cuantificó tanto el área como el número de puntos inmunorreactivos para Cx43 por campo (en imágenes de 144,88x144,88µm; 20.990µm<sup>2</sup>), en cocultivos tratados con TTX (1µM, 24-36hs) y cocultivos sin tratamiento como control de la expresión basal de Cx43.

Se evidenció que frente a la supresión prolongada de la actividad del circuito con TTX, no se produjeron cambios en el número ni en el área de puntos inmunorreactivos para Cx43 en *cocultivos Panx1KO*, en comparación con cocultivos sin tratamiento (Figura 17 I & J) (número de puntos inmunorreactivos para Cx43 con TTX: 1,02 ± 0,22; control: 1,0 ± 0,27; p>0,05; área inmunorreactiva para Cx43 con TTX: 0,93 ± 0,3; control: 1,00 ± 0,11; p>0,05).



Figura 17: Cocultivos Panx1KO no presentan cambios en la expresión de Cx43. Imágenes representativas de cocultivos Panx1KO sin tratamiento (A-C & G) y tratados con TTX

Página 48 | 87

(1μM, 24-36hs) **(D-F & H)**. Se realizó un triple marcaje contra Cx43 (verde, A, D), GFAP (rojo, B, E), y DAPI (azul, C, F). **(G, H)** Combinación de las imágenes A-C y D-F, respectivamente. Escala: 24μm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un recuadro en la parte inferior de las imágenes G & H, escala: 4μm. **(I-J)** Gráficos de barras que muestran la cuantificación del número (I) y el área (J) de puntos inmunorreactivos para Cx43 por campo en cocultivos tratados con TTX y cocultivos sin tratamiento. Los datos se normalizaron respecto al control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición. *ns*, no estadísticamente significativo. Two-tailed Student´s t-test.

Los mismos resultados fueron obtenidos en los cocultivos *glia Panx1KO/neuronas WT*, donde el número y el área de puntos asociados a Cx43 no presentó cambios frente al silenciamiento de la actividad del circuito con TTX en comparación a cocultivos sin tratar (Figura 18 I & J) (número de puntos inmunorreactivos para Cx43 con TTX:  $0,99 \pm 0,1$ ; control:  $1,00 \pm 0,12$ ; p>0,05; área inmunorreactiva para Cx43 con TTX:  $1,02 \pm 0,30$ ; control:  $1,00 \pm 0,3$ ; p>0,05).

En vista de los resultados obtenidos, se puede inferir que el mecanismo de compensación observado en *cocultivos Panx1KO* y *glia Panx1KO/neuronas WT* no es producto de un aumento en la expresión de Cx43.



Figura 18: Cocultivos glia Panx1KO/neuronas WT no presentan cambios en la expresión de Cx43. Imágenes representativas de cocultivos glia Panx1KO/neuronas WT sin

Página 50|87

tratamiento **(A-C & G)** y tratados con TTX (1µM, 24-36hs) **(D-F & H)**. Se realizó un triple marcaje contra Cx43 (verde, A, D), GFAP (rojo, B, E), y DAPI (azul, C, F). **(G, H)** Combinación de las imágenes A-C y D-F, respectivamente. Escala: 24µm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un recuadro en la parte inferior de las imágenes G & H, escala: 4µm. **(I-J)** Gráficos de barras que muestran la cuantificación del número (I) y el área (J) de puntos inmunorreactivos para Cx43 por campo en cocultivos tratados con TTX y cocultivos sin tratamiento. Los datos se normalizaron respecto al control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición. *ns*, no estadísticamente significativo. Two-tailed Student´s t-test.

#### La función neuronal se ve disminuida en ausencia de canales de Panx1

A continuación, analizamos la importancia de la Panx1 neuronal en la función de la terminal presináptica. Para esto, medimos los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, dado que este ion resulta imprescindible para la exocitosis de los neurotransmisores contenidos en las VS, estando así fuertemente vinculado con la función sináptica. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia asociada al marcador de Ca<sup>2+</sup> intensiométrico Fluo-4-AM en neuronas de *cocultivos WT* y *cocultivos glíaWT/neuronasPanx1KO*, frente al tratamiento prolongado con TTX (1µM, 24-36hs) y en condiciones basales sin tratamiento.

Se observó que en *cocultivos WT* el silenciamiento prolongado de la actividad neuronal con TTX (1µM, 24-36hs) desencadena un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia asociada a Fluo-4-AM en comparación con neuronas sin tratamiento (TTX: 1,51 ± 0,29; control: 1,00 ± 0,21; p<0,0001) (Figura 19 A-C). Estos resultados indican que el ajuste homeostático de la función presináptica frente al silenciamiento prolongado del circuito promueve un incremento en los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, lo cual está fuertemente vinculado a un aumento de la fuerza presináptica. Estos resultados son coherentes con estudios publicados por otros autores (Catterall & Few, 2008; Giansante et al., 2020; Letellier & Goda, 2023; Südhof, 2012a; Thanawala & Regehr, 2013).

Por otro lado, se detectó que en los cocultivos *glíaWT/neuronasPanx1KO* tratados con TTX (1µM, 24-36hs) se previno el aumento en la fluorescencia asociada a Ca<sup>2+</sup> intracelular en comparación con cocultivos control sin tratamiento (TTX: 1,02 ± 0,15; control: 1,00 ± 0,16; p <0,05) (Figura 20 A-C).

Proponemos que, frente a este escenario, el ingreso de Ca<sup>2+</sup> al interior celular puede estar ocurriendo tanto directamente a través del poro que forman los canales de Panx1 el cual permea dicho ion (Dahl, 2015); o bien, los canales de Panx1 podrían promover la liberación de ATP, el cual actúa sobre receptores purinérgicos neuronales permitiendo directamente el ingreso de Ca<sup>2+</sup> (Bao et al., 2004; Iglesias et al., 2009; Suadicani et al., 2012; Xing et al., 2014). Con el fin de profundizar en el mecanismo, y debido a que los canales de Panx1 han sido funcionalmente relacionados con los receptores purinérgicos del tipo P2X7 frente a la activación prolongada (Pelegrin & Surprenant, 2006), analizamos la importancia de estos receptores en la modulación de la fuerza sináptica en condiciones de inactividad crónica en cocultivos *glíaWT/neuronasPanx1KO*. Para ello, aplicamos al medio de cultivo BzATP (10µM, 24-36hs) un agonista específico de los receptores P2X7. Se observó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia asociada a Fluo-4-AM en comparación con neuronas sin tratamiento (BzATP 1,38 ± 0,10; UT 1,00 ± 0,15; p<0,0001) (Figura 20 C & D).



Figura 19: El calcio intracelular incrementa drásticamente en *cocultivos WT* frente al silenciamiento prolongado de la actividad del circuito. Imágenes representativas de *cocultivos WT* sin tratamiento (A) y tratados con TTX (1µM, 24-36hs) (B). Se utilizó el marcador intensiométrico de calcio Fluo-4-AM y se cuantificó la intensidad de fluorescencia asociado al mismo en neuronas. Escala: 20µm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un recuadro en la parte inferior de las imágenes, escala: 10µm. (C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a Fluo-4-AM en neuronas de cocultivos tratados con TTX y cocultivos sin tratamiento. La línea punteada representa la situación control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición. \*\*\* p<0,0001. Two-tailed Student s t-test.



Figura 20: El aumento del calcio intracelular evocado por el silenciamiento prolongado de la actividad del circuito se previno totalmente en neuronas Panx1KO, sin embargo, esta situación fue revertida mediante la activación de los P2X7R. Imágenes representativas de cocultivos *glia WT/neuronas Panx1KO* sin tratamiento (A), tratados con TTX (1µM, 24-36hs) (B), y con BzATP (10µM, 24-36hs) (C). Se utilizó el marcador intensiométrico de calcio Fluo-4 AM y se cuantificó la intensidad de fluorescencia asociado al mismo en neuronas. Escala: 20µm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un recuadro en la parte inferior de las imágenes, escala: 10µm. (D) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a Fluo-4 AM en neuronas de cocultivos tratados con TTX o BzATP y cocultivos sin tratamiento. La línea punteada representa la situación control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición en cuatro experimentos independientes. *ns*, no estadísticamente significativo, \*\*\* p<0,0001. One way ANOVA, post-hoc Tukey.

Estos resultados muestran que la activación de los receptores del tipo P2X7 promueve los cambios plásticos compensatorios, aún en ausencia de la Panx1 neuronal, sugiriendo que la activación de estos receptores y la Panx1 neuronal se asocian funcionalmente en el ajuste compensatorio de la fuerza presináptica. Así, los canales de Panx1 podrían estar liberando ATP junto con otros factores solubles, los cuales promueven la activación de los P2X7R desencadenando así el aumento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, y como consecuencia, en la función presináptica luego de un período de inactividad prolongada.

En línea con estos resultados y con el fin de indagar aún más sobre el rol de los canales de Panx1 y la función presináptica, se estudiaron cambios asociados a la abundancia de Stg1, proteína de las vesículas sinápticas. De esta forma, se analizó la dinámica del pool de VS utilizando un anticuerpo que reconoce el dominio luminal de la Stg1. Para marcar en su totalidad el pool de VS de reciclaje, se aplicó una estimulación de campo (600 PA, 10Hz) a cocultivos disociados de hipocampo a los 14-16 DIV. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia asociada a Stg1 en *cocultivos WT* y *glia WT/neuronas Panx1KO*, tratados con TTX (1µM, 24-36hs) y sin tratamiento como control de la función neuronal basal.

En concordancia con cambios estructurales descritos previamente (Murthy et al., 2001; Rafael et al., 2020; Thiagarajan et al., 2005), se constató que frente al tratamiento con TTX, los *cocultivos WT* presentan un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia asociada a Stg1, en comparación a cocultivos sin tratamiento (TTX: 1,28  $\pm$  0,14; control: 1,00  $\pm$  0,16; p<0,0001) (Figura 21 A-G).

Interesantemente, en cocultivos *glia WT/neuronas Panx1KO* tratados con TTX se previno este ajuste compensatorio en la abundancia de Stg1 (TTX: 1,00 ± 0,10; control: 1,00 ± 0,11; p>0,05), sugiriendo la importancia de la Panx1 neuronal en el reciclaje de las vesículas sinápticas luego del bloqueo crónico de la actividad sináptica (Figura 22 A-F & J). Por otra parte, el tratamiento con BzATP (10µM; 24-36hs) produjo un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia asociada a Stg1, en comparación a cocultivos sin tratamiento (BzATP: 1,17 ± 0,12; control: 1,00 ± 0,10; p<0,0001) (Figura 22 A-C, G-I & J), mimetizando el efecto de la TTX. En conjunto, estos resultados sugieren que los canales de Panx1 neuronales son esenciales para el ajuste homeostático del tamaño del pool de VS de reciclaje, llevando a cabo esta tarea en conjunto con los P2X7R, los cuales se activarían a través del ATP y otros factores solubles que estarían siendo liberados al medio extracelular a través de los panexones, permitiendo el ingreso de Ca<sup>2+</sup> al interior celular, ion esencial en la exocitosis de los NT contenidos en las VS.



Figura 21: El tamaño del pool de vesículas de reciclaje aumenta significativamente en *cocultivos WT* tratados con TTX estimulados eléctricamente. Imágenes representativas de *cocultivos WT* sin tratamiento (A-C) y tratados con TTX (1 $\mu$ M, 24-36hs) (D-F). Se realizó un marcaje *in vitro live* utilizando el anticuerpo contra sinpatotagmina-1 (Stg1) que reconoce el dominio intraluminal de la proteína (A & D) y se marcó el citoesqueleto neuronal utilizando MAP2 (B & E). El merge de ambos marcajes se muestra en C & F. Escala 24 $\mu$ m. Se muestra con mayor magnitud las regiones señaladas con un recuadro, escala 4 $\mu$ m. (G) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a Stg1 en neuronas de cocultivos tratados con TTX y cocultivos sin tratamiento. La línea punteada representa la situación control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición. \*\*\* p<0,0001. Two-tailed Student's t-test.



Figura 22: El tamaño del pool de vesículas de reciclaje no presenta cambios significativos en cocultivos *glia WT/neuronas Panx1KO* tratados con TTX y estimulados eléctricamente, sin embargo, se evoca la respuesta homeostática al activar los P2X7R. Imágenes representativas de cocultivos *glia WT/neuronas Panx1KO* sin tratamiento (A-C) y tratados con TTX (1µM, 24-36hs) (D-F) o BzATP (10µM, 24-36hs) (G-I). Se

realizó un marcaje *in vitro live* utilizando el anticuerpo contra sinpatotagmina-1 (Stg1) que reconoce el dominio intraluminal de la proteína (A, D & G) y se marcó el citoesqueleto neuronal utilizando MAP2 (B, E & H). El merge de ambos marcajes se muestra en C, F & I. Escala 24µm. Se muestra con mayor magnitud las regiones señaladas con un recuadro, escala 4µm. **(J)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a Stg1 en neuronas de cocultivos tratados con TTX, BzATP y cocultivos sin tratamiento. La línea punteada representa la situación control. Los números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición en dos experimentos independientes. *ns*, no estadísticamente significativo; \*\*\* p<0,0001. One Way ANOVA, post-hoc Tukey.

## La actividad de los canales de Panx1 gliales y neuronales se encuentra regulada durante la PSH

En nuestros estudios previos, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la distribución y abundancia de Panx1 frente al silenciamiento prolongado de la actividad del circuito (Rafael et al., 2020). Por lo tanto, el rol de los canales de Panx1 en la regulación de la fuerza sináptica dependiente de la actividad podría estar relacionado con una mayor actividad de estos canales, y no con un aumento en la expresión de los mismos. Debido a esto, nos propusimos estudiar si existen cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática asociados a Panx1 en células astrocitarias y neuronales durante la PSH.

En primer lugar, se caracterizó temporalmente la inducción de la PSH mediante una curva temporal (*time course*) para vGlut1 sináptico. De esta forma, se cuantificaron tanto variaciones en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 sináptico, así como cambios en la densidad de contactos sinápticos, y se establecieron cinco tiempos distintos de inducción de la PSH: 1hs, 2hs, 5hs, 12hs y 24hs de tratamiento con TTX (1µM), utilizando cocultivos sin tratamiento como control de la función sináptica basal.

No se detectaron cambios en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 ni en la densidad de contactos sinápticos al tratar los cultivos con TTX (1µM) durante 1hs, 2hs y 5hs, en comparación con cocultivos sin tratamiento (intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 con TTX durante 1hs:  $0,91 \pm 0,1$ ; 2hs:  $0,95 \pm 0,19$ ; 5hs:  $1,03 \pm 0,1$ ; control:  $1,00 \pm 0,16$ ; p>0,05; densidad de contactos sinápticos con TTX durante 1hs:  $4,68 \pm 0,83$ ; 2hs:  $4,89 \pm 0,54$ ; 5hs:  $5,13 \pm 0,91$ ; control:  $4,76 \pm 0,80$ ; p>0,05), (Figura 23 A-D, G & H).



**Figura 23:** A partir de las 12hs de tratamiento con TTX se evidencian cambios en la abundancia de vGlut1 sináptico. Imágenes representativas de *cocultivos WT* sin tratamiento (A) y tratados con TTX (1μM) durante 1hs (B), 2hs (C), 5hs (D), 12hs (E) y 24hs (F). Se realizó un triple marcaje contra vGlut1 sináptico (marcador presináptico, verde); Homer1 (marcador postsináptico, rojo); y MAP2 (marcador del citoesqueleto neuronal, azul). Escala: 20μm. Se muestra con mayor magnificación la región señalada con un recuadro en la parte inferior de las imágenes, escala: 4μm. (G & H) Gráficos de barras que muestran la cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 sináptico (G) en neuronas de cocultivos tratados con TTX (1hs, 2hs, 5hs, 12hs y 24hs) y cocultivos sin tratamiento como control de la función sináptica basal; y la densidad de sinapsis normalizada a 30μm (H) en condiciones control y frente al tratamiento con TTX. Los datos fueron normalizados con respecto al control. Los

números dentro de las barras refieren al número de neuronas analizadas para cada condición en tres experimentos independientes. *ns*, no estadísticamente significativo; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001. One way ANOVA post-hoc Tukey.

Sin embargo, luego de transcurridas 12hs de tratamiento con TTX (1µM), se observó un aumento tanto en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1, como en la densidad de contactos sinápticos (intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 con TTX durante 12hs:  $1,15 \pm 0,16$ ; control:  $1,00 \pm 0,16$ ; p<0,001; densidad de contactos sinápticos con TTX durante 12hs:  $5,49 \pm 0,52$ ; control:  $4,76 \pm 0,80$ ; p<0,001), siendo estos cambios más significativos cuando el tratamiento alcanza las 24hs (intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 con TTX durante 24hs:  $1,89 \pm 0,27$ ; control:  $1,00 \pm 0,16$ ; p<0,0001; densidad de contactos sinápticos en cocultivos tratados con TTX durante 24hs:  $8,14 \pm 0,54$ ; control:  $4,76 \pm 0,80$ ; p<0,0001) (Figura 23 E-H). Esto sugiere que el ajuste homeostático en la abundancia de vGlut1 se manifiesta luego de al menos 12hs de silenciamiento de la actividad neuronal con TTX.

A continuación, y en línea con los resultados anteriores, se estudiaron cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática de neuronas y astrocitos a un colorante que permea canales de grandes poros, esperando encontrar un aumento en la permeabilidad de estas células a partir de las 12hs de tratamiento con TTX (1µM). Para esto, las células se expusieron a una solución de PBS conteniendo bromuro de etidio (BrEt; 2,5µM), el cual es capaz de atravesar diferentes canales que se encuentran en la membrana plasmática celular, uniéndose de forma irreversible al ADN y emitiendo fluorescencia una vez fijado a los ácidos nucleicos. De esta forma, se realizó la inducción de la PSH con TTX (1µM) durante 1hs, 2hs, 5hs, 12hs y 24hs, utilizando cocultivos sin tratamiento como control de la permeabilidad basal de la membrana celular. Previo a la fijación celular, se expuso a cada condición experimental a una solución de BrEt (2,5µM) durante 15 min, de forma tal que, sin importar el tiempo de inducción de la PSH, todos los cocultivos fueron expuestos al colorante durante un lapso de tiempo idéntico. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia asociada al BrEt en somas neuronales y astrocitarios.

Se observó que en *cocultivos WT*, las neuronas tienden a presentar una disminución significativa en la captación de BrEt frente al tratamiento con TTX de 1hs y 5hs, pero no luego de 2hs de tratamiento, en comparación con células no tratadas (TTX 1hs:  $0,78 \pm 0,21$ ; 5hs:  $0,73 \pm 0,17$ ; control:  $1,00 \pm 0,21$ ; p<0,0001; TTX 2hs:  $0,87 \pm 0,31$ ; p>0,05) (Figura 24 A-D & G). Sin embargo, luego de 12hs de tratamiento con TTX la intensidad de fluorescencia asociada a BrEt en neuronas aumenta significativamente, siendo estos

cambios más pronunciados a las 24hs de tratamiento (TTX 12hs:  $1,17 \pm 0,26$ ; 24hs:  $1,31 \pm 0,33$ ; control:  $1,00 \pm 0,21$ ; p<0,001y p<0,0001 respectivamente) (Figura 24 A, E-G). Estos resultados son consistentes con la inducción temporal de la PSH observados al analizar la abundancia sináptica de vGlut1 a diferentes tiempos (Figura 27). Esto sugiere que durante las primeras horas de inactividad circuital, los canales neuronales de gran poro podrían estar menos activos en comparación a las condiciones basales, aumentando su permeabilidad luego de las 12hs de inducción de la PSH.



Figura 24: La permeabilidad de la membrana plasmática astrocitaria y neuronal medida por canales de gran poro se modifica durante la PSH. Imágenes representativas de *cocultivos WT* que muestran la captación basal de bromuro de etidio (BrEt)

Página 60 | 87

(A), y la captación frente al tratamiento con TTX (1µM) durante 1hs (B), 2hs (C), 5hs (D), 12hs (E) y 24hs (F). Escala:  $35\mu$ m. Con flechas azules se señalan neuronas y con puntas de flecha blanca los astrocitos. (G & H) Gráfico de barras que muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a BrEt en neuronas (G) y astrocitos (H). Los datos se normalizaron con respecto al control. Nótese la disminución en la permeabilidad de la membrana en ambos tipos celulares frente a tratamientos tempranos con TTX, y los aumentos frente a tratamientos prolongados. Los números dentro de las barras refieren al número de células analizadas para cada condición en cuatro experimentos independientes. ns, no estadísticamente significativo; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001. One way ANOVA post-hoc Tukey.

En cuanto a las células astrocitarias, se constató que durante las primeras 12hs de tratamiento con TTX ocurre una fuerte disminución estadísticamente significativa en la captación de BrEt en comparación con células no tratadas (TTX durante 1hs: 0,63  $\pm$  0,27; 2hs: 0,61  $\pm$  0,22; 5hs: 0,57  $\pm$  0,23; 12hs: 0,85  $\pm$  0,17; control: 1,00  $\pm$  0,29; p<0,0001) (Figura 24 A-E & H). Luego de 24hs de tratamiento con TTX, se observó un incremento significativo en la captación astrocitaria de BrEt en comparación con la captación basal (TTX 24hs: 1,29  $\pm$  0,30; control: 1,00  $\pm$  0,29; p<0,0001) (Figura 24 A, F & H). Estos resultados indican que, a diferencia de lo observado en las neuronas, durante las primeras 12hs horas de inactividad del circuito los canales de membrana astrocitarios muestran una disminución en su actividad, la cual se incrementa luego de transcurridas 24hs desde la inducción de la PSH.

Con el fin de analizar la relevancia relativa de los canales de Panx1 neuronales y astrocitarios en la permeabilidad de la membrana durante la PSH, realizamos ensayos de captación de BrEt en cocultivos combinados de *glia Panx1KO/neuronas WT* y *glia WT/neuronas Panx1KO*.

La ausencia de canales de Panx1 gliales en los cocultivos *glia Panx1KO/neuronas WT*, nos permitió identificar cambios importantes en la permeabilidad de la membrana neuronal y astrocitaria. Tratamientos de corta duración (1hs, 2hs y 5hs) con TTX no produjeron variaciones significativas en la captación de BrEt neuronal con respecto a la captación basal (TTX 1hs:  $0.82 \pm 0.43$ ; 2hs:  $0.89 \pm 0.49$ ; 5hs:  $0.80 \pm 0.20$ ; control:  $1.00 \pm 0.40$ ; p<0.05) (Figura 25 A-D & G). No obstante, frente a tratamientos prolongados (12hs y 24hs) con TTX se observó un incremento significativo en la captación de BrEt neuronal en comparación con la captación en neuronas sin tratamiento, siendo este aumento más significativo a las 12hs que a las 24hs de tratamiento (TTX 12hs:  $1.27 \pm 0.20$ ; 24hs:  $1.23 \pm 0.41$ ; control:  $1.00 \pm 0.40$ ; p<0.001 y p<0.01 respectivamente) (Figura 25 A, E-G).





experimentos independientes. ns, no estadísticamente significativo; \*\* p<0.001; \*\*\* p<0.0001. One way ANOVA post-hoc Tukey.

En lo que respecta a los astrocitos, constatamos una disminución significativa en la captación de BrEt durante las primeras horas de tratamiento con TTX, siendo la misma de mayor magnitud luego de 2hs de silenciamiento del circuito (TTX 1hs: 0,85  $\pm$  0,22; 5hs: 0,87  $\pm$  0,30; 2hs: 0,82  $\pm$  0,32; control: 1,00  $\pm$  0,44; p<0,001 y p<0,0001 respectivamente) (Figura 25 A-D & H). Sin embargo, durante tratamientos con TTX prolongados, no se observaron cambios significativos en la captación de BrEt (TTX 12hs: 0,97  $\pm$  0,18; 24hs: 1,02  $\pm$  0,14; control: 1,00  $\pm$  0,44; p>0,05) (Figura 25 A, E, F & H). De esta forma, los resultados obtenidos sugieren que los canales de Panx1 gliales son necesarios para la reducción de la permeabilidad neuronal durante la inducción temprana de la PSH, mientras que a nivel astrocitario promueven el aumento en la permeabilidad de la membrana durante la inducción tardía de la PSH.

Por otro lado, como consecuencia de la ausencia de canales neuronales de Panx1 en los cocultivos *glia WT/neuronas Panx1KO*, se apreciaron grandes variaciones en la permeabilidad de la membrana neuronal frente a la inducción prolongada de la PSH. Específicamente, a tiempos cortos de inducción de la PSH, no se identificaron cambios significativos en la captación neuronal de BrEt en relación a la captación basal (TTX 1hs:  $0.95 \pm 0.21$ ; 2hs:  $1.01 \pm 0.20$ ; 5hs:  $0.98 \pm 0.20$ ; control:  $1.00 \pm 0.21$ ; p>0.05) (Figura 26 A-D & G). Llamativamente, frente a tratamientos prolongados con TTX, la captación neuronal de BrEt disminuye significativamente en comparación con neuronas sin tratamiento (TTX 12hs:  $0.83 \pm 0.26$ ; 24hs:  $0.81 \pm 0.18$ ; control:  $1.00 \pm 0.21$ ; p<0.0001). En cuanto a los astrocitos, no se detectaron variaciones significativas en la captación de BrEt frente a tratamientos breves con TTX, en comparación con cocultivos sin tratamiento (TTX 1hs:  $1.03 \pm 0.27$ ; 2hs:  $1.17 \pm 0.33$ ; 5hs:  $1.12 \pm 0.34$ ; control:  $1.00 \pm 0.21$ ; p>0.05) (Figura 26 A-D & H).

No obstante, luego de 12hs y 24hs de tratamiento con TTX, se observó un aumento significativo en la captación astrocitaria de BrEt (TTX 12hs:  $1,39 \pm 0,41$ ; 24hs:  $1,27 \pm 0,34$ ; control:  $1,00 \pm 0,21$ ; p<0,0001) (Figura 26 A, E, F & H). Estos resultados sugieren que los canales neuronales de Panx1 son esenciales para la inducción neuronal de la PSH, tanto temprana como tardía, mientras que a nivel astrocitario estos canales son más relevantes durante la inducción temprana de la PSH.



#### Figura 26: La actividad de los canales de Panx1 neuronales es modulada durante

**Ia PSH.** Imágenes representativas de cocultivos *glia WT/neuronas Panx1KO* que muestran la captación basal de bromuro de etidio (BrEt) (A), y la captación frente al tratamiento con TTX (1μM) durante 1hs (B), 2hs (C), 5hs (D), 12hs (E) y 24hs (F). Escala: 35μm. Con flechas azules se señalan neuronas y con puntas de flecha blanca los astrocitos. (G & H) Gráfico de barras que muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a BrEt en neuronas (G) y astrocitos (H). Los datos se normalizaron con respecto al control. Los números dentro de las barras refieren al número de células analizadas para cada condición en cuatro experimentos independientes. ns, no estadísticamente significativo; \*\* p<0.001; \*\*\* p<0.0001. One way ANOVA post-hoc Tukey.

## Discusión

En el presente trabajo nos propusimos caracterizar el rol de los canales de Panx1 neuronales y astrocitarios en la PSH. Para esto, nuestro modelo experimental *in vitro* consistió en cocultivos neurogliales disociados de hipocampo murino. Dichos hipocampos provinieron de ratones C57BL/6 neonatos (P0-P1), o de ratones neonatos Panx1KO. Este modelo *in vitro* ha sido ampliamente utilizado en la investigación de la PSH, ya que brinda la oportunidad de explorar los mecanismos moleculares que subyacen a los cambios homeostáticos de la función presináptica a nivel de sinapsis individuales fácilmente identificables (Pozo & Goda, 2010; Turrigiano, 2008). La PSH se indujo de forma farmacológica mediante el tratamiento prolongado con el antagonista de canales de Na<sup>+</sup> voltaje-dependientes, tetrodotoxina (TTX, 1µM, 24-36hs salvo excepciones).

Evaluamos cambios en la función presináptica mediante la cuantificación de la densidad de contactos sinápticos y la intensidad de fluorescencia asociada al transportador vesicular de glutamato vGlut1, el cual se expresa en la presinapsis de sinapsis excitadoras (Rafael et al., 2020). Esta es una herramienta confiable, ya que: a) la abundancia de vGlut1 en la terminal presináptica se encuentra finamente regulada de manera compensatoria a los niveles de actividad del circuito (lo cual no es frecuente para todas las proteínas presentes en la terminal sináptica); b) el número de copias de vGlut1 por vesícula sináptica está regulado y modula la cantidad de glutamato presente dentro de las mismas, determinando el tamaño cuantal; y c) su abundancia se correlaciona directamente con la pr (Herman et al., 2014; Mutch et al., 2011; Wilson et al., 2005). Por otra parte, dado que la adaptación a la inactividad crónica involucra un aumento en la concentración presináptica de Ca<sup>2+</sup>, se evaluaron variaciones en la abundancia intracelular de dicho ion en neuronas vivas, mediante la utilización de la molécula pequeña fluorescente Fluo-4-AM (Lazarevic et al., 2011; Rátkai et al., 2021; Zhao et al., 2011). Asimismo, se utilizó la captación in vivo de un anticuerpo policional que reconoce el dominio intravesicular de la Stg1 para estimar cambios en la tasa de exocitosis, analizando cambios en el tamaño del pool de reciclaje total, el cual acompaña otros cambios estructurales que ocurren frente a períodos de inactividad del circuito (Murthy et al., 2001; Rafael et al., 2020; Thiagarajan et al., 2005). Finalmente, evaluamos cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática astrocitaria y neuronal durante la inducción de la PSH, mediante el ensayo de captación de BrEt.

## Existe un rol diferencial de los canales de Panx1 gliales y neuronales en la PSH

Nuestro primer abordaje experimental consistió en verificar la ausencia de canales de Panx1 en cocultivos neurogliales provenientes de ratones Panx1KO. En nuestros ensayos de inmunocitoquímica, no se observó una señal positiva para Panx1 en células identificadas como astrocitos (GFAP+), ni en células identificadas como neuronas (MAP2+), sugiriendo que estos animales no expresan canales de Panx1 a nivel hipocampal (Figura 13 E-H). De acuerdo con reportes previos (Rafael et al., 2020; Vogt et al., 2005; Zoidl et al., 2007), se confirmó la expresión de Panx1 en células gliales y neuronales de animales WT (Figura 13 A-D).

Luego, investigamos el posible rol de la Panx1 en el ajuste homeostático de la función presináptica analizando la abundancia de vGlut1 sináptico en cocultivos disociados de hipocampo tratados con PBD (500µM, 15 minutos previo y durante el tratamiento con TTX) (cocultivos WT + PBD). Se observó que a diferencia de lo que ocurre en los cocultivos WT tratados de forma prolongada con TTX (Figura 14), el bloqueo farmacológico de los canales de Panx1 con PBD previno la inducción de la PSH (Figura 13). Teniendo en cuenta que los panexones se encuentran tanto en células neuronales como gliales, y con el fin de evaluar el rol diferencial de los canales de Panx1 gliales y neuronales en el ajuste homeostático de la función presináptica, constatamos que frente al silenciamiento prolongado de la actividad del circuito en cocultivos Panx1KO, se observó el aumento compensatorio en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1, pero no así en la densidad de contactos sinápticos (Figura 14). Los mismos resultados fueron obtenidos para los cocultivos glia Panx1KO/neuronas WT (Figura 15). Por último, los cocultivos glia WT/neuronas Panx1KO no fueron capaces de realizar el ajuste homeostático de la función presináptica, ni de la densidad de contactos sinápticos frente al tratamiento con TTX (Figura 16). Por lo tanto, en conjunto, estos resultados indican que tanto los canales gliales como neuronales de Panx1 son necesarios para la formación y/o mantenimiento de los contactos sinápticos, mientras que sólo los canales de Panx1 neuronales son imprescindibles para el ajuste homesotático de la función presináptica.

Estos hallazgos nos llevan a considerar la posibilidad de que existan mecanismos de compensación en juego en *cocultivos Panx1KO* y *glia Panx1KO/neuronas WT*, brindándole a estas células la capacidad de ajustar de forma homeostática la función presináptica, pero no así la formación y/o mantenimiento de los contactos sinápticos. Un posible mecanismo de compensación descrito por otras investigaciones, es el mediado

por alguna otra isoforma de la Panx como, por ejemplo, la Panx2, y/o hemicanales de Cx43 (Boassa et al., 2015; Suadicani et al., 2012).

La Cx43 es una de las conexinas más ampliamente expresada en células gliales hipocampales (Giaume et al., 2013). Con el fin de testear la posibilidad de un mecanismo de compensación llevado a cabo por hemicanales de Cx43, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica contra Cx43 en *cocultivos Panx1KO* y cocultivos *glia Panx1KO/neuronas WT*, esperando que si esta proteína compensa la función de la Panx1 entonces su abundancia o distribución podrían verse modificadas. Así, se cuantificaron tanto variaciones en el número como en el tamaño de puntos inmunorreactivos para Cx43 astrocitaria, sin registrar cambios significativos frente al tratamiento prolongado con TTX, en relación a cocultivos control (Figura 17 & 16). Estas observaciones sugieren que la compensación de la función presináptica en *cocultivos Panx1KO* y *glia Panx1KO/neuronas WT*, no se debe a un aumento en la expresión de Cx43, sin embargo, estos hallazgos no son suficientes para descartar que se produzca un aumento en la actividad de estos canales.

En cuanto a la Panx2, esta proteína se encuentra altamente expresada en el SNC, particularmente en el hipocampo, la corteza cerebral, el tálamo y el cerebelo, estando presente tanto en neuronas como en glia (He et al., 2023; Swayne et al., 2010; Vasseur et al., 2014). Esta proteína se encuentra localizada en el interior celular y, en condiciones basales, no forma canales de membrana funcionales. Un posible escenario, es que frente a la pérdida de función presináptica por la ausencia de Panx1, la Panx2 sufra modificaciones postraduccionales o dimerización con otras proteínas, permitiéndole formar canales de membrana funcionales. Sin embargo, esta hipótesis no fue abordada en el presente trabajo y es el foco de investigaciones futuras del laboratorio.

Por otro lado, la incapacidad de incrementar la densidad de contactos sinápticos frente al tratamiento con TTX en ausencia de canales neuronales y/o gliales de Panx1, se encuentra en contradicción con otros estudios, donde se observó que la ausencia de Panx1 produce un aumento en las ramificaciones dendríticas, la longitud de las dendritas y su complejidad, y la formación de redes neuronales (Flores-Muñoz et al., 2022; Sánchez-Arias et al., 2019; Wicki-Stordeur & Swayne, 2013). Esta función es llevada a cabo por Panx1 a través de interacciones directas o indirectas con proteínas de unión a la actina, como Arp2/3, Drebrin, Cortactin 1, Rac1, Cdc42 y la familia de pequeñas Rho-GTPasas. La ausencia de Panx1 promueve un aumento en la expresión de estas proteínas de unión a la actina, lo cual afecta el remodelamiento del citoesqueleto, favoreciendo la polimerización de la actina (Flores-Muñoz et al., 2022). Destacamos especialmente a las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42, ya que son miembros de la familia de Rho-GTPasas y desempeñan un papel crucial en el mantenimiento y reorganización de las estructuras dendríticas (Duman et al., 2015; Tolias et al., 2011).

Existe la posibilidad de que estas discrepancias se deban a diferencias en la edad de los animales utilizados, especialmente teniendo presente que la expresión de Panx1 es edad dependiente; siendo la misma más abundante durante etapas tempranas del desarrollo posnatal, y disminuyendo rápidamente con el transcurso de la edad (Ardiles et al., 2014). Asimismo, nuestros cocultivos presentan un alto contenido de células gliales, a diferencia de los modelos utilizados por otros autores (Flores-Muñoz et al., 2022; Sanchez-arias et al., 2019). Cabe destacar que experimentos realizados en nuestro laboratorio, demuestran que la presencia de células gliales es imprescindible para promover la inducción de la PSH utilizando vGlut1 como estimador (Rafael et al., 2020). De esta forma, y en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, proponemos que en nuestro modelo con animales neonatos P0-P1, donde las neuronas son plantadas sobre una monocapa confluente de células gliales, la Panx1 juega otro rol promoviendo la formación de contactos sinápticos, y así, la formación de redes neuronales, mientras que, en animales adultos utilizados en otros estudios, y en presencia de una reducida población glial, la Panx1 tenga el efecto contrario.

### El ajuste de la función presináptica depende de canales de Panx1 neuronales

En función de los resultados obtenidos en los cocultivos glia WT/neuronas Panx1KO, donde frente al tratamiento prolongado con TTX las neuronas fueron incapaces de realizar el ajuste homeostático tanto en la abundancia de vGlut1 como en la densidad de contactos sinápticos, decidimos evaluar si la ausencia de Panx1 neuronal impacta en otros aspectos vinculados con la función presináptica. Con este fin, evaluamos cambios en los niveles citosólicos de Ca<sup>2+</sup>, dado que el aumento en la concentración intracelular de dicho ion, es imprescindible para que ocurra la exocitosis de neurotransmisores y se ajuste la fuerza sináptica de manera compensatoria al modificar los niveles de actividad del circuito (Catterall & Few, 2008; Giansante et al., 2020; Thanawala & Regehr, 2013). Identificamos que, frente al tratamiento crónico con TTX, en cocultivos glia WT/neuronas Panx1KO se previno el ajuste compensatorio en la abundancia del Ca<sup>2+</sup> citosólico luego de un período de inactividad prolongado (Figura 20), en comparación con los cocultivos WT (Figura 19). Sin embargo, en los cocultivos glia WT/neuronas Panx1KO, el tratamiento con BzATP es suficiente para recuperar el incremento en la concentración de Ca2+ intracelular (Figura 20 A, C & D), lo cual sugiere que la activación de los P2X7R participa en la modulación de la fuerza sináptica en

condiciones de inactividad prolongada, y en conjunto, sugiere la existencia de una interacción funcional entre Panx1 y P2X7R. Interesantemente, los canales de Panx1 y los P2X7R comparten características específicas que podrían ser la base de su vínculo funcional en nuestro modelo de PSH. Por ejemplo, tanto los P2X7R como los panexones no requieren despolarización presináptica para activarse. Asimismo, la concentración extracelular de ATP potencia su activación y, por lo tanto, la permeabilidad de membrana. Esta interacción funcional entre Panx1 y P2X7R se encuentra bien documentada; experimentos realizados en macrófagos sugieren que los panexones podrían funcionar como grandes poros asociados a los P2X7R luego de una estimulación prolongada (hasta 20 minutos) (North, 2002; Pelegrin & Surprenant, 2006; Suadicani et al., 2006). En este modelo, el ATP activa los P2X7R y abre una vía de liberación transmembrana que permite la captación de BrEt, así como la liberación de la citoquina proinflamatoria interleuquina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), siendo estos efectos prevenidos mediante el bloqueo de Panx1. La utilización de pequeños ARNs de interferencia (siRNA) dirigidos contra Panx1 y péptidos miméticos de Panx1 inhibitorios, produjo la inhibición de la captación de BrEt sin afectar la corriente iónica y la entrada de Ca<sup>2+</sup> asociada a la estimulación de los P2X7R (Pelegrin & Surprenant, 2006). Asimismo, el aumento del Ca<sup>2+</sup> citosólico promueve la liberación de ATP a través de los canales de Panx1, por lo que la apertura de los panexones sería desencadenada por el aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular que se produce en consecuencia de la estimulación de los P2X7R (Anselmi et al., 2008; De Vuyst et al., 2007; Kang et al., 2008; Locovei, Wang, et al., 2006). En cambio, se ha reportado que la apertura de los panexones puede ocurrir de forma independiente al Ca<sup>2+</sup> extracelular mediante interacciones proteína-proteína, dado que Panx1 inmunoprecipita en conjunto con los P2X7R (Di Virgilio et al., 2018; Locovei et al., 2007). Sin embargo, los mecanismos específicos que subyacen esta interacción continúan bajo investigación.

Por otro lado, resultados obtenidos en nuestro laboratorio apuntan firmemente a un origen glial del ATP en nuestro modelo de PSH. *Cocultivos WT* de hipocampo fueron tratados con fluoroacetato (FA; 1  $\mu$ M; 15 minutos previo y durante el tratamiento con TTX), un inhibidor del ciclo de Krebs que compromete preferentemente a las células gliales. Mientras que el tratamiento con TTX promovió un aumento tanto en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 como en la densidad de contactos sinápticos, el tratamiento con FA + TTX previno dichos cambios homeostáticos, sugiriendo que el ATP de origen glial es el mediador de los cambios plásticos dependientes de la actividad (Rafael et al., 2020). Una posible vía de liberación sería a través de los hemicanales de Cx43, cuya activación se encuentra cascada arriba a la activación de canales de Panx1,

dado que el tratamiento de c*ocultivos Panx1KO* con GAP19 (péptido mimético bloqueante de hemicanales de Cx43; 300 µM; 15 minutos previo y durante el tratamiento con TTX), previno el ajuste homeostático de la función presináptica, mientras que el tratamiento únicamente con TTX promovió dichos cambios plásticos (Rafael et al., 2020). En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que, a través de hemicanales de Cx43 la glia libera ATP (y quizás otros factores solubles), mediando el ajuste de la fuerza sináptica dependiente de la actividad. Sin embargo, no descartamos un origen neuronal de ATP de menor magnitud como forma de regulación local a nivel de la presinapsis.

En concordancia con nuestros resultados, estudios realizados en la unión neuromuscular de Drosophila demostraron que se producen cambios compensatorios dependiente de la actividad en la concentración de Ca2+ intracelular, modificando la entrada de Ca2+ a través de canales de tipo P/Q (Frank et al., 2006, 2009; Wang et al., 2004). De forma similar, en sinapsis del SNC de vertebrados, la inactividad prolongada del circuito promueve un ajuste compensatorio en la expresión de sinaptotagmina-1, proteína expresada en las vesículas sinápticas. En relación a esto, analizamos cambios en el tamaño del pool de reciclaje de las VS mediante la captación live del anticuerpo anti sinaptotagmina-1, frente al tratamiento prolongado con TTX, en cocultivos WT y glia WT/neuronas Panx1KO. A diferencia del marcaje por inmunocitoquímica contra vGlut1, el marcaje con Stg1 live nos permite analizar sinapsis activas que responden a la estimulación aplicada. Mientras que el tratamiento con TTX en cocultivos WT produce un incremento en el tamaño del pool de VS de reciclaje, reflejado mediante un aumento en la intensidad de fluorescencia asociada a Stg1 (Figura 21), esto no ocurre en cocultivos glia WT/neuronas Panx1KO, reflejando así el rol de estos canales neuronales en la dinámica de las VS. Interesantemente, el tratamiento con BzATP (10µM, 24hs) es suficiente para recuperar el aumento en el tamaño del pool de reciclaje de las VS en cocultivos glia WT/neuronas Panx1KO (Figura 22 G-J), sugiriendo que los canales de Panx1 y los P2X7R modulan conjuntamente la fuerza presináptica luego del tratamiento con TTX. Asimismo, estos resultados se encuentran en concordancia con experimentos realizados en nuestro laboratorio donde se observó que el agregado de MgATP (agonista de los receptores P2X, 500µM, 24-36hs), promueve el ajuste homeostático de la función presináptica en cocultivos glia WT/neuronas Panx1KO, y que la activación de los P2X7R con BzATP (10µM, 24-36hs) era suficiente para inducir dicho ajuste homeostático (Rafael et al., 2020).

En resumen, proponemos que, frente a la inactividad prolongada del circuito, ocurriría un incremento en la concentración extracelular de ATP de origen glial, el cual promovería la activación prolongada de los P2X7R dando lugar a la activación de los canales de Panx1 neuronales, promoviendo una mayor liberación de ATP, y quizás otros factores solubles al medio extracelular. Esto daría lugar a un mecanismo de retroalimentación positiva activando a los P2X7R, y como consecuencia, aumentando la concentración citosólica de Ca<sup>2+</sup>, que a su vez estimularía un aumento en la función presináptica.

# Canales de Panx1 gliales y neuronales contribuyen a la inducción y/o mantenimiento de la PSH mediante ajustes en su actividad

Teniendo en cuenta que los fenómenos de plasticidad están ampliamente relacionados a cambios en la permeabilidad de la membrana a iones y/o metabolitos (Bliss & Collingridge, 2013; Derkach et al., 2007; Izquierdo et al., 2009; Liu & Zukin, 2007; Pacheco et al., 2015), y que no registramos cambios en la abundancia y distribución de canales de Panx1 gliales y neuronales durante la PSH (Rafael et al., 2020), evaluamos si la PSH modula la actividad de los canales de Panx1 neuronales y astrocitarios. Dichos cambios en la actividad de los panexones formarían parte de los mecanismos de regulación para la inducción y/o mantenimiento de la PSH. Es así que evaluamos cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática neuronal y astrocitaria utilizando el ensayo de captación de BrEt.

En primera instancia, se analizó el curso temporal de la inducción de la PSH mediante tratamientos a distintos tiempos con TTX (1µM; 1hs, 2hs, 5hs, 12hs y 24hs) mediante inmunocitoquímica contra vGlut1. Cocultivos sin tratamiento fueron utilizados como control de la función presináptica basal. Se observó un incremento en la abundancia de vGlut1 sináptico luego de 12 y 24hs de tratamiento con TTX (Figura 23). Interesantemente, estos resultados coinciden con un aumento en la captación de BrEt y, por lo tanto, de la permeabilidad de la membrana neuronal de *cocultivos WT* luego de 12 y 24hs de tratamientos cortos con TTX (1hs, 2hs y 5hs) produjeron una disminución en la captación neuronal de BrEt (Figura 24 A-D, & G). En cuanto a la permeabilidad de la membrana astrocitaria, se evidenció una disminución frente a tratamientos cortos con TTX (1hs, 2hs y 5hs); así como luego de 12hs de tratamiento (Figura 24 A-E, & H). Se produjo un aumento en la captación astrocitaria de BrEt únicamente luego de 24hs de tratamiento con TTX (Figura 24 A, F & H).

Frente a la ausencia de canales de Panx1 gliales en los cocultivos *glia Panx1KO/neuronas WT*, fue posible observar que a nivel neuronal tratamientos cortos con TTX (1hs, 2hs y 5hs) no produjeron variaciones significativas en la permeabilidad de la membrana (Figura 25 A-D, & G). Similar a lo ocurrido en *cocultivos WT*, tratamientos prolongados con TTX (12hs y 24hs) generaron un aumento en la captación de BrEt (Figura 25 A, E-G). A nivel astrocitario, persiste la disminución significativa de la captación de BrEt frente a tratamientos cortos con TTX (1hs, 2hs y 5hs), sin embargo, los tratamientos prolongados (12hs y 24hs) no ocasionaron variaciones significativas en la permeabilidad de membrana (Figura 25 A-F & H). Estos resultados sugieren que los panexones gliales promueven una disminución temprana en la permeabilidad de la membrana neuronal, mientras que a nivel astrocitario la modulación de la actividad de los panexones ocurre de forma tardía, siendo estos responsables de una disminución en la permeabilidad de membrana luego de 12 horas de inactividad del circuito, y luego de 24hs de inactividad desencadenan un aumento en la permeabilidad de membrana, en comparación a lo observado en *cocultivos WT*.

Por otro lado, en cocultivos *glia WT/neuronas Panx1KO*, no detectamos variaciones significativas en la captación de BrEt luego de 1-5hs de tratamiento con TTX a diferencia de los *cocultivos WT*, sin embargo, luego de 12-24hs de tratamiento la captación de BrEt disminuyó en vez de aumentar en comparación a los *cocultivos WT* (Figura 26 A-G). En cuanto a la permeabilidad de membrana astrocitaria, no se observaron variaciones significativas luego de 1-5hs de tratamiento con TTX, observándose un aumento en la captación de BrEt a las 12hs y 24hs de tratamiento (Figura 26 A-F & H). Estos hallazgos sugieren que la actividad de los canales de Panx1 neuronales es regulada durante la PSH en forma temprana y tardía, mostrando una disminución de la actividad de los canales a partir de las 12hs de inducción de la PSH.

En base a las observaciones detalladas anteriormente, planteamos el siguiente modelo de transmisión neuroglial de la información (Figura 27): frente al bloqueo de los canales de Na<sup>+</sup> voltaje-dependientes con TTX, las neuronas no son capaces de despolarizarse y provocar la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la terminal presináptica, lo cual es imprescindible para que ocurra la exocitosis de los neurotransmisores contenidos en las VS. Por lo tanto, la concentración de glutamato en la hendidura sináptica disminuye drásticamente. Esta inactividad circuital es sensada por todos los componentes de la sinapsis. Los cambios presinápticos que se inducen frente a este bloqueo crónico de la actividad son, un aumento en la permeabilidad de la Panx1 neuronal, un incremento en la abundancia de
vGlut1 y un aumento en el pool de VS. En conjunto, estas modificaciones determinan un aumento de la función presináptica.



Figura 27: Modelo propuesto de los mecanismos que subyacen el ajuste compensatorio de la función presináptica luego del bloqueo crónico de la actividad.

## Conclusiones

Los hallazgos de este trabajo concluyen que durante el silenciamiento prolongado de la actividad sináptica con TTX:

- 1. La Panx1 expresada tanto en astrocitos como neuronas es esencial para el ajuste de la densidad de contactos sinápticos excitadores.
- La Panx1 neuronal es imprescindible para el ajuste homeostático de la función presináptica.
- **3.** Los canales de Panx1 neuronales modulan la abundancia de Ca<sup>2+</sup> citosólico.
- La panx1 neuronal participa en el aumento compensatorio del pool de vesículas de reciclaje.
- 5. La permeabilidad de los canales de Panx1 gliales y neuronales se modifica durante la inducción y mantenimiento de la PSH, observándose en ambos tipos celulares una disminución temprana de la misma en las primeras horas de inactividad, la cual es seguida por un incremento a partir de las 12hs de tratamiento con TTX.

## Perspectivas a futuro

- 1. Con el fin de continuar caracterizando el rol de los canales de Panx1 frente a los cambios funcionales que se producen en neuronas *in vitro live* durante la PSH, resulta de interés realizar registros del tipo "whole cell patch-clamp" de pares de células que establecen contactos sinápticos en *cocultivos WT* y *glía WT/neuronas Panx1KO*. Esperamos observar un mayor grado de depresión de la amplitud de los mEPSC evocados en *cocultivos WT* tratados con TTX en comparación con cocultivos sin tratamiento. Esperamos obtener resultados similares a los observados en *cocultivos WT* tratados con TTX en los cocultivos *glía WT/neuronas Panx1KO* con y sin tratamiento con TTX, y una recuperación en la amplitud de los mEPSC frente al tratamiento con BzATP.
- 2. Para confirmar que el ATP está siendo liberado al medio extracelular a través de canales de Panx1 neuronales luego de un período prolongado de silenciamiento de la actividad circuital, proponemos medir cambios en la concentración extracelular de ATP mediante la utilización de un kit de bioluminiscencia de luciferin/luciferasa. Esperamos observar un aumento en la concentración extracelular de ATP en *cocultivos WT* tratados con TTX en comparación con cocultivos sin tratamiento. Sin embargo, esperamos que los niveles extracelulares de ATP no sean estadísticamente distintos entre los cocultivos glia WT/neuronas Panx1KO con y sin tratamiento con TTX.
- 3. Con el fin de caracterizar a nivel presináptico si ocurren variaciones en la disponibilidad de Ca<sup>2+</sup>, se utilizará la sonda Syn-GCaMP en *cocultivos WT* y *Glia WT/Neuronas Panx1KO*. Esperamos que los resultados sean idénticos a los obtenidos durante la evaluación del Ca<sup>2+</sup> citosólico, siendo los niveles más altos en *cocultivos WT* tratados de forma crónica con TTX en comparación con *cocultivos WT* control, y que frente a la ausencia de Panx1 neuronal en los cocultivos *Glia WT/Neuronas Panx1KO* dicho incremento de Ca<sup>2+</sup> presináptico no ocurra,

## Bibliografía

- 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(December), 1–24. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00435
- Anselmi, F., Hernandez, V. H., Crispino, G., Seydel, A., Ortolano, 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 Ca 2 signals across the inner ear. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0800793105
- 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(OCT). https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00326
- Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Filho, W. J., Lent, R., & Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, *513*(5), 532–541. https://doi.org/10.1002/cne.21974
- 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
- Barbe, M. T., Monyer, H., & Bruzzone, R. (2006). Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda, Md.), 21*, 103–114. https://doi.org/10.1152/physiol.00048.2005
- Bargiotas, P., Krenz, A., Hormuzdi, S. G., Ridder, D. A., Herb, A., Barakat, W., Penuela, S., von Engelhardt, J., Monyer, H., & Schwaninger, M. (2011).
  Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(51), 20772–20777. https://doi.org/10.1073/pnas.1018262108
- Bats, C., Groc, L., & Choquet, D. (2007). The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron*, *53*(5), 719–734. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.030
- Bennett, M. V. L., & Zukin, R. S. (2004). Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron*, 41(4), 495–511. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14980200
- Bhat, E. A., & Sajjad, N. (2021). Human Pannexin 1 channel: Insight in structure– function mechanism and its potential physiological roles. In *Molecular and Cellular Biochemistry* (Vol. 476, Issue 3, pp. 1529–1540). Springer. https://doi.org/10.1007/s11010-020-04002-3
- Biederer, T., Kaeser, P. S., & Blanpied, T. A. (2017). Transcellular Nanoalignment of Synaptic Function. *Neuron*, 96(3), 680–696. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.006
- Billaud, M., Dahan, D., Marthan, R., Savineau, J. P., & Guibert, C. (2011). Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension. *Respiratory Research*, *12*(1). https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-30

- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (2013). *Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide.* http://www.molecularbrain.com/content/6/1/5
- Boassa, D., Nguyen, P., Hu, J., Ellisman, M. H., & Sosinsky, G. E. (2015). Pannexin2 oligomers localize in the membranes of endosomal vesicles in mammalian cells while Pannexin1 channels traffic to the plasma membrane. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(February), 1–15. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00468
- Bond, S. R., & Naus, C. C. (2014). The pannexins: Past and present. *Frontiers in Physiology*, *5 FEB*(February), 1–25. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00058
- Branco, T., & Staras, K. (2009). The probability of neurotransmitter release: Variability and feedback control at single synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(5), 373–383. https://doi.org/10.1038/nrn2634
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., & Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(23), 13644–13649. https://doi.org/10.1073/pnas.2233464100
- Bunse, S., Locovei, S., Schmidt, M., Qiu, F., Zoidl, G., Dahl, G., & Dermietzel, R. (2009). The potassium channel subunit Kvβ3 interacts with pannexin 1 and attenuates its sensitivity to changes in redox potentials. *FEBS Journal*, *276*(21), 6258–6270. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07334.x

Burrone, J., & Murthy, V. N. (2003). Synaptic gain control and homeostasis. *Current Opinion in Neurobiology*, *13*(5), 560–567. https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.09.007

- Catterall, W. A., & Few, A. P. (2008). Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity. In *Neuron* (Vol. 59, Issue 6, pp. 882–901). https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.005
- Chen, X., Vinade, L., Leapman, R. D., Petersen, J. D., Nakagawa, T., Phillips, T. M., Sheng, M., & Reese, T. S. (2005). Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(32), 11551–11556. https://doi.org/10.1073/pnas.0505359102
- Cheung, G., Chever, O., & Rouach, N. (2014). Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(November), 348. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00348
- Chiu, Y. H., Schappe, M. S., Desai, B. N., & Bayliss, D. A. (2018). Revisiting multimodal activation and channel properties of Pannexin 1. *Journal of General Physiology*, *150*(1), 19–39. https://doi.org/10.1085/jgp.201711888
- Chiu, Y.-H., Schappe, M. S., Desai, B. N., & Bayliss, D. A. (2017). Revisiting multimodal activation and channel properties of Pannexin 1. *The Journal of General Physiology*, 150(1), 19–39. https://doi.org/10.1085/jgp.201711888
- Choquet, D., & Triller, A. (2013). The dynamic synapse. *Neuron*, *80*(3), 691–703. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.013
- Colino, A., Muñoz, J., & Vara, H. (2002). *Plasticidad sináptica a corto plazo. 34*(6), 593–599.
- Collingridge, G. L., Peineau, S., Howland, J. G., & Wang, Y. T. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(7), 459–473. https://doi.org/10.1038/nrn2867

Cooper, L. N., & Bear, M. F. (2012). The BCM theory of synapse modification at 30: Interaction of theory with experiment. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(11), 798– 810. https://doi.org/10.1038/nrn3353

Cristian Justet. (2019). Tesis de Doctorado en Biología.

- Cull-Candy, S. G., Miledi, R., Trautmannt, A., & Uchitel, D. (1980). ON THE RELEASE OF TRANSMITTER AT NORMAL, MYASTHENIA GRAVIS AND MYASTHENIC SYNDROME AFFECTED HUMAN END-PLATES. In *J. Phyeiol* (Vol. 299).
- Dahl, G. (2015). ATP release through pannexon channels. *Philosophical Transactions* of the Royal Society B: Biological Sciences, 370(1672), 20140191. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0191
- Dani, A., Huang, B., Bergan, J., Dulac, C., & Zhuang, X. (2010). Superresolution Imaging of Chemical Synapses in the Brain. *Neuron*, *68*(5), 843–856. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.021
- De Gois, S., Schäfer, M. K.-H., Defamie, N., Chen, C., Ricci, A., Weihe, E., Varoqui, H., & Erickson, J. D. (2005). Homeostatic Scaling of Vesicular Glutamate and GABA Transporter Expression in Rat Neocortical Circuits. *Journal of Neuroscience*, 25(31), 7121–7133. https://doi.org/10.1523/jneurosci.5221-04.2005
- De Vuyst, E., Decrock, E., De Bock, M., Yamasaki, H., Naus, C. C., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2007). Connexin Hemichannels and Gap Junction Channels Are Differentially Influenced by Lipopolysaccharide and Basic Fibroblast Growth Factor. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 34–46. https://doi.org/10.1091/mbc.E06
- Del Castillo, J., & Katz, B. (1954). *Quantal components of the end-plate potential*. 1– 14. papers://c9158030-783e-452e-bf32-463544279105/Paper/p14
- Delvendahl, I., & Müller, M. (2019). Homeostatic plasticity a presynaptic perspective. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 54, pp. 155–162). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.10.003
- Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S., & Soderling, T. R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 8, Issue 2, pp. 101–113). https://doi.org/10.1038/nrn2055
- Di Virgilio, F., Giuliani, A. L., Vultaggio-Poma, V., Falzoni, S., & Sarti, A. C. (2018). Non-nucleotide agonists triggering P2X7 receptor activation and pore formation. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 9, Issue FEB). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00039
- Dityatev, A., & Schachner, M. (2003). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(6), 456–468. https://doi.org/10.1038/nrn1115
- Dobrunz, L. E., & Stevens, C. F. (1997). Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron*, *18*(6), 995–1008. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80338-4
- Dossi, E., Blauwblomme, T., Moulard, J., Chever, O., Vasile, F., Guinard, E., Le Bert, M., Couillin, I., Pallud, J., Capelle, L., Huberfeld, G., & Rouach, N. (2018).
  Pannexin-1 channels contribute to seizure generation in human epileptic brain tissue and in a mouse model of epilepsy. *Science Translational Medicine*, *10*(443), 1–14. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar3796
- Duman, J. G., Mulherkar, S., Tu, Y. K., X. Cheng, J., & Tolias, K. F. (2015).
   Mechanisms for spatiotemporal regulation of Rho-GTPase signaling at synapses.
   In *Neuroscience Letters* (Vol. 601, pp. 4–10). Elsevier Ireland Ltd.
   https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.05.034

- Fernandes, D., & Carvalho, A. L. (2016). Mechanisms of homeostatic plasticity in the excitatory synapse. *Journal of Neurochemistry*, *139*(6), 973–996. https://doi.org/10.1111/jnc.13687
- Flores-Muñoz, C., García-Rojas, F., Pérez, M. A., Santander, O., Mery, E., Ordenes, S., Illanes-González, J., López-Espíndola, D., González-Jamett, A. M., Fuenzalida, M., Martínez, A. D., & Ardiles, Á. O. (2022). The Long-Term Pannexin 1 Ablation Produces Structural and Functional Modifications in Hippocampal Neurons. *Cells*, *11*(22). https://doi.org/10.3390/cells11223646
- Foster, M., & Sherrington, C. S. (1897). A Textbook of Physiology, Part Three: The Central Nervous System.
- Frank, C. A., Kennedy, M. J., Goold, C. P. P., Marek, K. W., & Davis, G. W. W. (2006). Mechanisms Underlying the Rapid Induction and Sustained Expression of Synaptic Homeostasis. *Neuron*, *52*(4), 663–677. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.029
- Frank, C. A., Pielage, J., & Davis, G. W. (2009). A Presynaptic Homeostatic Signaling System Composed of the Eph Receptor, Ephexin, Cdc42, and CaV2.1 Calcium Channels. *Neuron*, 61(4), 556–569. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.028
- Furshpan, B. Y. E. J., & Potter, D. D. (1958). Transmission at the giant motor synapses. *Health (San Francisco)*, *145*, 289–325.
- Gajardo, I., Muñoz, P., Ardiles, Á. O., Flores-Muñoz, C., Lopez-Espíndola, D., Elgueta, C., Estay, C., Salazar, C. S., Gonzalez-Jamett, A. M., & Martínez, A. D. (2018).
  Lack of Pannexin 1 Alters Synaptic GluN2 Subunit Composition and Spatial Reversal Learning in Mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*(April), 1–14. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00114
- Garré, J. M., Retamal, M. A., Cassina, P., Barbeito, L., Bukauskas, F. F., Sáez, J. C., Bennett, M. V. L., Abudara, V., Garre, J. M., Retamal, M. A., Cassina, P., Barbeito, L., Bukauskas, F. F., Saez, 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
- Giansante, G., Marte, A., Romei, A., Prestigio, C., Onofri, F., Benfenati, F., Baldelli, P., & Valente, P. (2020). Presynaptic L-type Ca2+ channels increase glutamate release probability and excitatory strength in the hippocampus during chronic neuroinflammation. *Journal of Neuroscience*, *40*(36), 6825–6841. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2981-19.2020
- Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C. C., & Sáez, J. C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: Properties, pharmacology, and roles. In *Frontiers in Pharmacology: Vol. 4 JUL*. https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00088
- Harris, K. M., & Weinberg, R. J. (2012). *Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain Ultrastructure of Synapses in the*. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005587
- He, Z., Zhao, Y., Rau, M. J., Fitzpatrick, J. A. J., Sah, R., Hu, H., & Yuan, P. (2023). Structural and functional analysis of human pannexin 2 channel. *Nature Communications*, 14(1). https://doi.org/10.1038/s41467-023-37413-z
- Hebb, D. O. (1949). The Organization of Behavior; A Neuropsychological Theory. *The American Journal of Psychology*, *63*(4), 633–642. https://doi.org/10.2307/1418888

- Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. In *GLIA* (Vol. 62, Issue 9, pp. 1377–1391). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/glia.22683
- Herman, M. A., Ackermann, F., Trimbuch, T., & Rosenmund, C. (2014). Vesicular Glutamate Transporter Expression Level Affects Synaptic Vesicle Release Probability at Hippocampal Synapses in Culture. *J Neurosci*, 34(35), 11781– 11791. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1444-14.2014
- Holderith, N., Lorincz, A., Katona, G., Rózsa, B., Kulik, A., Watanabe, M., & Nusser, Z. (2012). Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nature Neuroscience*, *15*(7), 988–997. https://doi.org/10.1038/nn.3137
- Hu, J. H., Park, J. M., Park, S., Xiao, B., Dehoff, M. H., Kim, S., Hayashi, T., Schwarz, M. K., Huganir, R. L., Seeburg, P. H., Linden, D. J., & Worley, P. F. (2010).
  Homeostatic Scaling Requires Group I mGluR Activation Mediated by Homer1a. *Neuron*, 68(6), 1128–1142. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.008
- Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron*, *80*(3), 704–717. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.025
- Hui, E., Bai, J., Wang, P., Sugimori, M., Llinas, R. R., & Chapman, E. R. (2005). Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: Candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0500941102
- 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. In *Channels* (Vol. 8, Issue 2, pp. 118–123). Taylor and Francis Inc. https://doi.org/10.4161/chan.27978
- Izquierdo, M. A., Oliver, D. L., & Malmierca, M. S. (2009). *Mecanismos de plasticidad* (funcional y dependiente de actividad) en el cerebro auditivo adulto y en desarrollo.
- J Plomp, B. J., H Van Kempen, G. T., & Molenaar, P. C. (1992). ADAPTATION OF QUANTAL CONTENT TO DECREASED POSTSYNAPTIC SENSITIVITY AT SINGLE ENDPLATES IN a-BUNGAROTOXIN-TREATED RATS. In *Journal of Physiology* (Vol. 458).
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudespeth, A. J. (2013). *Principles of Neural Science* (Fifth edit).
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., & Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *Journal of Neuroscience*, 28(18), 4702–4711. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008
- Kokona, D., & Thermos, K. (2015). Synthetic and endogenous cannabinoids protect retinal neurons from AMPA excitotoxicity invivo, via activation of CB1 receptors: Involvement of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. *Experimental Eye Research*, *136*, 45–58. https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.05.007
- Lazarevic, V., Schöne, C., Heine, M., Gundelfinger, E. D., & Fejtova, A. (2011). Extensive remodeling of the presynaptic cytomatrix upon homeostatic adaptation to network activity silencing. *Journal of Neuroscience*, *31*(28), 10189–10200. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2088-11.2011

Letellier, M., & Goda, Y. (2023). Astrocyte Calcium Signaling Shifts the Polarity of Presynaptic Plasticity. *Neuroscience*. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.05.032

- Letellier, M., Park, Y. K., Chater, T. E., Chipman, P. H., Gautam, S. G., Oshima-Takago, T., & Goda, Y. (2016). Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(19), E2685-2694. https://doi.org/10.1073/pnas.1523717113
- Lisman, J. E., Raghavachari, S., & Tsien, R. W. (2007). The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(8), 597–609. https://doi.org/10.1038/nrn2191
- Liu, S. J., & Zukin, R. S. (2007). Ca2+-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 30, Issue 3, pp. 126–134). https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.01.006
- Locovei, S., Bao, L., & Dahl, G. (2006). Pannexin 1 in erythrocytes: Function without a gap. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(20), 7655–7659. https://doi.org/10.1073/pnas.0601037103
- Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D. C., & Dahl, G. (2007). Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X7 receptor death complex. *FEBS Letters*, *581*(3), 483–488. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.12.056
- Locovei, S., Wang, J., & Dahl, G. (2006). Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Letters*, *580*(1), 239–244. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.004
- Loewi, O., & Navratil, E. (1924). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung - VII. Mitteilung. *Pflügers Archiv Für Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere*, 206(1), 135–140. https://doi.org/10.1007/BF01722758
- 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
- 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), 1–17. https://doi.org/10.3390/ijms21239180
- Louros, S. R., Hooks, B. M., Litvina, L., Carvalho, A. L., & Chen, C. (2014). A role for stargazin in experience-dependent plasticity. *Cell Reports*, 7(5), 1614–1625. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.054
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(6), 1–15. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710
- 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. https://doi.org/10.1124/jpet.108.146365
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1), 5–21. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012

- Man Heng-Ye; Wang Qinhua; Lu Wei-Yang; Ju William; Ahmadian Gholamreza; Liu Lidong; D'Souza Sandra; Wong T. P.; Taghibiglou C.; Lu Jie; Wymann Matthias P.; MacDonald John F.; Wang Yu Tian. (2003). *Activation of PI3-Kinase Is Required for AMPA Receptor Insertion during LTP of mEPSCs in Cultured Hippocampal Neurons*.
- Müller, M., & Davis, G. W. (2012). Transsynaptic control of presynaptic Ca 2+ influx achieves homeostatic potentiation of neurotransmitter release. *Current Biology*, 22(12), 1102–1108. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.018
- Muller, M., Liu, K. S. Y., Sigrist, S. J., & Davis, G. W. (2012). RIM Controls Homeostatic Plasticity through Modulation of the Readily-Releasable Vesicle Pool. *Journal of Neuroscience*, 32(47), 16574–16585. https://doi.org/10.1523/jneurosci.0981-12.2012
- Müller, M., Liu, K. S. Y., Sigrist, S. J., & Davis, G. W. (2012). RIM controls homeostatic plasticity through modulation of the readily-releasable vesicle pool. *Journal of Neuroscience*, 32(47), 16574–16585. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0981-12.2012
- Müller, M., Pym, E. C. G., Tong, A., & Davis, G. W. (2011). Rab3-GAP Controls the Progression of Synaptic Homeostasis at a Late Stage of Vesicle Release. *Neuron*, 69(4), 749–762. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.025
- Murthy, V. N. (1998). Synaptic plasticity : Step-wise strengthening. 650-653.
- Murthy, V. N., Schikorski, T., Stevens, C. F., Zhu, Y., & Jolla, L. (2001). Inactivity produces increases in Neurotransmitter Release and Synapse Size. *Neuron*, *32*, 673–682.
- Murthy, V. N., Sejnowski, T. J., & Stevens, C. F. (1997). Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron*, *18*(4), 599–612. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80301-3
- Mutch, S. M., Chiu, D. T., Lorenz, R. M., Schiro, P. G., Fujimoto, B. S., Mutch, S. A., Kuo, J. S., Gadd, J. C., Kensel-Hammes, P., Allen, R. W., & Kuyper, C. L. (2011).
  Protein Quantification at the Single Vesicle Level Reveals That a Subset of Synaptic Vesicle Proteins Are Trafficked with High Precision. *Journal of Neuroscience*, *31*(4), 1461–1470. https://doi.org/10.1523/jneurosci.3805-10.2011
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo — Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo — SuppoNimmerjahn, Axel, Frank Kirchhoff, and Fritjof Helmchen. 2005. "Resting Micr. Science, 308(May), 1314–1319. https://doi.org/10.1126/science.1110647
- North, R. A. (2002). *Molecular Physiology of P2X Receptors*. https://doi.org/10.1152/physrev.00015
- Orellana, J. A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J. X., Bennett, M. V. L., Naus, C. C., Giaume, C., & Sáez, J. C. (2011). 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.x
- 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. *Antioxidants & Redox Signaling*, *11*(2), 369–399. https://doi.org/10.1089/ars.2008.2130

Pacheco, C. R., Morales, C. N., Ramírez, A. E., Muñoz, F. J., Gallegos, S. S., Caviedes, P. A., Aguayo, L. G., & Opazo, C. M. (2015). Extracellular α-synuclein alters synaptic transmission in brain neurons by perforating the neuronal plasma membrane. *Journal of Neurochemistry*, *132*(6), 731–741. https://doi.org/10.1111/jnc.13060

Palacios-Prado, N., Soto, P. A., Lopez, X., Ju Choi, E., Marquez-Miranda, V., Rojas, M., Duarte, Y., Lee, J., Gonzalez-Nilo, F. D., & Saez, J. C. (2022). Endogenous pannexin1 channels form functional intercellular cell-cell channels with characteristic voltage-dependent properties. https://doi.org/10.1073/pnas

Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., & Lukyanov, S. (2000). *A ubiquitous family of putative gap junction molecules*.

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

Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Takano, H., Moss, S. J., McCarthy, K., & Haydon, P. G. (2005). Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science*, *310*(5745), 113– 116. https://doi.org/10.1126/science.1116916

Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO Journal*, *25*(21), 5071–5082. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378

Penuela, S., Harland, L., Simek, J., & Laird, D. W. (2014). Pannexin channels and their links to human disease. *Biochemical Journal*, *461*(3), 371–381. https://doi.org/10.1042/BJ20140447

Penuela, S., Lohman, A. W., Lai, W., Gyenis, L., Litchfield, D. W., Isakson, B. E., & Laird, D. W. (2014). Diverse post-translational modifications of the pannexin family of channel-forming proteins. *Channels*, 8(2), 124–130. https://doi.org/10.4161/chan.27422

Perea, G., & Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science (New York, N.Y.)*, *317*(5841), 1083–1086. https://doi.org/10.1126/science.1144640

Perea, G., & Araque, A. (2010). GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Research Reviews*, *63*(1–2), 93–102. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.10.005

Pereda, A. E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(4), 250–263. https://doi.org/10.1038/nrn3708

Perez de Arce, K., Schrod, N., Metzbower, S. W. R., Allgeyer, E., Kong, G. K. W., Tang, A. H., Krupp, A. J., Stein, V., Liu, X., Bewersdorf, J., Blanpied, T. A., Lucić, V., & Biederer, T. (2015). Topographic Mapping of the Synaptic Cleft into Adhesive Nanodomains. *Neuron*, *88*(6), 1165–1172. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.011

Pozo, K., & Goda, Y. (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, *66*(3), 337–351. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.028

Prochnow, N., Abdulazim, A., Kurtenbach, S., Wildf??rster, V., Dvoriantchikova, G., Hanske, J., Petrasch-Parwez, E., Shestopalov, V. I., Dermietzel, R., Manahan-Vaughan, D., & Zoidl, G. (2012). Pannexin1 Stabilizes Synaptic Plasticity and Is Needed for Learning. PLoS ONE, 7(12).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051767

- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2004). *Neuroscience* (Third edit). https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000154473.43364.47
- 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*. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12035-020-01919-0
- Rátkai, A., Tárnok, K., Aouad, H. El, Micska, B., Schlett, K., & Szücs, A. (2021).
   Homeostatic plasticity and burst activity are mediated by hyperpolarizationactivated cation currents and T-type calcium channels in neuronal cultures. *Scientific Reports*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-021-82775-3
- Rizzoli, S. O., & Betz, W. J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nature Reviews. Neuroscience*, *6*(1), 57–69. https://doi.org/10.1038/nrn1583
- Sanchez-arias, J. C., Swayne, A., Liu, M., Choi, C. S. W., Ebert, S. N., & Brown, C. E. (2019). Pannexin 1 Regulates Network Ensembles and Dendritic Spine Development in Cortical Neurons. *ENeuro*, 6(June).
- Santiago, M. F., Veliskova, J., Patel, N. K., Lutz, S. E., Caille, D., Charollais, A., Meda, P., & Scemes, E. (2011). Targeting pannexin1 improves seizure outcome. *PLoS ONE*, 6(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025178
- Scemes, E., Velíšek, L., & Velíšková, J. (2019). Astrocyte and Neuronal Pannexin1 Contribute Distinctly to Seizures. ASN Neuro, 11. https://doi.org/10.1177/1759091419833502
- Shan, Y., Ni, Y., & Gao, Z. (2020). Pannexin-1 Channel Regulates ATP Release in Epilepsy. *Neurochemical Research*, *45*(5), 965–971. https://doi.org/10.1007/s11064-020-02981-9
- Shestopalov, V. I., & Panchin, Y. (2008). Pannexins and gap junction protein diversity. Cellular and Molecular Life Sciences, 65(3), 376–394. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7200-1
- Silbereis, J. C., Pochareddy, S., Zhu, Y., Li, M., & Sestan, N. (2016). The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron*, *89*(2), 248. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.008
- Stan, A., Pielarski, K. N., Brigadski, T., Wittenmayer, N., Fedorchenko, O., Gohla, A., Lessmann, V., Dresbach, T., & Gottmann, K. (2010). Essential cooperation of Ncadherin and neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 11116–11121. https://doi.org/10.1073/pnas.0914233107
- Steinmetz, C. C., & Turrigiano, G. G. (2010a). TNFapIha signaling maintaind the ability of cortical synapses to express syanptic scaling. *Journal of Neuroscience*, 30(44), 14685–14690. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2210-10.2010.TNF
- Steinmetz, C. C., & Turrigiano, G. G. (2010b). Tumor Necrosis Factor- Signaling Maintains the Ability of Cortical Synapses to Express Synaptic Scaling. *Journal of Neuroscience*, 30(44), 14685–14690. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2210-10.2010
- Stellwagen, D., & Malenka, R. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature*, *440*(7087), 1054–1059.

- Suadicani, S. O., Brosnan, C. F., & Scemes, E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca2+ signaling. *Journal of Neuroscience*, 26(5), 1378–1385. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3902-05.2006
- Suadicani, S. O., Iglesias, R., Wang, J., Dahl, G., Spray, D. C., & Scemes, E. (2012). ATP signaling is deficient in cultured pannexin1-null mouse astrocytes. *Glia*, *60*(7), 1106–1116. https://doi.org/10.1002/glia.22338
- Südhof, T. C. (2004). The Synaptic Vesicle Cycle. *Annu. Rev. Neurosci*, 27, 509–547. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412
- Südhof, T. C. (2012a). Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(1). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011353
- Südhof, T. C. (2012b). The presynaptic active zone. *Neuron*, 75(1), 11–25. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012
- Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, *80*(3), 675–690. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022
- Südhof, T. C., & Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(12). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005637
- Südkamp, N., Shchyglo, O., & Manahan-Vaughan, D. (2021). Absence of Pannexin 1 Stabilizes Hippocampal Excitability After Intracerebral Treatment With Aβ (1-42) and Prevents LTP Deficits in Middle-Aged Mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13. https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.591735
- Swayne, L. A., Sorbara, C. D., & Bennett, S. A. L. (2010). Pannexin 2 is expressed by postnatal hippocampal neural progenitors and modulates neuronal commitment. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24977–24986. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.130054
- Tang, Y., Nyengaard, J. R., De Groot, D. M. G., & Gundersen, H. J. G. (2001). Total regional and global number of synapses in the human brain neocortex. *Synapse*, *41*(3), 258–273. https://doi.org/10.1002/syn.1083
- Thanawala, M. S., & Regehr, W. G. (2013). Presynaptic calcium influx controls neurotransmitter release in part by regulating the effective size of the readily releasable pool. *Journal of Neuroscience*, *33*(11), 4625–4633. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4031-12.2013
- Thiagarajan, T. C., Lindskog, M., & Tsien, R. W. (2005). Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron*, *47*(5), 725–737. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.037
- Thompson, R. J. (2006). Ischemia Opens Neuronal Gap Junction Hemichannels. *Science*, *312*(5775), 924–927. https://doi.org/10.1126/science.1126241
- Thompson, 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 (New York, N.Y.)*, *322*(5907), 1555–1559. https://doi.org/10.1126/science.1165209
- Tolias, K. F., Duman, J. G., & Um, K. (2011). Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 94, Issue 2, pp. 133–148). https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.04.011
- Turrigiano, G. G. (2008). The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses. *Cell*, *135*(3), 422–435. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.008

- Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2000). Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, *10*(3), 358–364. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00091-X
- Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat.Rev.Neurosci*, *5*(2), 97–107. https://doi.org/10.1038/nrn1327
- Vasseur, M. Le, Lelowski, J., Bechberger, J. F., Sin, W. C., & Naus, C. C. (2014). Pannexin 2 protein expression is not restricted to the CNS. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(NOV). https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00392
- Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2014). Astroglial cradle in the life of the synapse. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1654). https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0595
- Vitureira, N., & Goda, Y. (2013). The interplay between hebbian and homeostatic synaptic plasticity. *Journal of Cell Biology*, *203*(2), 175–186. https://doi.org/10.1083/jcb.201306030
- Vitureira, N., Letellier, M., White, I. J., & Goda, Y. (2011). Differential control of presynaptic efficacy by postsynaptic N-cadherin and β-catenin. *Nature Neuroscience*, *15*(1), 81–89. https://doi.org/10.1038/nn.2995
- Vogt, A., Hormuzdi, S. G., & Monyer, H. (2005). Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Molecular Brain Research*, 141(1), 113– 120. https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.08.002
- Wang, X., Engisch, K. L., Li, Y., Pinter, M. J., Cope, T. C., & Rich, M. M. (2004). Decreased synaptic activity shifts the calcium dependence of release at the mammalian neuromuscular junction in vivo. *Journal of Neuroscience*, *24*(47), 10687–10692. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2755-04.2004
- Wang, X., Wang, Q., Engisch, K. L., & Rich, M. M. (2010). Activity-dependent regulation of the binomial parameters p and n at the mouse neuromuscular junction in vivo. *Journal of Neurophysiology*, *104*(5), 2352–2358. https://doi.org/10.1152/jn.00460.2010
- Weilinger, N. L., Maslieieva, V., Bialecki, J., Sridharan, S. S., Tang, P. L., & Thompson, R. J. (2013). Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(1), 39–48. https://doi.org/10.1038/aps.2012.95
- Weilinger, N. L., Tang, P. L., & Thompson, R. J. (2012). Anoxia-Induced NMDA Receptor Activation Opens Pannexin Channels via Src Family Kinases. *Journal of Neuroscience*, 32(36), 12579–12588. https://doi.org/10.1523/jneurosci.1267-12.2012
- Wicki-Stordeur, L. E., & Swayne, L. A. (2013). Panx1 regulates neural stem and progenitor cell behaviours associated with cytoskeletal dynamics and interacts with multiple cytoskeletal elements. *Cell Communication and Signaling*, *11*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-62
- Wierenga, C. J., Walsh, M. F., & Turrigiano, G. G. (2006). Temporal Regulation of the Expression Locus of Homeostatic Plasticity. *Journal of Neurophysiology*, 96(4), 2127–2133. https://doi.org/10.1152/jn.00107.2006
- Wilson, N. R., Kang, J., Hueske, E. V., Leung, T., Varoqui, H., Murnick, J. G., Erickson, J. D., & Liu, G. (2005). Presynaptic Regulation of Quantal Size by the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1. *Journal of Neuroscience*, 25(26), 6221–6234. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3003-04.2005

- Wojcik, S. M., Rhee, J. S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N., & Rosenmund, C. (2004). An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 7158–7163. https://doi.org/10.1073/pnas.0401764101
- Wu, X., Hu, S., Kang, X., & Wang, C. (2020). Synaptotagmins: Beyond Presynaptic Neurotransmitter Release. *Neuroscientist*, 26(1), 9–15. https://doi.org/10.1177/1073858419844497
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., & Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends in Immunology*, 36(10), 605–613. https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.008
- Xie, Z., Long, J., Liu, J., Chai, Z., Kang, X., & Wang, C. (2017). Molecular mechanisms for the coupling of endocytosis to exocytosis in neurons. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 10). Frontiers Research Foundation. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00047
- Xing, C., Wang, X., Cheng, C., Montaner, J., Mandeville, E., Leung, W., Van Leyen, K., Lok, J., Wang, X., & Lo, E. H. (2014). Neuronal production of lipocalin-2 as a helpme signal for glial activation. *Stroke*, *45*(7), 2085–2092. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005733
- Xu, J., Mashimo, T., & Südhof, T. C. (2007). Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca2+ Sensors for Fast Release that Specify Distinct Presynaptic Properties in Subsets of Neurons. *Neuron*, *54*(4), 567–581. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.004
- Xu, J., Pang, Z. P., Shin, O. H., & Südhof, T. C. (2009). Synaptotagmin-1 functions as a Ca2+ sensor for spontaneous release. *Nature Neuroscience*, 12(6), 759–766. https://doi.org/10.1038/nn.2320
- Yao, J., Kwon, S. E., Gaffaney, J. D., Dunning, F. M., & Chapman, E. R. (2012).
   Uncoupling the roles of synaptotagmin i during endo-and exocytosis of synaptic vesicles. *Nature Neuroscience*, *15*(2), 243–249. https://doi.org/10.1038/nn.3013
- Yin, J., & Yuan, Q. (2015). Structural homeostasis in the nervous system: A balancing act for wiring plasticity and stability. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(JAN), 1– 8. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00439
- Zhao, C. J., Dreosti, E., & Lagnado, L. (2011). Homeostatic synaptic plasticity through changes in presynaptic calcium influx. *Journal of Neuroscience*, *31*(20), 7492– 7496. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6636-10.2011
- Zoidl, G., Petrasch-Parwez, E., Ray, A., Meier, C., Bunse, S., Habbes, H. W., Dahl, G., & Dermietzel, R. (2007). Localization of the pannexin1 protein at postsynaptic sites in the cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience*, *146*(1), 9–16. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.061