



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas Programa de Desarrollo de
las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

“Efectos de la deprivación sensorial en pericitos
pericapilares corticales:
plasticidad de la interfaz neuro-vascular
dependiente de la experiencia en la corteza
somato-sensorial del ratón”

Orientadora: Verónica Abudara, PhD

Maestrando: Virginia Marset

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina - Universidad de la República

Tribunal: Dres. Sebastián Curti,
Francesco Rossi y Javier Nogueira.

Índice de contenidos

1. <u>Resumen</u>	
2. <u>Introducción</u>	
A. Plasticidad neuronal dependiente de la experiencia	Página 06
B. Corteza Somato Sensoria	Página 08
C. Plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza somato-sensorial... ..	Página 10
D. Plasticidad vascular dependente de la experiencia	Página 11
E. Plasticidad Neurovascular dependiente de la experiencia durante el desarrollo	Página 13
F. Mecanismos moleculares de la plasticidad dependiente de la experiencia.....	Página 16
G. Acoplamiento y Unidad Neuro-Vascular.....	Página 17
H. Los Pericitos	Página 19
I. Hemicanales de membrana	Página 21
J. Panexina1.....	Página 22
K. Los pericitos cerebrales expresan canales funcionales formados por Panexina1.....	Página 24
3. <u>Hipótesis de trabajo</u>	
.....	Página 27
4. <u>Objetivos</u>	
A. General.....	Página 27
B. Específicos... ..	Página 27
5. <u>Metodología</u>	Página 28

6. <u>Resultados</u>	
A. Identificación de los pericitos pericapilares y de la red microvascular en la capa IV de la corteza somato-sensorial (CxSS) del ratón.....	Página 38
B. Los pericitos pericapilares de la corteza somato-sensorial del ratón se inmunomarcán para panexina1	Página 43
C. Los pericitos pericapilares de la corteza somato-sensorial interactúan con el fluido cerebral circundante en condiciones in vivo a través de una vía mediada por la panexina1	Página 46
D. La entrada sensorial remodela la comunicación de los pericitos con el exterior mediante la panexina1 en la CxSS	Página 48
E. La comunicación pericitaria mediada por la panexina1 y su regulación por la entrada sensorial son dependientes del desarrollo siendo mayores a edad temprana	Página 51
F. La regulación de la comunicación pericitaria mediada por la Panx1 depende de la duración de la deprivación sensorial	Página 55
G. La deprivación sensorial determina cambios a nivel del metabolismo en los barriles de la capa IV de la CxSS	Página 58
7. <u>Discusión</u>	Página 61
8. <u>Conclusiones</u>	Página 71
9. <u>Bibliografía</u>	Página 74

RESUMEN

La experiencia modela los circuitos neuronales y vasculares del cerebro durante el desarrollo y el aprendizaje, proceso conocido como plasticidad neurovascular dependiente de la experiencia. En la interface neuro vascular, los pericitos pericapilares se relajan activamente durante la actividad cerebral para aumentar el flujo sanguíneo local incrementando así el intercambio metabólico a través de la barrera hematoencefálica. Resultados previos del laboratorio indican que los pericitos del hipocampo se comunican con su microentorno a través de canales de panexina1 (panexones) y que esta interacción es actividad-dependiente. El objetivo de este proyecto es determinar los efectos de la deprivación sensorial sobre el intercambio pericito-medio cerebral dependiente de panexones en la corteza somato-sensorial del ratón (CxSS).

En la capa IV de la CxSS, identificamos los pericitos pericapilares, mediante el marcador fluorescente TO-PRO-3. Utilizando la técnica de captación de bromuro de etidio (BrEtd), colorante que permea los panexones, en rodajas cerebrales agudas en condición *ex vivo* y en el animal despierto *in vivo* en condición de comportamiento libre (P21-P30) determinamos que los pericitos pericapilares de la CxSS interactúan con el fluido extracelular por intermedio de la panexina1 (Panx1). Mediante inmunofluorescencia, determinamos que los pericitos de la corteza somato-sensorial expresan la Panx1 en la membrana pericitaria. El intercambio entre el pericito y el entorno cerebral, mediado por hemicanales formados de Panx1 (Panx1HCs), mostró una dependencia al desarrollo, siendo más prominente en edades tempranas, lo cual concuerda con la mayor expresión de la proteína. La deprivación sensorial unilateral táctil (sección de vibrisas) resultó en un aumento en la actividad de los Panx1HCs en los pericitos de la CxSS del lado deprivado (izquierdo) y una disminución de la actividad de estos canales en la CxSS contralateral (derecha). Estos cambios en la actividad de los Panx1HCs dependieron tanto del desarrollo como de la duración de la deprivación, siendo los efectos más pronunciados en etapas tempranas.

Específicamente, en los barriles de la CxSS del lado deprivado (izquierdo) se observó una

reducción en la actividad metabólica en los barriles, mientras que en el lado contralateral (derecho) se observó un aumento de este parámetro.

Concluimos que los pericitos de la CxSS expresan la Panx1 y que la experiencia sensorial modifica la comunicación entre los pericitos y su entorno extracelular a través de cambios en la actividad de los Panx1HCs. Estas modificaciones están relacionadas con el desarrollo y se asocian a variaciones en la actividad metabólica neuronal. Postulamos que la regulación de la actividad de los Panx1HCs (vías para liberar ATP) por la experiencia podría afectar el tono contráctil de los pericitos, influyendo así en el diámetro capilar y el flujo sanguíneo cerebral en la capa IV de la CxSS. En futuros estudios, planeamos investigar cómo la deprivación sensorial unilateral podría afectar la fisiología microvascular y el acoplamiento neurovascular en este modelo.

INTRODUCCIÓN

1. PLASTICIDAD NEURONAL DEPENDIENTE DE LA EXPERIENCIA

La plasticidad neuronal dependiente de la experiencia (PDE) es una propiedad relevante para el individuo, que permite madurar y perfeccionar circuitos neuronales durante el desarrollo en base al aumento o la disminución de la actividad neuronal (Sims y cols., 2015). Se denomina plasticidad a la capacidad del sistema nervioso a reorganizarse estructural y funcionalmente, en respuesta a un estímulo (Cotman y Nieto-Sampedro, 1984). La plasticidad dependiente de la experiencia (PDE) refiere a los cambios anátomo-funcionales del sistema nervioso generados a partir de la experiencia y la actividad del individuo que permiten su supervivencia (Fox 1992). En este sentido, la PDE implica que las conexiones sinápticas puedan fortalecerse o debilitarse en función de la estimulación y la actividad que experimenta un ser vivo y refleja la capacidad de adaptación y aprendizaje continuo del cerebro a lo largo de la vida. Esto puede incluir el aprendizaje de nuevas habilidades, la adquisición de conocimiento, la recuperación de una lesión cerebral y la adaptación a cambios en el entorno.

Si bien la organización inicial de los circuitos está determinada por factores genéticos, los mismos irán madurando en función de las modificaciones del entorno. Los comportamientos innatos en el individuo están condicionados por la herencia genética a través de la selección natural y reflejan las adaptaciones de la especie al ambiente. De todas formas, en la etapa postnatal temprana, el individuo modificará esos circuitos en función de su propia experiencia (Revisado en Sanes 2009).

Diversos han sido los trabajos que reportan cambios anátomo - funcionales frente a la privación sensorial, clásico modelo de investigación de la PDE, habiéndose estudiado en varias modalidades sensoriales. Hubel y Wiesel fueron los primeros en demostrar los cambios dependientes de la experiencia en la corteza visual de gatos (Hubel y Wiesel, 1963). En esta tesis, se optará trabajar en la corteza somato-sensorial (CxSS) debido a que es un sistema ideal para el estudio de los cambios estructurales y funcionales de la

actividad sináptica, y su manipulación es accesible (Brecht, 2012; Lübke y Feldmeyer, 2007; Petersen, 2007; Schubert y cols., 2007; Fox, 2008; Kanold y Luhmann 2010).

La plasticidad neuronal puede ocurrir a lo largo de toda la vida, aunque es más prominente durante los períodos críticos del desarrollo (Glazewski y cols., 1996; Fox y cols., 1992). El período crítico (PC) es definido como el momento en el cual los circuitos neurales son lo suficientemente sensibles al cambio frente a un estímulo como para responder remodelándose en función de dicho estímulo o experiencia (Erzurumlu y Gaspar 2012). Durante este período, la relación entre sinapsis excitatorias (E) e inhibitorias (I) es crucial, siendo el balance positivo del cociente $[E/I]$ (mayor sinápsis excitatorias respecto a las inhibitorias), determina la mayor sensibilidad al cambio en función del ambiente. A nivel de la corteza visual, la inhibición GABAérgica juega un rol crucial en el remodelado de los campos receptivos, durante el desarrollo y al inicio de la maduración del sistema (Sale, 2010). El desarrollo de la inhibición GABAérgica promueve la maduración, y con ello, la estabilización del sistema (Huang y cols., 1999). Asimismo, se ha vinculado el incremento del tono GABAérgico con la mayor expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en ratones. Manipulando la relación entre sinapsis excitatorias/inhibitorias de forma favorable, se ha inducido un mayor potencial plástico en la corteza visual (He y cols., 2007; Harauzov y cols., 2010). Posibles candidatos mediadores ya estudiados han sido la norepinefrina, la acetilcolina y la serotonina (Maya Vetencourt y cols, 2008). Asimismo, en un ambiente enriquecido, mediante el trasplante de atrociitos o factores tales como, el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) y el Factor Promotor del crecimiento de Neuritas (NgR), se evidenció una potenciación en la capacidad plástica de la corteza visual (Bavelier y cols, 2010).

Como ya se mencionó en la introducción, durante el periodo prenatal, el desarrollo de la corteza es dependiente de la expresión genética, e independiente de la actividad eléctrica (Rash y Grove, 2006). Sin embargo, posterior a este período, los primeros circuitos neuronales son modulados por la actividad neuronal y los sistemas de neuromodulación (Khazipov y Luhmann, 2006; Allene y Cossart, 2010).

2. Corteza Somato-Sensorial (CxSS)

El sistema táctil de los roedores consta de una representación somatotópica que se inicia desde las vibrisas hasta la corteza somato-sensorial (Feldmeyer y cols., 2013). Desde la periferia, la vía inicia con las fibras aferentes primarias que invierten el folículo de la vibrisa. Los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales se encuentran en el ganglio del trigémino (V par craneano), desde ahí proyectan a los núcleos del trigémino en el tronco encefálico (el núcleo principal, y los núcleos oralis, interpolaris y caudalis). En estos núcleos, la organización somatotópica se mantiene, así, la representación de las vibrisas se constituye como subunidades arquitectónicas o “barrelettes” (Feldmeyer y cols., 2013; Erzurumlu y Gaspar 2013). Los axones de las neuronas localizadas en el tronco encefálico se decusan hacia los núcleos del tálamo contralateral (núcleo ventroposterior-medial y orden superior de los núcleos posteriores). En el tálamo, la organización adopta la configuración de “barreloides”. El cuarto relevo se encuentra a nivel cortical, donde los axones de las neuronas talámicas proyectan hacia las neuronas estrelladas de la capa IV de la corteza somatosensorial. La organización anatómica de la CxSS se dispone en forma de columnas, con capas que van desde la I-IV. La capa IV de la CxSS está organizada de forma somatotópica, en donde cada vibrisa está representada por una “*barrel*”, o barril, denominado así por la disposición de los somas neuronales que configura una imagen similar a un barril; dichos barriles están separados entre sí por los septum (Woolsey, 1978).

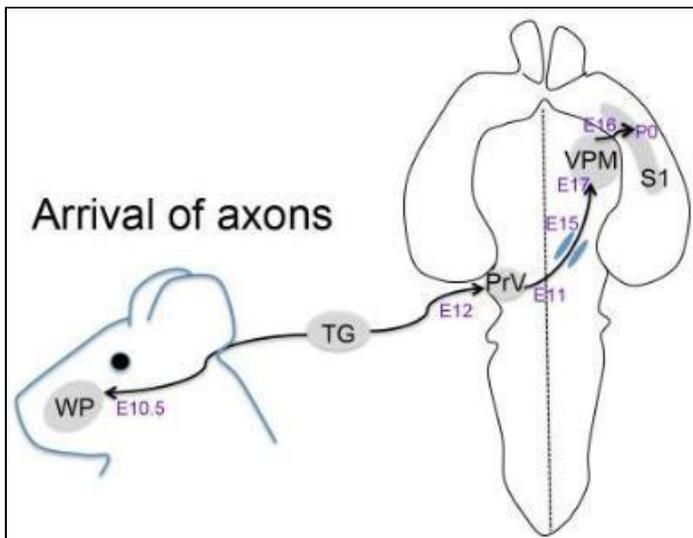


Figura 1 - Vía somatosensorial en el ratón durante el desarrollo. En la figura se ilustra el desarrollo de la vía somatosensorial, desde el día 10.5 embrionario (E10.5) con el desarrollo de las vibrisas (WP), proyección al Trigémino (TG); en el E12 al núcleo sensorial principal del nervio trigémino (PrV), decusación de la vía durante el día 11-17 embrionario a núcleos talámicos contralaterales. Proyección desde el núcleo ventroposteromedial (VPM) a la corteza somatosensorial primaria. (Adaptado de Erzurumlu y Gaspar 2013)

El período postnatal temprano, que comprende la primera semana postnatal, corresponde al desarrollo cortical (Fox, 2008). Durante esta primera semana, la corteza es dependiente del estímulo externo (Fox, 1992) y la capa más sensible es la IV (Woolsey y Wann 1976; Fox, 2002) lo cual hace que el modelo utilizado sea óptimo para el estudio de la PDE. Durante la primera semana postnatal, se establecen interacciones subtalámicas con la CxSS, las cuales presentan una dependencia de la actividad sináptica. Estas interacciones son las que formarán la distribución neuronal en la CxSS, más precisamente en forma de columnas en la capa IV de la misma, denominados “barriles” (200-400 μm en dimensión horizontal) como se explicó anteriormente (Yang y cols., 2009; Sun y Luhmann 2007). Al finalizar la primera semana postnatal, la plasticidad en la capa IV se ve disminuida, predominando en las II, III y V (Diamond y cols, 1994; Fox, 1992).

3. Plasticidad dependiente de la experiencia en la Corteza Somato-Sensorial

En la corteza somato-sensorial, la citoarquitectura neuronal está sujeta a un elevado grado de plasticidad durante el periodo crítico, y es fácilmente manipulable desde la periferia (Harris y Woolsey, 1981), lo cual hace que sea un buen modelo para el estudio de la PDE, como ya mencionáramos. Así, la deprivación sensorial táctil unilateral mediante la supresión de vibrisas a nivel periférico representa un modelo paradigmático para el estudio de la PDE, dado que los microcircuitos corticales son bien comprendidos; a cada vibrisa periférica le corresponde un campo receptivo a nivel cortical (Feldmeyer y cols., 2012; Woolsey y cols., 1981). El conocimiento de esta representación somatotópica sensorial es estratégico para el estudio de la PDE. Adicionalmente, los reportes sobre la PDE son numerosos en este modelo el cual permite caracterizar la plasticidad tanto frente a la inhibición sensorial táctil periférica por privación de la entrada sensorial como frente a un aumento de su estimulación.

La deprivación de la entrada sensorial unilateral mediante la sección/supresión de las vibrisas altera el campo receptivo a nivel cortical en la corteza somato-sensorial (Simons y Land 1987; Fox 1992; Merzenich y cols., 1983; Kossut y Hand 1984). A las 24 horas de deprivación, en las capas II y III de la corteza somato-sensorial también se evidencia una disminución del campo receptivo (Barth y cols., 2000; Stern y cols., 2001). En diseños experimentales en los cuales se remueve de forma parcial las vibrisas (recorte de una única vibrisa) y se estudia la actividad neural en la CxSS, se ha demostrado un incremento de la actividad neuronal en los campos receptivos de las vibrisas vecinas a la removida (Diamond y cols., 1993; Simons y Land 1994; Wallace y Fox 1999). La supresión de vibrisas de ratones, induce una reducción de las espinas sinápticas en la corteza somato-sensorial contralateral (Lendvai y cols., 2000; Glazewski y cols., 2014). Frente a la deprivación sensorial unilateral en ratones, se han evidenciado cambios en la inervación axonal contralateral, a nivel del sistema nervioso central; en relación a esto, se ha postulado que lo necesario es el balance de la entrada sensorial de una corteza respecto a la otra (Suárez y cols. 2014).

4. PLASTICIDAD VASCULAR DEPENDIENTE DE LA EXPERIENCIA

En 1990, se introduce el concepto de *plasticidad vascular dependiente de la actividad*, definiéndola como el conjunto de cambios a nivel de la vasculatura producto de los mayores requerimientos metabólicos en determinada área cerebral (Black y cols., 1991).

La interacción entre los sistemas nervioso y vascular es fundamental durante el desarrollo, debido a que, el desarrollo del segundo, permite un adecuado aporte metabólico para el desarrollo del primero (Suchting y cols., 2006; Segarra y cols., 2019). Se sabe que el desarrollo vascular y axonal están vinculados tanto por la disposición, como también por moléculas guía que orientan la arquitectura funcional (Suchting y cols., 2006). En un ratón recién nacido (P0) no se detectan axones de neuronas en la corteza, pero sí la vasculatura. La actividad neuronal promueve la formación de la vasculatura en la corteza somato-sensorial (Lacoste y cols., 2014). Entre P03-P05, la vasculatura continúa expandiéndose y organizándose en los barriles (Lacoste y cols., 2014).

La conectividad neural continúa remodelándose luego del nacimiento, y este proceso se acompaña de una remodelación vascular (Lacoste y cols., 2014). En P0, el lecho capilar es disperso e incompleto (Coelho-Santos y Shih, 2019; Harb y cols., 2012). Se ha demostrado que, durante el *desarrollo vascular*, la densidad vascular y las ramificaciones van incrementándose hasta P14, para luego comenzar a disminuir y estabilizarse a la edad de P30 (Lacoste y cols., 2014). El nacimiento de un nuevo vaso se puede efectuar de dos formas, por vasculogénesis o angiogénesis. La vasculogénesis es el proceso por el cual un nuevo vaso es formado *de novo*, a partir de un angioblasto; mientras que la angiogénesis es el crecimiento de un vaso a partir de uno previamente formado, e implica la ramificación. En roedores, la vascularización se inicia con la formación del plexo perineural el 7,5-8,5 día embrionario (Coelho-Santos y Shih, 2019). La migración vascular, la arborización, y la ramificación, se efectúan desde la piamadre hacia los ventrículos, donde los factores como el factor de crecimiento endotelial, y la hipoxia, son esenciales para la regularización de dicho proceso (Bautch y James, 2009; Tata y cols., 2015). Las colaterales, surgen a partir del día E5, en P7 varían el diámetro, ajustando el tono vascular hasta el P10. Adicionalmente, la cobertura de los capilares por los pericitos pericapilares, está establecida desde la edad neonatal y es vital para el mantenimiento de la Barrera Hemato-encefálica (Daneman y cols., 2010; Hagan y cols., 2014). En la corteza somato-sensorial, la proliferación pericitaria decrece desde el nacimiento a P25 (Harb y cols., 2013).

5. PLASTICIDAD NEUROVASCULAR DEPENDIENTE de la EXPERIENCIA durante el DESARROLLO

Se ha postulado un vínculo "*uno modela al otro*" entre los sistemas nervioso y vascular durante el desarrollo, pero se destaca que tanto en condiciones de privación como de estimulación se generan cambios a nivel de la densidad vascular en el cerebro, incluso en ausencia de cambios a nivel de la citoarquitectura neuronal. Esto indicaría que la actividad neuronal es necesaria para los cambios vasculares, y que los cambios en la actividad neuronal son suficientes para afectar la estructura vascular (Lacoste y

cols; 2014).

Durante el desarrollo postnatal, el cerebro se adapta frente a las demandas metabólicas, modificando la proliferación vascular (Black y col., 1991). Se ha evidenciado la relación anatómica entre los sistemas nervioso y vascular en la corteza somato-sensorial de la rata (Cox y col., 1993; Patel, 1983).

Asimismo, la estimulación mediante ejercicio físico, determina un aumento en la expresión de factores proangiogénicos a nivel de la corteza motora (Whitaker y cols., 2007). La estimulación sensorial desde P14 incrementa la densidad y la ramificación vasculares contralaterales; estos cambios permanecen y se observan en los mismos roedores a la edad de P21 (Lacoste y cols., 2014).

Se ha evidenciado que la lesión de un único folículo al nacer, afecta la formación y la representación neuronal en ratones de edad P14 (Lacoste y cols., 2014). Asimismo, la sección parcial de las vibrisas indujo una reducción significativa de la densidad y de la ramificación vascular en la capa IV (Lacoste y cols., 2014). Sin embargo, la densidad neuronal total permaneció incambiada. Estos autores demostraron además que la citoarquitectura neuronal y la actividad promueven la formación local de los vasos durante el periodo crítico neuronal. Del mismo modo, deprivando de forma unilateral durante P0-P5 vieron reducción en la densidad y ramificación vascular en ratones P14 (Lacoste y cols., 2014).

Durante el desarrollo, el entorno juega un rol en el remodelado de los circuitos neuronales y de la densidad vascular. Por un lado, el cerebro se adapta al incremento de la demanda metabólica durante el desarrollo postnatal temprano, incrementando la densidad vascular (Black y cols., 1991). A su vez, durante el desarrollo de la CxSS se ha visto una relación anatómica entre las columnas de la CxSS y la vasculatura (Lacoste y cols., 2014), lo cual podría llegar a explicar la respuesta a la demanda metabólica.

La red capilar en roedores se expande rápidamente durante las primeras semanas postnatales, logrando la estabilización a la edad de P20 (Harb y cols., 2013). Frente a la estimulación de las vibrisas de ratones, durante el primer mes postnatal, se ha evidenciado un incremento en la densidad vascular en la corteza somato-sensorial contralateral (Black y cols., 1987; Lacoste y cols., 2014).

En la corteza auditiva, se evidenció que la densidad capilar disminuye frente a la hiperestimulación de sonidos repetitivos (Whiteus y cols., 2014). Si el estímulo aplicado, tal como sonidos repetitivos, deflexión de las vibrisas o actividad motora, se detenía antes del quinto día, el cambio a nivel vascular se podría revertir. Esto se explicaría por el estado de hipoxia crónica la cual induce la angiogénesis en ratones neonatos-juveniles (Whiteus y cols., 2014).

Los astrocitos, son células gliales que se encuentran en íntima relación entre vasos y neuronas, lo cual otorga un rol fundamental en la regulación de la hiperemia funcional (Lia y cols., 2023). Los pies astrocitarios envuelven a los capilares a los 15 días postnatales, en roedores (Gilbert y cols., 2019). Se evidenció una disminución en la distribución y la densidad celular cuando se lesionaban las vibrisas en tripletes, no así cuando eran rasuradas todas de un lado (Lacoste et al 2014; Sims y cols., 2015). Los astrocitos, al encontrarse en íntima relación con los vasos y las neuronas, y considerando el rol fundamental que juegan en la regulación del calibre de los vasos de resistencia durante la hiperemia (Lia y cols., 2023), podrían cumplir un rol central en los cambios neuro-vasculares dependientes de la experiencia.

La microglia, es considerada como el conjunto de macrófagos residentes del sistema nervioso. Este grupo celular, que ejerce un rol en el remodelado de las sinapsis durante el desarrollo, aparece en asociación con el sistema vascular desde el E10.5 día embrionario, y se ha demostrado su rol en la angiogénesis y remodelación vascular mediante TNF -alfa (Lacoste y cols., 2014). Durante el desarrollo, la microglía sería la encargada de la maduración del sistema (Arnold y Betsholtz, 2013). A nivel del endotelio

y de los pericitos, éstos podrían regular en conjunto a los tipos celulares previamente descritos, así como a los cambios neuro-vasculares, dado que se ha visto que responden frente a neurotransmisores (Hall y cols., 2014; Peppiatt y cols., 2006). En efecto, datos recientes involucran la microglia en el control neurovascular mediante la acción de receptores purinérgicos y de la panexina1 (Bisht y cols., 2021).

La cobertura de los capilares por los pericitos, ya está establecida en ratones neonatos (Daneman y cols., 2010; Ben-Zvi y cols., 2014) con el fin de mantener la integridad de la BHE y permitir la regulación de la permeabilidad de la misma. En la angiogénesis postnatal, los pericitos son reclutados para inducir la formación de nuevos capilares mediante el factor derivado de las plaquetas (Lindblom y cols., 2003). La proliferación de los pericitos decrece desde el nacimiento al P25 en la corteza somato-sensorial (Harb y cols., 2013).

En un modelo de isquemia, frente a la estimulación unilateral de las vibrisas de ratón, se determinó un incremento en la expresión de factores proangiogénicos como VEGF, b-FGF, Ang-1, Ang-2, Tie-1 y Tie-2, en la región de penumbra luego del séptimo día después de la isquemia (Whitaker y cols., 2007). Adicionalmente, el rasurado de las vibrisas, determinó un incremento de Tie-1 y FGF- β , pero no de otros factores. Asimismo, estos investigadores hallaron un aumento de Gluy-1 y CD-31, vinculado al daño cerebral en contexto de isquemia, luego de la estimulación de las vibrisas, por lo que encontraron un incremento del número de vasos, respecto al grupo no tratado (Whitaker y cols., 2007).

6. MECANISMOS MOLECULARES QUE SUBYACEN LA PLASTICIDAD DEPENDIENTE DE LA EXPERIENCIA

La actividad neuronal promueve la formación de redes vasculares en la CxSS de ratón (aumento de la proliferación endotelial en los barriles de la capa IV) en la edad posnatal temprana. La reducción en la liberación de neurotransmisores en las sinapsis tálamo-corticales tales como glutamato da como resultado la desorganización post-sináptica y la reducción de la formación de la red vascular en la capa IV de dicha corteza sensorial (Lacoste y cols., 2014).

Trabajos en un modelo de plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza visual, evidenciaron el rol del receptor de glutamato de tipo ionotrópico NMDA (N-metil-D-aspartato) promoviendo la PDE. Durante el desarrollo postnatal, la relación de las subunidades del receptor NMDA, NR2A/NR2B irá en aumento (Tropea y cols., 2009). Sin embargo, al privar al animal del estímulo lumínico (oscuridad), esta relación se reduce. Estos resultados evidencian un cambio en las corrientes excitatorias mediadas por el receptor NMDA en función de la experiencia. A nivel vascular, se ha evidenciado un incremento de factores pro-angiogénicos como el VEGF en ratas en ambiente enriquecido (Cao y cols., 2004).

En relación a la remodelación vascular inducida por la PDE, en experimentos de privación sensorial se evidenció una disminución de la proliferación endotelial en la CxSS en la hemicorteza deprivada (Lacoste y cols., 2014).

7. ACOPLAMIENTO NEUROVASCULAR y UNIDAD NEUROVASCULAR

El encéfalo requiere un aporte de volumen sanguíneo de 50 mL/min por 100 g de tejido para lograr satisfacer sus demandas metabólicas; la actividad sináptica explica la mitad de dicho consumo metabólico. Si bien representa el 2% de la masa corporal total, el consumo de energía estimado es del 20% de la masa corporal total. El sistema nervioso central (SNC) necesita del aporte continuo de nutrientes, debido a su escaso poder de almacenamiento, por lo que la regulación del flujo sanguíneo cerebral (FSC) adquiere un rol clave, y ésta es posible gracias a los cambios en la resistencia vascular cerebral variando el calibre de los vasos encefálicos (Blumenshine y Adams, 1981). El consumo cerebral de oxígeno se correlaciona directamente con el FSC. La relación entre la actividad neuronal y el FSC se conoce como acoplamiento neurovascular; al aumento del FCS por la actividad cerebral se lo conoce a su vez como respuesta hiperémica o hiperemia funcional (Roy y Sherrington, 1890). Esta respuesta está en la base de los cambios observados en el flujo sanguíneo cerebral (FSC) mediante técnicas imagenológicas. Las variaciones del FSC son proporcionales a los cambios en el consumo de glucosa y de oxígeno. La estrecha relación entre el consumo de glucosa y el FSC subyace la técnica imagenológica funcional de tomografía por emisión de positrones (PET) (Sokoloff y cols., 1977) mientras que variaciones en la oxigenación de la hemoglobina cerebral subyacen la imagenología por Resonancia Magnética Funcional (fMRI) (Raichle, 1998). Mediante la (f-MRI), se ha demostrado que la estimulación periférica sensorial, incrementa la señal BOLD (imagen de contraste dependiente del nivel de oxígeno en la sangre, por sus siglas en inglés) en la corteza somato- sensorial contralateral (Petrus y cols., 2019). Adicionalmente, frente a la estimulación de las vibrisas de roedores, se incrementa el diámetro vascular luego de los 30 segundos de estimulación (Cox y cols., 1993).

La unidad anátomo-funcional responsable de coordinar las interacciones neuronales con las vasculares se denomina *unidad neurovascular* (NVU), la cual implica el vínculo entre neuronas, astrocitos, microglia, pericitos y células endoteliales que se relacionan íntimamente para poder adecuar el aporte metabólico mediante cambios en el diámetro vascular en función de la actividad neuronal (Attwell y cols., 2010; Fernandez-Klett y

cols., 2010; Hall y cols., 2014; Hamel, 2006; Howarth, 2014; Lecrux y Hamel, 2011).

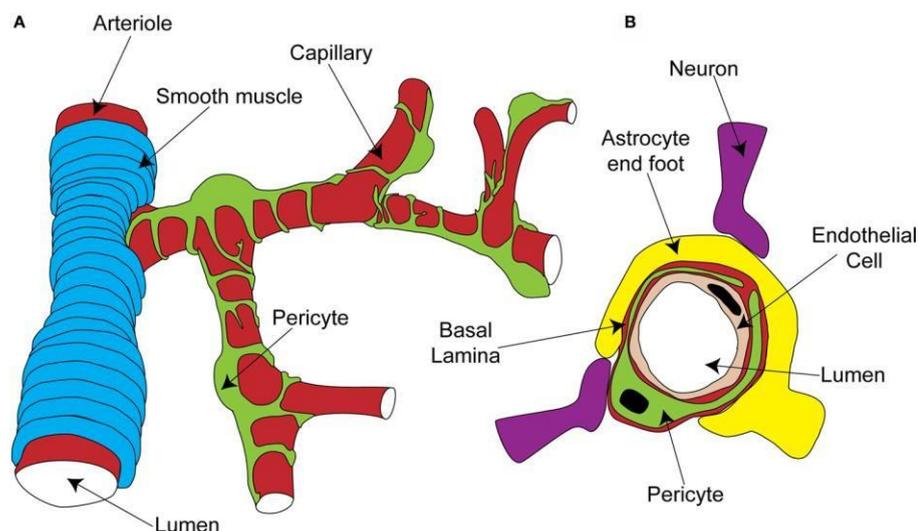


Figura 2 - Esquema de la Unidad Neuro-Vascular. (A) En la figura se esquematiza el músculo liso rodeando a las arteriolas, y los pericitos enviando prolongaciones a lo largo y alrededor de los capilares. (B) Los pericitos se disponen adyacentes a las células endoteliales y están separados de ellas y del parénquima por una capa de lámina basal. En el parénquima, se visualizan los pies de los astrocitos y las terminales neuronales que están estrechamente asociados con el capilar. Adaptada de Hamilton y cols., 2019.

La unidad neurovascular a su vez es sustrato de la barrera hematoencefálica (BHE). La BHE regula el paso de solutos y nutrientes de la sangre al cerebro y viceversa (Squire y cols., 2012); la BHE forma una barrera física que se explica por las uniones ocluyentes entre las células endoteliales y el bajo transporte vesicular (Reese y Karnovsky, 1967; Sá-Pereira, Brites y Brito, 2012).

Durante el desarrollo postnatal, la comunicación entre las células neuronales y la

vasculatura se establece de forma bidireccional, lo cual permite el correcto aporte de energía conforme el requerimiento metabólico (Paredes y cols., 2018). El acople neurovascular parecería no ser funcional hasta las 3 semanas post-nacimiento en roedores (Christopher y cols., 2016). Uno de los posibles mecanismos por los cuales el cerebro en desarrollo acopla los requerimientos metabólicos, sería con el control del flujo sanguíneo cerebral dependiente de la actividad al promover la angiogénesis, que generando hipoxia tisular induce la liberación de factores de crecimiento vasculares (Haigh y cols., 2003, Provis y cols., 1997, Raab y cols., 2004, Stone y cols., 1995). Si bien en el cerebro inmaduro, el acople neurovascular no es funcional hasta semanas después del nacimiento, se ha evidenciado que mientras el estímulo sensorial incrementa la señal BOLD en el adulto, en los animales recién nacidos se vio una respuesta contraria (Muramoto y cols., 2002; Yamada y cols., 2000).

8. LOS PERICITOS

Los pericitos pericapilares constituyen células perivasculares envueltas en la lámina basal, adyacentes a las células endoteliales de los capilares y las arteriolas precapilares y vénulas postcapilares con las que mantienen una íntima interacción. Estas células expresan proteínas contráctiles (como α -SMA, tropomiosina) que juegan un rol clave en la variación del diámetro capilar modulando el flujo sanguíneo cerebral y el intercambio de nutrientes (O_2 , CO_2 , glucosa, etc.) a través de la BHE (Yemisci y cols., 2009) en la microcirculación.

A nivel de los capilares del SNC se ha postulado que los pericitos son capaces de regular el FSC. Si bien se ha demostrado un rol predominante de los astrocitos en la regulación del acoplamiento neurovascular por su rol en la regulación del diámetro arteriolar (Gordon y cols., 2008) varios autores proponen que los pericitos también tienen gran importancia en la regulación del FSC porque la red capilar es la que posee mayor influencia sobre la determinación de la resistencia vascular cerebral, aunque la contribución relativa de los capilares en el FSC sigue siendo un tema de debate (Peppiatt

y cols., 2006; El Ali, Thériault y Rivest, 2014; Attwell y cols., 2016; Sweeney y cols., 2016).

En este contexto, estudios *in vivo* y *ex vivo*, demuestran que la relajación activa de los pericitos durante la actividad cerebral se correlaciona con un aumento del diámetro capilar, y en consecuencia con un incremento de flujo sanguíneo en las áreas de actividad (respuesta conocida como hiperemia funcional) (Fernandez-Klett y cols., 2010; Hall y cols., 2014). La dilatación capilar durante la actividad cerebral favorece el intercambio cerebro-vascular permitiendo la difusión de oxígeno (O₂) y glucosa de la sangre al cerebro y de monóxido de carbono (CO₂) y sustancias de desecho a la sangre.

La actividad neuronal, los neurotransmisores y los agentes vasoactivos regulan el tono pericitario resultando en ajustes del diámetro capilar. A su vez, el tono contráctil de los pericitos se modula mediante variaciones en su concentración intracelular de calcio ([Ca²⁺]_i) (Peppiatt y cols., 2006; Attwell y cols., 2010; Hall y cols., 2014; Fernández-Klett y Priller, 2015; Borysova y cols., 2013). La depolarización y los neurotransmisores como noradrenalina (Peppiatt y cols., 2006), acetil-colina (Wu y cols., 2003) y ATP (Kawamura y col, 2003; Peppiatt y cols., 2006) y moléculas liberadas por el endotelio tales como endotelina-1 (Chakravarthy y cols., 1992; Ramachandran y cols., 1993), tromboxano A₂ (Fernández-Klett y cols., 2010) y angiotensina II (Matsugi y cols, 1997; Kawamura y cols., 2004) evocan la contracción capilar mediada por pericitos aumentando así la resistencia al FS. La remoción extracelular de Ca²⁺ (Peppiatt y cols., 2006), la hiperpolarización, y sustancias vasodilatadoras como Óxido Nítrico (NO) (Hall y cols., 2014), la prostaglandina E₂ (PGE₂) (Hall y cols., 2014) y la adenosina (Matsugi y cols., 1997b) disminuyen el tono pericitario. En rodajas de cerebelo, el glutamato exógeno dilata capilares a través del NO (por mecanismo GMPc-independiente) y de prostaglandina E₂ (mediante receptores de tipo EP₄) por activación de una corriente saliente de K⁺ en los pericitos que se dilatan (Hall y cols., 2014). El nucleótido vasoconstrictor ATP incrementa la ([Ca²⁺]_i) pericitaria mediante la estimulación de receptores purinérgicos catiónicos (activados por ligando) P2X1/7 y metabotrópicos (acoplados a proteína G) P2Y2/4/6 evocando así contracción capilar y aumento de la resistencia al FS (Peppiatt y col, 2006; Kawamura y cols., 2003; Lacar y cols., 2012).

Los pericitos también cumplen funciones importantes en la angiogénesis, en el mantenimiento y la estabilización de la BHE, en la inducción de la polarización de los pies astrocitarios que rodean los capilares del SNC y en la regulación de la infiltración inmune y de los patrones de expresión génica BHE-específicos en células endoteliales (Armulik y cols., 2010).

Si bien aún se desconoce el rol de los pericitos en la plasticidad dependiente de la experiencia, se han postulado diversas hipótesis sobre la posible secreción de reguladores pro-angiogénicos inducidos por la actividad neural.

9. HEMICANALES de MEMBRANA

La comunicación de las células entre sí y de ellas con el medio externo es imprescindible para cumplir con las funciones celulares y las del tejido donde se encuentran. Los canales de membrana de gran poro (que permiten el pasaje de iones y moléculas de hasta 1.2 kDa) formados por conexinas (Cxs) y panexinas (Panxs) emergen como vías dinámicas para la interacción neuro-glio-vascular en la salud y la enfermedad. En mamíferos, las Cxs pueden existir bajo dos tipos, (1) formando hexámeros como canales únicos no ensamblados (conexones o hemicanales) en la membrana de no-uniión conectando el citosol con el medio extracelular (Li y cols., 1996; Contreras y cols., 2002; Sáez y cols., 2003, a y b) y (2) formando uniones gap o en hendidura si dos conexones (cada uno de ellos aportado por una célula diferente) se ensamblan constituyendo un canal intercelular de unión en hendidura (UH) que comunica los citosoles de dos células adyacentes acoplándolas funcionalmente entre sí. Los canales intercelulares o canales de uniones gap formados de Cxs, constituyen la base morfológica de las sinapsis eléctricas. Las Cxs derivan de una familia multigénica y se denominan según su PM (21 en humanos) (Bennett y Zukin, 2004). Los canales de gran poro de mamíferos que permiten la interacción de la célula con su entorno también pueden estar formados por subunidades proteicas denominadas panexinas que serán detalladas a continuación ya

que forman parte del objetivo de estudio de esta tesis.

10. PANEXINAS

Las panexinas (Panxs) son glicoproteínas que forman canales de membrana al oligomerizarse. Las panexinas fueron descritas en el año 2000 por Panchín y colaboradores (Panchin y cols., 2000; Bruzzone y cols., 2003; Yi Xu y cols., 2010). Se han reportado tres tipos de Panxs, 1, 2 y 3, las cuales poseen pesos moleculares de 48, 73 y 45 KDa respectivamente. Estas proteínas presentan sólo un 15% de homología con las Cxs, sin embargo, poseen una organización similar. Estructuralmente, las Panxs presentan cuatro hélices trans-membrana unidas por una región intracelular y dos extracelulares, los dominios N y C terminal se encuentran en el interior celular (ver Figura 3). Las regiones extracelulares se unen entre sí por dos puentes disulfuro, característica similar a la de las inexas presentes en los invertebrados (Bruzzone y cols., 2003; Sáez y cols., 2003; Lohman e Isakson, 2014).

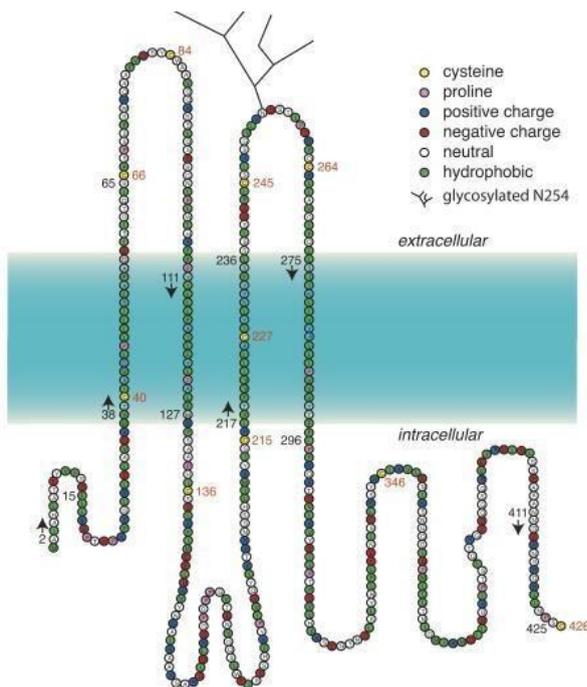


Figura 3 - Estructura de la Panx1. Se representa la topología de la Panx1 y los aminoácidos que la conforman. Adaptado de Wang y Dahl, 2010.

La Panx1 es la de mayor expresión; a nivel del SNC se ha determinado la presencia de Panx 1 y 2, en cambio la Panx3 se ha localizado en piel, cartílago y hueso (Bruzzone y cols., 2003; Lohman y cols., 2012; Penuela y cols., 2013; Lohman e Isakson, 2014). En el sistema nervioso, el ARNm de la Panx1 es expresado de forma dependiente del desarrollo, en cerebelo, corteza cerebral, bulbo olfatorio e hipocampo, habiéndose encontrado elevados niveles del ARNm en embriones y roedores juveniles con un máximo de la expresión entre E14-P07, declinando la expresión y estabilizándose en el sistema adulto (Vogt y cols., 2005). A nivel celular, la Panx1 se ha identificado en astrocitos, neuronas, endotelio y microglia entre otros (Giaume y cols., 2021).

Clásicamente se pensaba que la oligomerización de la Panx 1 y la Panx 3 era por medio de hexámeros, en cambio la Panx2 formaría heptámeros y octámeros. Sin embargo, aproximaciones de alta resolución (crío-microscopía electrónica) han demostrado recientemente que el canal de Panx1 está formado por la oligomerización de siete subunidades proteicas de Panx1 (Michalski y cols., 2020; Qu y cols., 2020; Ruan y cols., 2020). Al hemicanal expresado en la membrana celular se lo denomina panexón tipo 1 (Sosinsky y cols., 2011; Lohman e Isakson, 2014). Las panexinas no forman uniones gap en mamíferos; sin embargo, recientemente se ha reportado que la panexina1 humana expresada endógenamente en una línea celular de oligodendroglioma forma canales intercelulares poniendo de manifiesto la posibilidad de un nuevo tipo de sinapsis eléctricas entre tipos de células de mamíferos que expresan endógenamente la panexina1 (Palacios-Prado y cols., 2022).

La Panx1 presenta un poro central que actúa como vía regulable de liberación del ATP (Dahl, 2015). Estos canales se abren en la membrana de superficie en varios tipos de células, incluyendo ovocitos de *Xenopus* (Bruzzone y cols., 2003), neuronas piramidales (Thompson y cols., 2008), células HEK293 (Pelegri y Surprenant, 2006) y astrocitos (Huang y cols., 2007; Iglesias y cols., 2009; Garre y cols., 2010). El concepto de la expresión de canales funcionales formados de panexinas/conexinas en la membrana celular (que no forma uniones gap) fue resistido durante varios años al argumentarse que la apertura de los mismos al medio extracelular sería deletérea para las células. Debido a que estos canales poseen un poro de gran diámetro poco selectivo que permite

el pasaje de iones y de moléculas de hasta 1.2 kDa, la entrada masiva de Ca^{2+} y Na^+ y la pérdida de metabolitos e iones como el ATP y el K^+ al medio extracelular serían fatales para la célula (Goodenough y Paul, 2003; Sáez y cols., 2003; Sáez y cols., 2003; Evans, De Vuyst y Leybaert, 2006). Sin embargo, está demostrado que estos canales se abren en forma regulada, y en situaciones fisiológicas en la retina (Kamermans, 2001) y en condiciones patológicas en astrocitos durante la inhibición metabólica (Contreras y cols., 2002), durante la isquemia-reperfusión (Retamal y cols., 2007) o durante la activación astrocitaria (Garré y cols., 2010).

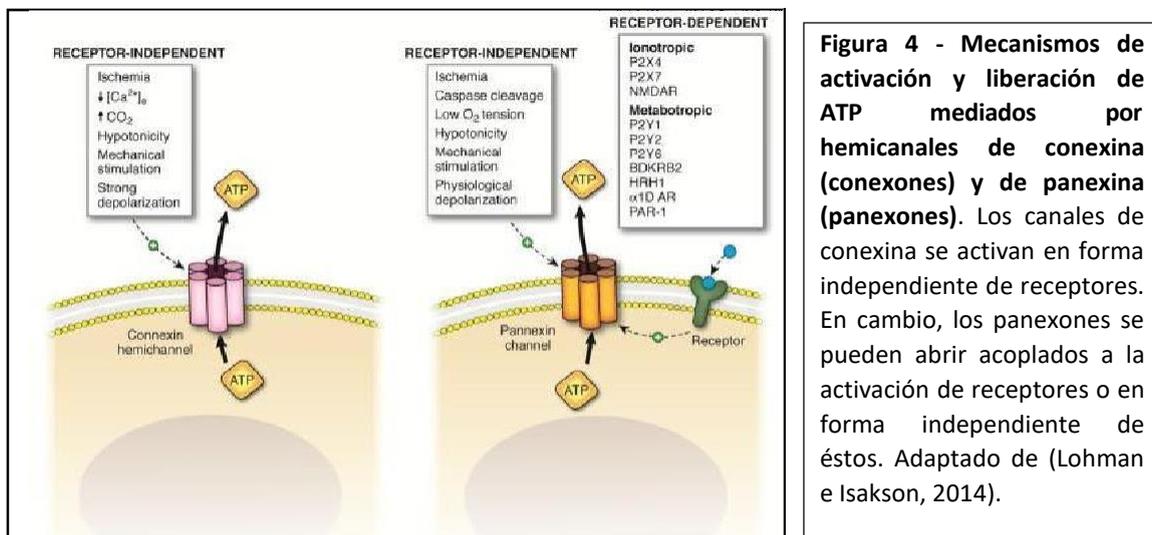


Figura 4 - Mecanismos de activación y liberación de ATP mediados por hemicanales de conexina (conexones) y de panexina (panexones). Los canales de conexina se activan en forma independiente de receptores. En cambio, los panexones se pueden abrir acoplados a la activación de receptores o en forma independiente de éstos. Adaptado de (Lohman e Isakson, 2014).

11. LOS PERICITOS CEREBRALES EXPRESAN HEMICANALES FUNCIONALES FORMADOS de PANEXINA 1

La expresión y la regulación de la panexina1 como canal de gran poro expresado en pericitos cerebrales recién comenzaron a investigarse por nuestro grupo de trabajo. Mediante técnicas funcionales (captación del colorante bromuro de etidio), herramientas farmacológicas, silenciamiento génico y técnicas de detección immune (inmunofluorescencia y Western Blot), evidenciamos, en rodajas agudas de hipocampo (*ex vivo*), en cultivos primarios de pericitos cerebrales (*in vitro*) y en el animal despierto (*in vivo*), que canales de panexina1 abiertos permiten la transferencia molecular entre los pericitos y su microambiente cerebral extracelular circundante en condiciones basales (Mai-Morente y cols., (en revisión)). Nuestros hallazgos son consistentes con datos reportados por otros autores que demostraron que los pericitos expresan RNA

para panexina1 (Vanlandewijck y cols., 2018). Así, los bloqueantes de Panx1 (pero no los de conexinas) inhibieron la captura del colorante por pericitos de roedores salvajes, pero no fueron efectivos en pericitos de ratones knockout totales para Panx1 (KO Panx1^{-/-}) confirmando la participación de la panexina1 en dicho intercambio. Técnicas de detección inmune evidenciaron la expresión de la proteína en pericitos hipocampales y su localización en el citoplasma y la membrana pericitarios.

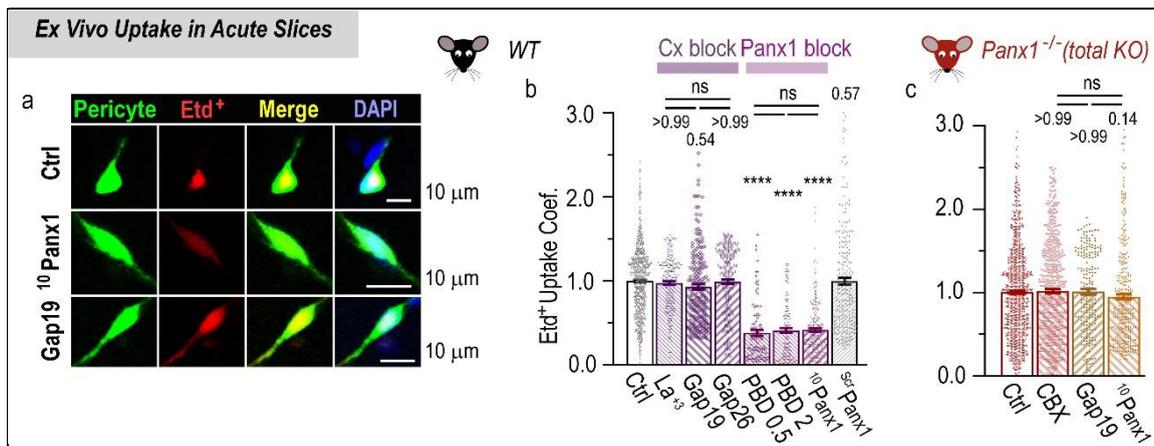


Figura 5 - Canales de Panx1 expresados en pericitos cerebrales son funcionales en condiciones de reposo y median un intercambio molecular con el microambiente. (A) Los canales Panx1 median el influjo de Etd⁺ a los pericitos capilares en cortes agudos del hipocampo. (a) Microfotografías fluorescentes representativas muestran el ingreso de Etd⁺ por parte de los pericitos en cortes de hipocampo derivados de ratones de tipo salvaje (WT) en condiciones de reposo (Ctrl) y tratados con péptidos miméticos ¹⁰Panx1, un bloqueador específico de Panx1 (¹⁰Panx1) y Gap19, un bloqueador específico de Cx43HCs. (Gap19). Observe la atenuación de la fluorescencia de Etd⁺ después del tratamiento con el bloqueador Panx1 en comparación con el control o las condiciones inhibidas por Cx43HCs. (b) Coeficientes de captación de Etd⁺ (media ± SEM) de pericitos en cortes de hipocampo en condiciones de control (9 ratones) y tratados con bloqueadores de Cx [La³⁺ (200 μM, 4 ratones); péptido mimético Gap19 (300 μM, 3 ratones), péptido mimético Gap26 (150 μM, 3 ratones)], bloqueadores de Panx1 [probenecid-PBD (0,5 mM, 3 ratones); PBD (2 mM, 4 ratones), péptido mimético ¹⁰Panx1 (150 μM, 3 ratones)], y con una forma revuelta de ¹⁰Panx1, ScrPanx1 (150 μM, 3 ratones). (c) Coeficientes de captación de Etd⁺ (media ± SEM) de pericitos en cortes de hipocampo derivados de ratones Panx1^{-/-} KO en condiciones de control (7 ratones) y tratados con el bloqueador general de Cx/Panx CBX (100 μM, 8 ratones), y péptidos miméticos Gap19 (300 μM, 4 ratones) y ¹⁰Panx1 (150 μM, 4 ratones). En (b) y (c), ns, no significativo entre los grupos indicados por barras horizontales; valores de p sobre barras o **** p<0,0001, en comparación con el control; Prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba posterior de Dunn. Adaptado de Mai-Morente y cols, 2024, 10.21203/rs.3.rs-3832782/v1.

Los panexones pericitarios del hipocampo responden a neurotransmisores, agentes vasoactivos y a la actividad neuronal mediante cambios en su actividad. En este sentido, en el trabajo de doctorado de la Dra Sandra Mai-Morente, se evidenció la permeabilidad pericitaria al colorante fue inhibida por la apirasa, por bloqueantes genéricos de los receptores purinérgicos P2X (PPADS) y P2Y (Reactive-blue) y específicos de los subtipos ionotrópico P2X7 (BBG/A804598) y metabotrópico P2Y6 (MRS2578) en rodajes salvajes, efectos que fueron prevenidos en rodajas hipocampales de ratones KO ($Panx1^{-/-}$). La potente sustancia vasodilatadora adenosina inhibió el intercambio entre pericitos cerebrales y su microentorno mientras que los agentes facilitadores del tono pericitario, ATP, noradrenalina, endotelina1 y angiotensina-II, favorecieron dicho intercambio (Figares M., Marset MV, Mai-Morente, 2017 – Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil- PAIE). El glutamato exógeno, un neurotransmisor excitatorio involucrado en el acoplamiento neurovascular (Hall y cols., 2014) y en funciones cognitivas disminuyó la captación de colorante por los pericitos salvajes por cierre de panexones hipocampales, efecto mediado por los receptores ionotrópicos AMPA/NMDA. Tratamientos (*ex vivo*; *in vivo*) con picrotoxina (PTX), un bloqueante de receptores GABA_A, que provocan un aumento intenso de la actividad neuronal induciendo convulsiones en el animal, también inhibieron la interacción pericito-microentorno cerebral por cierre de panexones. En rodajas agudas de hipocampo, la inhibición inducida por PTX fue prevenida por el silenciamiento neuronal mediante tetrodotoxina (TTX), un bloqueante de los canales de sodio voltaje-sensibles, demostrando que la actividad neuronal modula los panexones pericitarios. Los efectos inhibitorios de AMPA/NMDA y de la PTX fueron prevenidos en los pericitos de ratones KO ($Panx1^{-/-}$) (Tesis de maestría Juan Irigoyen, 2022). De manera importante, también encontramos que el incremento de calcio intracelular inducido por el ATP en cultivos primarios de pericitos cerebrales requiere de panexones funcionales y que los pericitos cerebrales median la liberación de ATP al medio extracelular (Mai-Morente, no publicado).

En suma, los pericitos cerebrales expresan la Panx1 funcional en condiciones basales. La interacción pericito-fluido extracelular mediada por panexones funcionales, requiere de la secreción basal de ATP endógeno y de su efecto autócrino/parácrino sobre receptores

purinérgicos ionotrópicos P2X7 y metabotrópicos P2Y6 para activar panexones acoplados a estos receptores. Además, el neurotransmisor excitatorio glutamato y la actividad cerebral intensa provocan el cierre de los panexones pericitarios en el hipocampo.

12. PREGUNTAS que BUSCA RESPONDER este PROYECTO

A partir de nuestros hallazgos y de los antecedentes presentados nos preguntamos:

¿Los pericitos cerebrales corticales expresan panexones funcionales en forma similar a lo observado en el hipocampo? En caso afirmativo, ¿Los pericitos cerebrales corticales responden a la experiencia y la actividad del entorno? ¿De qué manera la experiencia regula la funcionalidad de los pericitos cerebrales corticales? ¿Cuál/es es/son el/los rol/es de los panexones expresados en los pericitos en la red capilar cortical cerebral?

2. Hipótesis del trabajo

La experiencia modula la actividad neurovascular, en respuesta a los cambios del ambiente. La actividad pericitaria y su interacción con el medio extracelular cerebral se modifican conforme a los cambios de la entrada sensorial, en respuesta a variaciones de la demanda metabólica a nivel neuronal.

3. Objetivos

3. A. Objetivo general: Evidenciar si la entrada sensorial modula la expresión funcional de la panexina1 en los pericitos pericapilares de la corteza somato-sensorial.

3. B. Objetivos específicos:

1. Identificar los pericitos corticales pericapilares en la microvasculatura cerebral en los barriles de la capa IV de la CxSS.
2. Determinar si los pericitos corticales de la capa IV de la CxSS interactúan con el microentorno extracelular a través de canales de gran poro en el animal despierto en condiciones de comportamiento libre (*in vivo*). En caso afirmativo, determinaremos la naturaleza molecular de estos canales expresados en la

membrana pericitaria (panexones formados de Panx1 o conexones formados de Cx43).

3. Determinar si los pericitos corticales de la capa IV de la CxSS interactúan con el microentorno extracelular a través de canales de gran poro en rodajas agudas cerebrales (*ex vivo*) en condiciones basales. En caso afirmativo, caracterizaremos si dicha interacción depende del estadio de desarrollo, y la naturaleza molecular de estos canales expresados en la membrana pericitaria (panexones formados de Panx1 o conexones formados de Cx43).
4. Determinar si la experiencia, específicamente la privación sensorial unilateral, modula el intercambio molecular pericito-micro-entorno mediado por canales de gran poro (panexones). En caso afirmativo, caracterizaremos si dicha modulación depende (a) del estadio de desarrollo y (b) de la duración de la privación sensorial.

4. Materiales y Métodos

1. Animales

Los procedimientos experimentales se desarrollaron de manera acorde a lo establecido por las guías de la NIH-National Institutes of Health guidelines para el uso y cuidado de animales de experimentación (NIH Publications No.8023, revised 1978), y por la regulación local [CDC Exp. 4332/99, Diario Oficial No.25467, Feb. 21/00, Universidad de la República, Uruguay] (Exp. N° 070153-000758-19) cuya resolución transcribimos: "Tomar conocimiento de que la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA), aprobó el protocolo de experimentación con animales titulado: "*Obtención de rodajas agudas de corteza somatosensorial*" cuya investigadora responsable es la Dra. Verónica Abudara.

Empleamos ratones (*Mus musculus*) salvajes o Wild Type (WT) y Knockout globales para la panexina1 (KO Panx1^{-/-}) (Qu y cols., 2011) con una base C57BL/6, de ambos sexos y de

edades comprendidas entre (P06-P51). Los ratones WT (RRID: IMSR_JAX:000664) fueron provistos por Jackson Laboratory (Maine, USA). Los ratones KO *Panx1*^{-/-} fueron obtenidos a partir de embriones heterocigotos donados por Genentech Corporation (Genetech Inc.; South San Francisco, CA 94080) y crio- recuperados y reproducidos hasta obtener una colonia knockout homocigota en la Unidad de Biología de Animales de Laboratorio del Instituto Pasteur de Montevideo - Uruguay (UBAL -IP). Los ratones fueron hospedados en condiciones controladas de temperatura y humedad, y sometidos a ciclos luz/oscuridad de 12 horas en la Unidad de Reactivos Biológicos para Experimentación, Facultad de Medicina (URBE) y alimentados *ad Libitum*.

2. Deprivación sensorial unilateral para estudiar cambios en la comunicación de los pericitos en los barriles de la capa IV de la corteza somato-sensorial en roedores en un modelo de plasticidad dependiente de la experiencia (PDE)

Se empleó la deprivación sensorial unilateral como modelo de PDE ya que es un sistema clásico y bien estudiado. En este sentido, se conoce la organización anatómica de dicho sistema que está representada somatotópicamente desde la vibrisa hasta la corteza somato-sensorial (Woolsey, 1978). La corteza somato-sensorial primaria (S1) es una estructura cerebral que presenta gran capacidad plástica tanto durante el desarrollo como en el animal adulto. A su vez, el gran número de investigaciones realizadas en este modelo, garantiza la fiabilidad de los resultados. En nuestros experimentos, empleamos dos grupos de ratones (controles y condicionados a PDE) a dos edades postnatales diferentes (P06 y P21). Iniciamos la deprivación en ratones de edad P06 debido a que a esta edad logramos identificar la capa IV de la CxSS, incluso luego de la deprivación sensorial (Rice y Van Der Loos, 1977). Además, en estas edades tempranas, se mantiene una importante expresión de panexina1 (Vogt y cols., 2005) y de la densidad vascular (Lacoste y cols., 2014). Optamos por realizar la deprivación en animales de edad P21 para evaluar el cambio plástico a una edad juvenil-adulta, en la cual la expresión de panexina1 y la densidad vascular disminuyen para mantenerse estables en el adulto (Vogt y cols., 2005; Lacoste y cols., 2014). Para la elección del tiempo de deprivación nos basamos en protocolos de la bibliografía; optamos por 14 días para tomar el doble del

tiempo establecido en la mayoría de los protocolos (Whiteus y cols., 2014; Chau y cols., 2014; Lacoste y cols., 2014; Watanabe y cols., 2011), debido a que el recorte de las vibrisas se podría entender como un modelo de privación menos sensible que la cauterización (Knudsen I., 2008). Elegimos privar mediante recorte de vibrisas y no cauterización, debido a que buscamos evitar el efecto de la anestesia en los panexones.

Para generar la privación táctil sensorial unilateral, se suprimieron las vibrisas del lado derecho mediante su sección; en el caso del grupo de animales de edad P06, los ratones fueron apartados de sus madres únicamente durante el tiempo que duró el recorte de las vibrisas (30 segundos aproximadamente). A los ratones controles de este grupo, se los apartó de la madre por el mismo período que los ratones privados. La sección de vibrisas se realizó de forma diaria durante el tiempo de privación. La privación se mantuvo durante un período de 15 días para el grupo P06 y durante dos períodos para el grupo P21, uno por 15 días y otro durante 30 días. Los ratones controles de los grupos privados se mantuvieron en el mismo ambiente que a estos últimos durante el mismo período (15 o 30 días). Una vez finalizado el período de privación sensorial, se sacrificó al animal y se procede al estudio de los panexones pericitarios.

3. Obtención de las rodajas agudas de corteza de cerebro de ratón

Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y luego se decapitaron. Una vez removido el cerebro, se colocó en recipiente conteniendo líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) frío (4 °C) equilibrado con carbógeno (O₂ 95% + CO₂ 5%). Los hemisferios cerebrales se separaron en (derecho e izquierdo) y se adhirieron a la plataforma de una cámara de sección para obtener rodajas coronales de cerebro que comprenden la corteza somato-sensorial. Los cortes (300 μm de espesor) se transfirieron a una cámara de almacenamiento donde reposaron sobre una malla de nylon, sumergidos en aCSF a temperatura ambiente (RT) durante un período de estabilización de 45 min antes de ser utilizados. La composición del aCSF fue (en mM): NaCl 134; KCl 2,8; NaHCO₃ 29; NaH₂PO₄ 1,1; glucosa 12; MgSO₄ 1,5; CaCl₂ 2.5. La solución de aCSF se equilibró con carbógeno (O₂ 95% + CO₂ 5%) (pH, 7.4).

4. Identificación de pericitos pericapilares en los barriles de la capa IV de la corteza somato-sensorial del ratón

Para identificar los pericitos en la corteza somato-sensorial, se implementó la técnica de captación del marcador nuclear fluorescente TO-PRO-3 (Lacar y cols., 2012) previamente validada en el laboratorio para la identificación específica de pericitos cerebrales de murino (Mai-Morente y cols., 2021a; 2021b). El TO-PRO-3 (TO-PRO™-3 Iodide 642/661 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; cat. no. T3605) es un fluoróforo que se intercala al ADN celular, con un espectro de excitación/emisión 642/661 nm en rojo lejano, que es captado selectivamente por los pericitos cerebrales vivos por un mecanismo de transporte activo lo que permite su fácil reconocimiento en rodajas de cerebro y en cerebro en condiciones *in vivo* (Mai-Morente y cols., 2021; Tong y cols., 2021). Este marcador resiste la fijación con paraformaldehído (PFA) por lo que, una vez captado por los pericitos vivos, permite la identificación de los mismos en rodajas cerebrales fijadas que han sido sometidas a procedimientos de inmunofluorescencia. En nuestros experimentos, incubamos las rodajas agudas cerebrales conteniendo la CxSS en líquido céfalo-raquídeo artificial (aCSF) equilibrado con carbógeno conteniendo TO-PRO-3 (1 μ M; concentración final) por 20 minutos a temperatura ambiente y bajo protección de la luz. Los preparados fueron lavados por 15 minutos en aCSF con el fin de detener la captación y disminuir el fondo. Luego, las rodajas fueron fijadas en paraformaldehído-PFA al 4% en PBS por 40 minutos. Posteriormente se prosiguió a realizar tres lavados con PBS por 15 minutos cada uno, en flotación libre y agitación. Finalmente, las rodajas fijadas se montaron en glicerol y se visualizaron con microscopio confocal (Leica TBCS).

Anticuerpo Primario	Dilución	Marcador	Laboratorio
Anti-Rabbit NeuN	1:200	Neuronal	Abcam ab177487
Anti-Rabbit Panexina1	1:40	Panexina1	Sigma-Aldrich #HPA016930

5. Histoquímica para la citocromo-C-oxidasa

Para evaluar la actividad metabólica neuronal, se empleó la técnica histoquímica de la citocromo-C-oxidasa que ha sido clásicamente utilizada como marcador del metabolismo celular (Johnson y cols, 1993). La citocromo-C-oxidasa es una hemoproteína de unos 13,0 KDa, localizada en membrana interna de la mitocondria. Esta proteína, gracias al grupo “hemo” conforma el transporte de electrones desde el complejo III al IV de la cadena respiratoria. Mediante esta técnica se identificaron los barriles en la capa IV de la CxSS, que aparecen como estructuras visiblemente más oscuras (por oxidación de la 3,3' diaminobenzidina como se explica más adelante) donde se concentran cuerpos neuronales (tercer relevo sensorial que recibe información desde el tálamo) separadas entre sí por áreas más claras denominadas septos.

Una vez fijadas con paraformaldehído (PAF) (4%; 45 min) en flotación libre, y lavadas con solución de buffer fosfato (PBS) (5 x 10 min), las rodajas se incubaron en solución de citocromo-C-oxidasa a 37°C por 90 minutos.

La composición de la solución de citocromo-C-oxidasa fue: 3,3' diaminobenzidina (DAB), 0,6 mg; citocromo-C-oxidasa, 0,3 mg y sucrosa, 50 mg disueltos en 1000 µl de PBS. Posteriormente la solución se filtró para evitar los precipitados. Una vez oxidado el DAB, se obtiene como producto una coloración marrón en el tejido (Anderson y cols., 1974) lo cual se corresponde con la actividad mitocondrial.

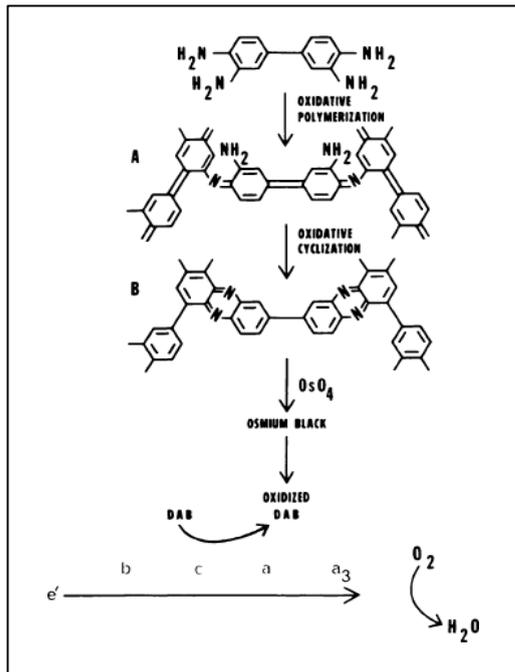


Figura 6 – Estructura química de la citocromo – C –oxidasa (Tomado de Anderson y cols., 1974).

6. Identificación de la microvasculatura cerebral cortical

Para identificar la microvasculatura cerebral cortical se utilizaron marcadores fluorescentes: la isolectina B₄ (ISOB₄) conjugada a un fluorocromo de fluoresceína o FITC (FITC-ISOB₄), la tomato lectina conjugada a DyLight 488 y un dextrano de alto peso molecular conjugado a FITC (FITC-Dextran-70S).

El dextrano 70S es un polisacárido que conjugado a un fluoróforo (FITC) permite la identificación de la vasculatura cuando se lo inyecta en el sistema cardiovascular pues su gran tamaño impide su fuga a través de las membranas de los vasos sanos. Los ratones fueron anestesiados por inhalación (isoflurano 4%-5%) en la cámara de un equipo (VETEQUIP impac 6), luego de lo cual se les inyectó FITC-Dextrano (PM 70 kDa; 2 mg disueltos en 100 μ L de suero fisiológico) por vía retro-orbital en el plexo venoso del espacio retro-bulbar del ojo (Yardeni y cols., 2011) mediante una aguja de jeringa de insulina. Luego de la inyección, se esperaron 20 minutos y el cerebro del ratón fue removido para la obtención de las rodajas agudas de CxSS.

En otro grupo de experimentos, se utilizó la FITC-ISOB₄ o la tomato de lectina conjugada a DyLight488 en rodajas cerebrales agudas y fijadas conteniendo la CxSS. En forma similar a la tomato lectina, la ISOB₄ se fija específicamente a residuos de α -D-galactosa en las membranas basales de las células endoteliales y de los pericitos (Laitinen, 1987; Peters y Goldstein, 1979; Mishra y cols., 2014) permitiendo su utilización para la identificación de dichas células. Las rodajas cerebrales agudas (300 μ m) se incubaron en aCSF equilibrado con carbógeno conteniendo tomato de lectina-DyLight488 o FITC-ISOB₄ (5 μ g/ml; 15 min) protegidas de la luz y en agitación. Luego, las rodajas se fijaron con PAF (4% en flotación libre), se lavaron con PBS (3 x 10 min) y se montaron en glicerol previo a la obtención de imágenes en el microscopio confocal. En otra serie de experimentos, cortes (60 μ m) fijados conteniendo la CxSS se lavaron con PBS (3 x 10 min), y se incubaron en flotación libre en PBS conteniendo ISOB₄-FITC (5 μ g/ml; 24 h) en agitación suave a temperatura ambiente. A las 24 horas post-incubación, las secciones se lavaron con PBS (3 x 10 min) y se montaron en glicerol para ser visualizadas en el microscopio confocal.

7. Estudio de la actividad de los canales de gran poro en la membrana celular de los pericitos corticales de la capa IV de la corteza somato-sensorial

Técnica de captación de bromuro de etidio (BrEtd)

Para estudiar la permeabilidad de los pericitos corticales mediada por canales de membrana de gran poro (que permiten el intercambio de iones y moléculas de hasta 1 kDa entre el citoplasma y el medio extracelular), se implementó la técnica de captación de bromuro de etidio (BrEtd, 394.3 PM) que se utiliza como un trazador de canales de membrana tales como conexones y panexones (Rackauskas y cols., 2007; Contreras y cols., 2003).

Una vez internalizado en las células, el BrEtd se intercala de forma irreversible al ADN y al ARN y una vez fijado a los ácidos nucleicos queda retenido en la célula y fluoresce

(excitación/emisión 557/572 nm). Así, la intensidad de la fluorescencia para el BrEtd será directamente proporcional al número de canales abiertos en la membrana permeables a dicho colorante (Giaume y cols., 2014). La actividad de los panexones en los pericitos de los barriles de la capa IV de la CxSS se comprobó tanto en el animal despierto en condiciones de comportamiento libre (*in vivo*) como en rodajas agudas de corteza (*ex vivo*).

Para evaluar la actividad de los panexones en los pericitos corticales en el ratón despierto (*in vivo*), se administró BrEtd (2 mg/kg disuelto en PBS) por vía intraperitoneal y se esperaron 40 minutos durante los cuales el animal permaneció en su jaula en condición de comportamiento libre. Luego se procedió al sacrificio del animal, a la disección de los hemisferios cerebrales, a la obtención de rodajas agudas de CxSS y al proceso de incorporación de TO-PRO-3 en las rodajas cerebrales para identificar los pericitos de ambas hemicortezas, derecha e izquierda. De esta forma se pudieron comparar ambas hemicortezas del mismo animal al cual se le inyectó una única dosis del trazador. Las rodajas agudas corticales se fijaron por inmersión con PAF (4%; 40 min), luego se lavaron (PBS; 3 x 10 min) y se montaron en glicerol para su análisis posterior.

Para comprobar la actividad de canales gran poro en pericitos en rodajas agudas corticales, se realizaron los experimentos en condiciones *ex vivo*. Luego de obtenidas y estabilizadas las rodajas agudas de CxSS (incluyendo los barriles de la capa IV), las mismas se incubaron a temperatura ambiente en aCSF equilibrado con carbógeno conteniendo BrEtd (10 μ M; 20 min). Posteriormente, las rodajas se lavaron en aCSF (15 min) para detener la captación del colorante y disminuir el fondo y se fijaron en PAF (4% en PBS, 40 min en agitación suave). Finalmente, las rodajas fijadas se lavaron en PBS (2 x 10 min), se incubaron en PBS-T con DAPI (1 μ M; 15 min), se lavaron (PBS; 10 min) y se montaron en glicerol sobre portaobjetos, para ser visualizadas mediante microscopía confocal. Para confirmar que la permeabilidad de la membrana pericitaria de los pericitos de la capa IV de la CxSS está mediada por canales formados de panexina1 en forma similar a lo reportado previamente para los pericitos del hipocampo (tesis doctoral Dra Sandra Mai-Morente) se implementaron dos estrategias. Por un lado, mediante técnicas farmacológicas se bloquearon los panexones utilizando el péptido

mimético $^{10}\text{Pax1}$ (150 μM) durante el registro de la captación de colorante EtdBr en rodajas cerebrales agudas (*ex vivo*). El péptido mimético $^{10}\text{Pax1}$ interactúa con los loops extracelulares de las panexinas inhibiéndolas (Evans y cols., 2006). Adicionalmente, para comprobar la participación de la panexina1 se utilizaron ratones knock-out globales para la panexina 1 ($\text{Pax1}^{-/-}$) en los cuales la expresión de la Pax1 está suprimida en todos los tipos celulares. El procedimiento para la realización de la captación de colorante en los ratones $\text{Pax1}^{-/-}$ en condiciones *in vivo* fue la misma que en ratones salvajes. Posteriormente, se analizó la captación de colorante EtdBr en los pericitos de la capa IV de la CxSS en ratones salvajes y $\text{Pax1}^{-/-}$ y se compararon entre sí.

8. Adquisición de imágenes

Las imágenes fueron adquiridas utilizando microscopía confocal utilizando un objetivo de aire (20x) y un zoom (0.5x). Se utilizaron los microscopios confocales del Instituto Pasteur de Montevideo (Zeiss, modelo Axio Observer Z1, LSM 800) y de la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina-UdelaR (Leica, modelo DMI6000, TCS-SP5). Los filtros y los láseres empleados fueron los apropiados para el DAPI (excitación/emisión 358/461 nm), la fluoresceína (excitación/emisión 488/515 nm), el BrEtd (AF546) (excitación/emisión 528/598 nm) y el TO-PRO-3 (AF 633) (excitación/emisión 642/661 nm). Para visualizar los barriles en la capa IV de la CSS se empleó microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). Se establecieron configuraciones de microscopio y de la cámara para permitir mediciones dentro del rango dinámico de las intensidades de fluorescencia. Los parámetros de adquisición (ganancia, offset) permanecieron iguales en aquellos experimentos en los que se debieron realizar comparaciones.

Para la cuantificación de la fluorescencia del bromuro de etidio se empleó el software Fiji (ImageJ). Para ello, inicialmente se identificaron los pericitos marcados con TO-PRO-3 en el canal correspondiente a este fluoróforo, se seleccionó de forma manual la región de interés (ROI) y se midió la intensidad media de fluorescencia en el canal correspondiente al BrEtd. Las intensidades de BrEtd se evaluaron como la diferencia ($F - F_0$) entre la fluorescencia (F) de los pericitos y la fluorescencia de fondo (F_0) medida en

el mismo campo donde no se detectaron células marcadas. Se seleccionaron al menos tres campos en cada rodaja.

9. Análisis estadístico

Los valores se representaron como la media \pm error estándar (Media \pm SEM). El análisis de la distribución fue realizado previamente a la aplicación del test estadístico, usando GraphPad Prism 7. Aquellos casos que no pasaron el test de normalidad (KS), fueron analizados mediante los tests no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis seguido de post-test. En todos los experimentos, el nivel de significancia fue de $p < 0.05$. El número de células analizadas en cada grupo experimental se basó en los reportes de captación de colorante, y requirió de 3-4 rodajas por condición por animal, y un mínimo de tres ratones por condición (Abudara y cols., 2015; Garré y cols., 2010). Los gráficos fueron realizados con el programa GraphPd Prism 7; las figuras fueron diseñadas con los programas Adobe Photoshop CS6 13.0 \times 64 y Adobe Illustrator CS6 16.0.0.

5. Resultados

1. Identificación de los pericitos pericapilares y de la red microvascular en la capa IV de la corteza somato-sensorial (CxSS) del ratón

A) Identificación de la capa IV de la corteza somato-sensorial del ratón

En primer lugar, identificamos los barriles de la capa IV de la corteza somato-sensorial (CxSS) mediante la técnica de la citocromo-C-oxidasa o mediante visualización por microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) (Figuras 6 y 7). Como se explicó anteriormente, la citocromo-C-oxidasa es una técnica histoquímica en la cual la diaminobencidina se oxida por la citocromo-C-oxidasa, lo que produce un cambio de color en el tejido (marrón al observarse en campo claro), resultante de la actividad mitocondrial. Por lo tanto, la intensidad de la coloración por oxidación varía según la actividad mitocondrial neuronal: a mayor intensidad de color, mayor actividad mitocondrial, lo que corresponde a una mayor actividad celular. Esta técnica permite visualizar la corteza somatosensorial debido a su distribución neuronal en forma de barriles, como se muestra en la figura 7, y facilita la identificación de la capa IV, donde ocurre el cuarto relevo de la vía sensorial.

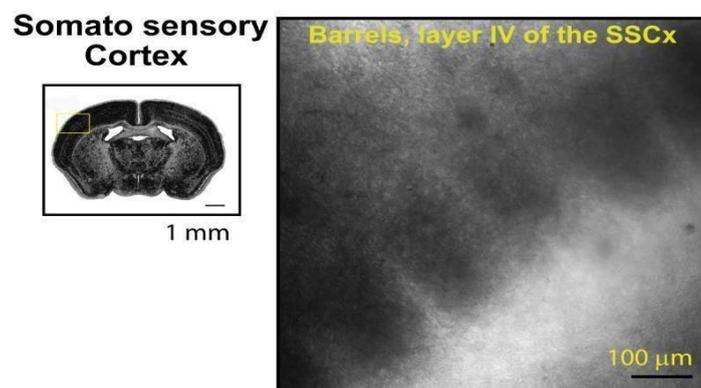


Figura 7 Capa IV de la corteza somato-sensorial. A la izquierda se representa una sección coronal de encéfalo del ratón en la cual se ha seleccionado la CxSS (recuadro amarillo). A derecha, se muestra una imagen de la capa IV de la CxSS identificada mediante la técnica histoquímica citocromo-C-oxidasa en la cual se aprecian los barriles (oscuros) separados por los septum (claros). Obsérvese que a menor luminosidad (negro) mayor es la reacción, lo que representa mayor la actividad mitocondrial, por lo tanto, mayor actividad metabólica en la célula.

A) *Identificación de los pericitos pericapilares en la corteza somato-sensorial del ratón*

En segunda instancia identificamos los pericitos pericapilares corticales en la capa IV de la corteza somato-sensorial de ratones (P06-P30) (Fig. 8), mediante el marcador fluorescente TO-PRO-3™ Iodide 642/661. El procedimiento para la marcación con TO-PRO-3 en rodajas agudas corticales se ilustra en la Figura 8. Una descripción detallada del procedimiento empleado para identificar los pericitos pericapilares con el marcador TO-PRO-3 en rodajas agudas cerebrales fue recientemente reportado (Mai-Morente y cols., 2021b). Este fluoróforo es selectivamente captado por estas células murales vivas en condiciones *ex vivo* (rodajas agudas) (Mai-Morente y col, 2021a; 2021b) y en el animal *in vivo* (Tong y col, 2021). En aquellos trabajos que abordan la caracterización y la identificación de pericitos cerebrales publicados por el laboratorio, contribuyo en calidad de co-autora (Mai-Morente y cols., 2021a; 2021b).

La marcación de pericitos pericapilares en rodajas agudas de corteza cerebral con TO-PRO-3 es una forma robusta de identificar pericitos corticales. El trazador es incorporado en los cuerpos y los procesos celulares (Fig. 8). Las células identificadas con este fluoróforo muestran una morfología similar a los pericitos; los somas fusiformes originan prolongaciones que se extienden varios micrómetros más allá de los cuerpos celulares. La marcación con TO-PRO-3 fue notablemente mayor a la fluorescencia del fondo, definido como el área del campo desprovisto de células marcadas, presentando así una buena relación señal/ruido. La identificación de los pericitos corticales mediante TO-PRO-3 se evidencia desde etapas tempranas del desarrollo (P06-P14) hasta la edad adulta en ratones (P80-90) (Mai-Morente y cols., 2021a). En rodajas de hipocampo, las células TO-PRO-3-positivas fueron marcadas con antígenos empleados para detectar pericitos, tales como el antígeno neural/glia 2 proteoglicano (NG2) y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR β), y con el trazador fluorescente NeuroTrace 500/525 que es selectivamente captado por pericitos vivos (Damisah y cols., 2017). Estos hallazgos demuestran de manera concluyente que las células positivas para TO-PRO-3 corresponden a pericitos (Mai-Morente y cols., 2021a).

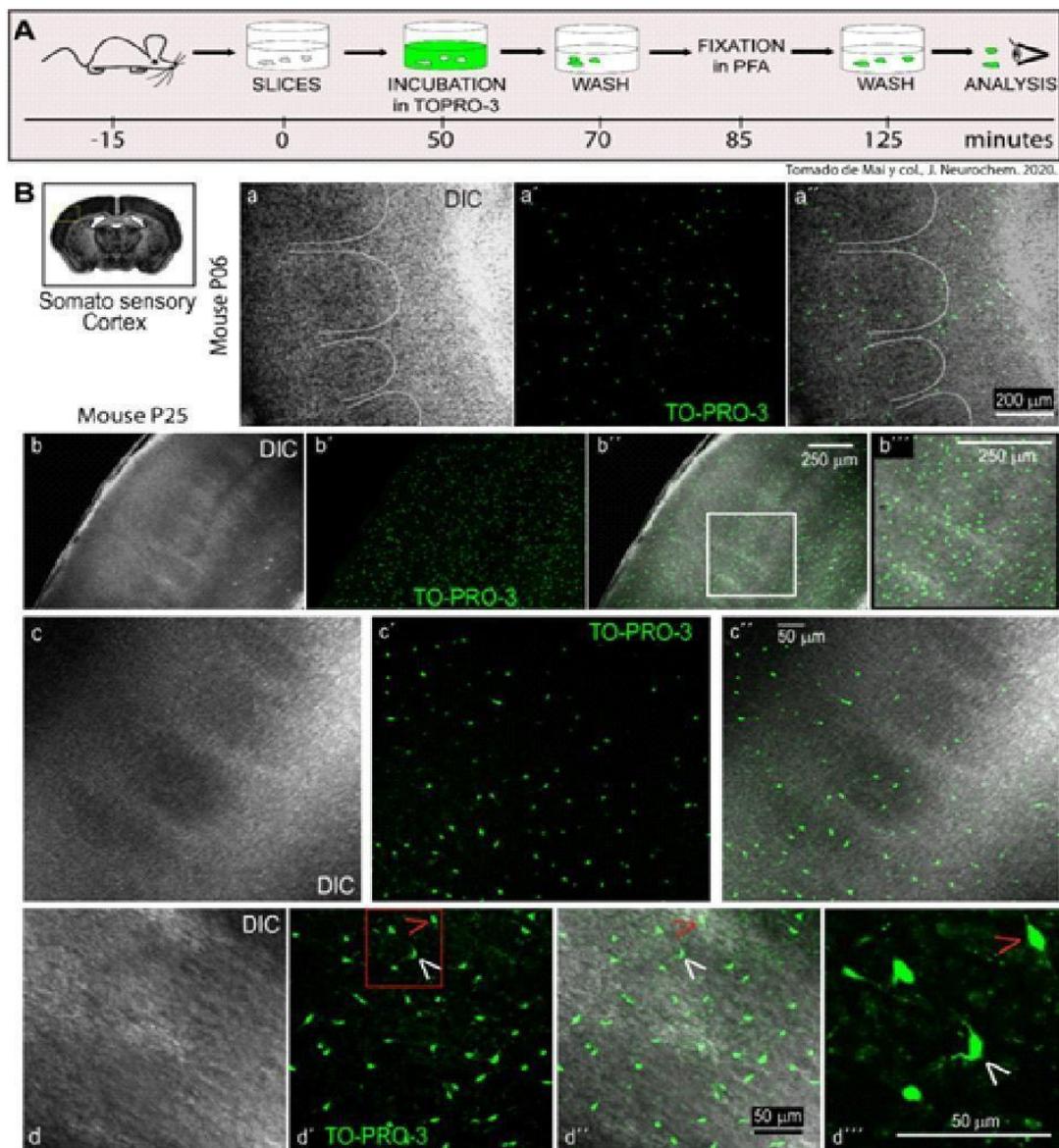


Figura 8. Identificación de pericitos en la corteza somato-sensorial del ratón. (A) El esquema ilustra el diseño experimental empleado para evidenciar la captación del marcador fluorescente TO-PRO-3 en rodajas agudas de cerebro (ver Materiales y Métodos). (B) El dibujo superior izquierdo ilustra un corte de cerebro coronal que incluye la CxSS (recuadro amarillo). (a – a'') Microfotografías fluorescentes de un mismo campo muestran somas de pericitos teñidos con TO-PRO-3 (verde brillante) en diferentes capas de la CxSS de un ratón (P06). En la foto DIC (a) los barriles de la capa IV se delinearon (líneas blancas punteadas) para facilitar su visualización. La imagen fluorescente TO-PRO-3 (a') se superpuso a la imagen DIC (a) en (a''). (b – b'') Microfotografías fluorescentes de un mismo campo a bajo aumento ilustran pericitos marcados con TO-PRO-3 en diferentes capas de la CxSS de un ratón (P25). En la imagen DIC (b) se distinguen los barriles de la capa IV. La imagen fluorescente TO-PRO-3 (b') se superpuso a la imagen DIC (b) en (b''); el área dentro del cuadro blanco fue ampliado (b'''). (c – c'') Las microfotografías de un mismo campo a gran aumento muestran pericitos corticales fluorescentes marcados con TO-PRO-3 (c'). La superposición de la imagen en DIC (c) evidencia pericitos en los barriles de la capa IV de la CxSS (c'') de un ratón P25. (d – d'') Las microfotografías de un mismo campo a gran aumento muestran pericitos corticales identificados con TO-PRO-3 (d') donde se observan pericitos con su típica forma ahusada y sus prolongaciones. La foto en DIC (d) se fusionó con la imagen fluorescente (d') y se muestra en (d''). El área dentro del cuadro rojo en (d') se amplió (d'''). En (d'-d'''), el pericito indicado por la punta de la flecha blanca está confinado dentro de un barril mientras que el indicado por la punta de la flecha roja se localiza en el tabique o septum. Cada imagen es representativa de la CxSS de 20 ratones.

B) Identificación de la vasculatura cerebral en la corteza somato-sensorial

Como mencionamos previamente, la vasculatura cerebral cortical fue identificada mediante administración intravenosa de FITC-Dextrano previamente a la obtención de las rodajas cerebrales y por tinción con lectinas unidas a fluoróforos (ISOB4 o tomato de lectina) en rodajas agudas o fijadas como se aprecia en las Figuras 9 y 10. Los pericitos corticales TO-PRO-3 positivos se localizaron típicamente en la pared externa de los pequeños vasos específicamente adyacentes a los vasos de pequeño calibre compatibles con capilares (Figs. 8). En las Figuras 9 y 10 se visualiza la íntima relación entre los pericitos y los vasos de pequeño calibre compatibles con capilares.

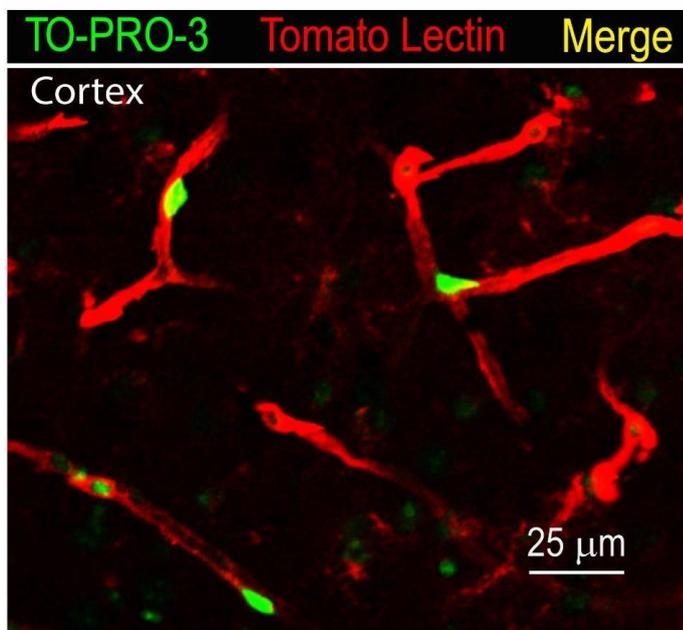
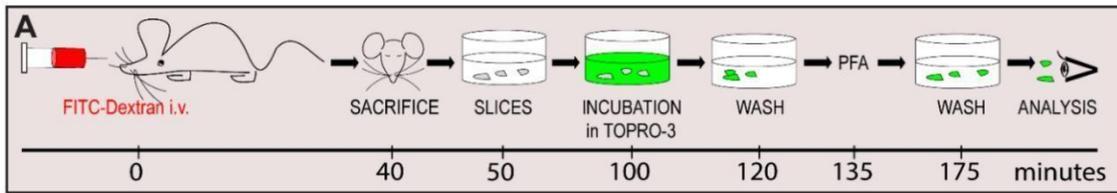


Figura 9 – Identificación de la microvasculatura en la CxSS. Se identifican los vasos de pequeño calibre (diámetro menor a 10 μm), mediante tomato de lectina. Se evidencian pericitos identificados con TO-PRO-3 adyacentes a la microvasculatura cortical.



Modificado de Mai y col., J. Neurochem. 2020.

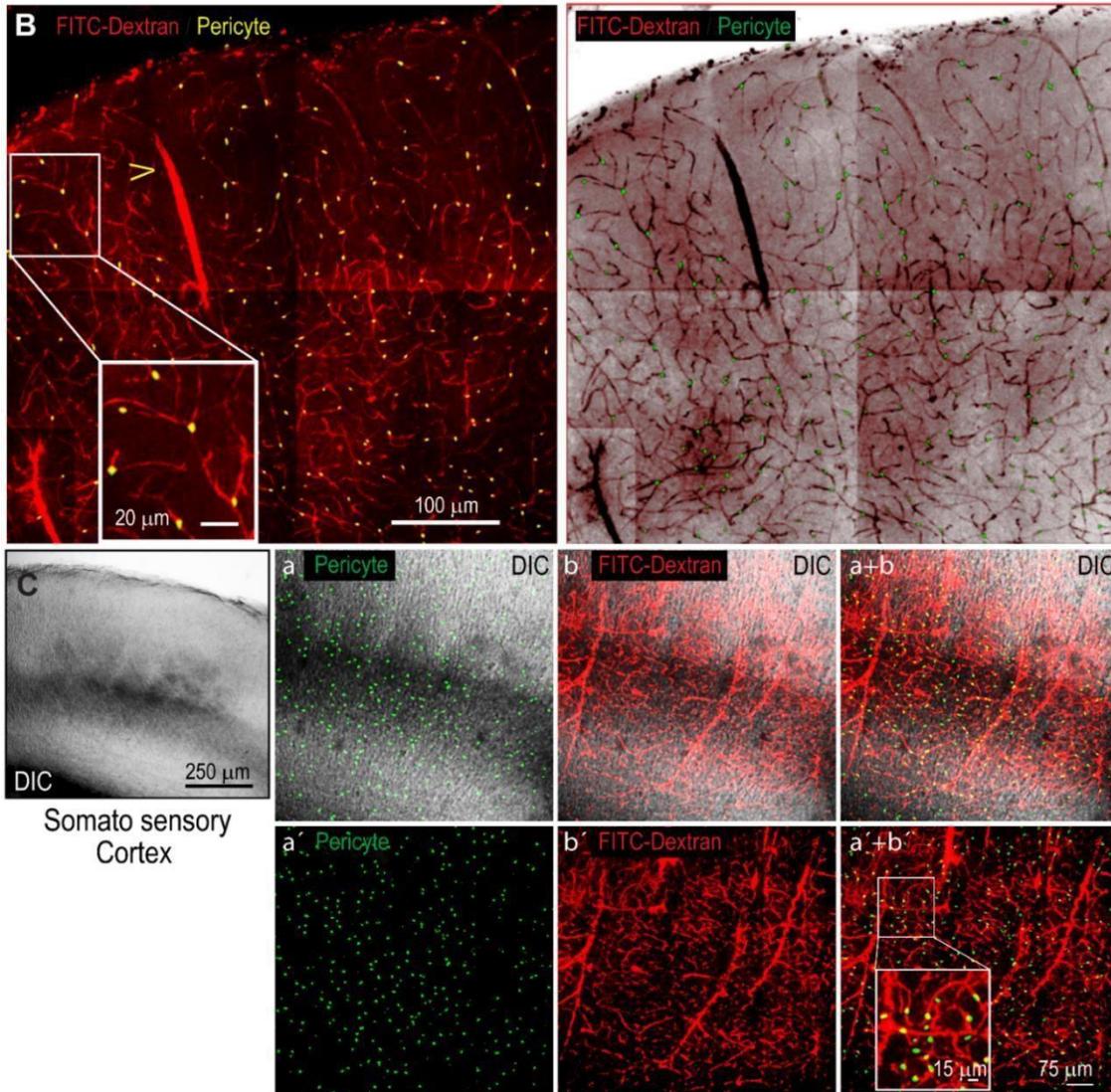


Figura 10 - Los pericitos de la CxSS se adosan a la microvasculatura cerebral, formando parte de la unidad neuroglivascular. (A) El esquema ilustra el diseño experimental para la identificación de la microvasculatura con FITC-Dextrano y de pericitos con TO-PRO-3 en rodajas agudas de cerebro. **(B)** Izquierda: Microfotografía fluorescente configurada a partir de cuatros campos, donde se evidencian pericitos identificados con TO-PRO-3 (amarillo) adyacentes a la microvasculatura identificada con FITC-Dextrano (rojo) en la CxSS. La cabeza de flecha señala una arteriola penetrante cortical. Derecha: misma imagen que a izquierda en fluorescencia inversa permite mejor visualización de la vasculatura (rojo) y de los pericitos (verde). **(C)** La foto superior izquierda en DIC muestra la capa IV de la CxSS de la cual se obtuvieron las fotos de un mismo campo a mayor aumento (a – a'+b'). Los pericitos se identifican con el fluoróforo TO-PRO-3 (a y a'), la vasculatura se evidencia con FITC-Dextrano (b y b'), y los barriles con DIC. La fusión de las imágenes fluorescentes (a') y (b') en (a'+b') permite evidenciar como los pericitos pericapilares delimitan la microvasculatura. En (a'+b') se ha amplificado un sector del campo (recuadro blanco) para visualizar la estrecha relación de los pericitos con los vasos. El campo en DIC se superpuso a las imágenes fluorescentes a', b' y a'+b' en respectivamente a, b y a+b. Se observan los vasos de mayor calibre penetrando de forma perpendicular a los barriles. Cada imagen es representativa de la CxSS de 4 ratones.

2. Los pericitos pericapilares de la corteza somato-sensorial del ratón se inmunomarcaban para Panx1

En rodajas corticales fijadas, tanto los pericitos pericapilares como la red vascular se identificaron mediante tomato de lectina conjugada a DyLight 488; este procedimiento permitió visualizar el soma de un pericito con su típica forma ahusada sobresaliendo desde un capilar cerebral (Fig. 11, en color lila). Mediante inmunofluorescencia detectamos la proteína Panx1 (verde) en la membrana celular de los pericitos (cabezas de flecha en la Fig. 11, a'y b'); nótese también su marca a lo largo de capilares y en células cerebrales que probablemente correspondan a neuronas las cuales presentan un elevado nivel de expresión de Panx1 (Bruzzone y cols., 2003).

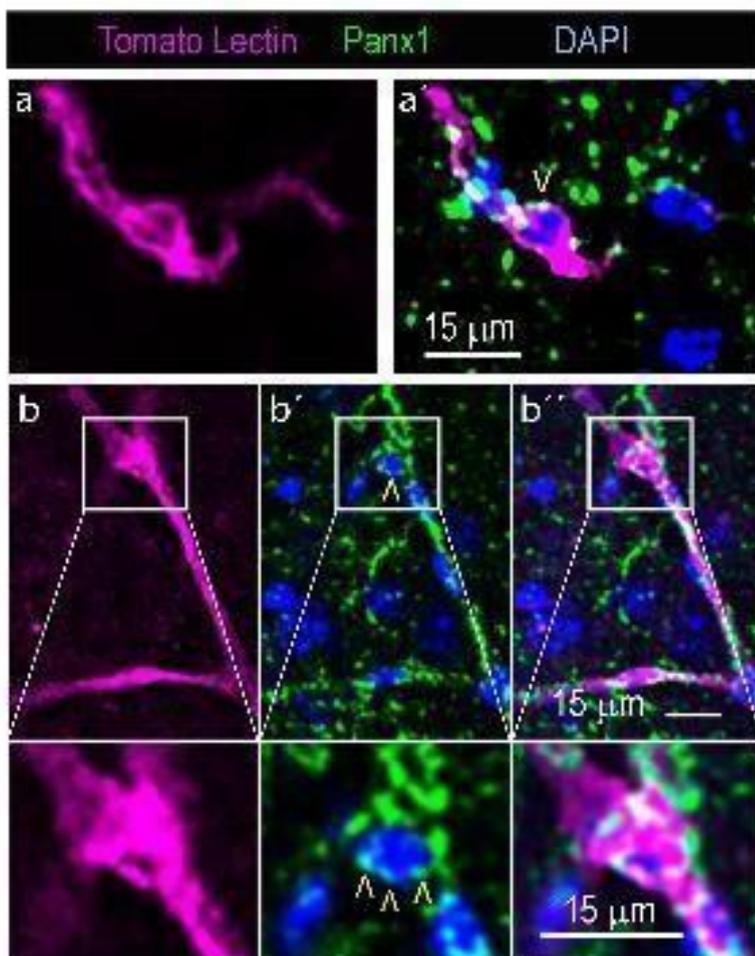


Figura 11 – Inmunomarcado representativo para la panexina1 en pericitos y capilares corticales teñidos con Tomato de Lectina. (a, a') Imágenes fluorescentes de un mismo campo de la CxSS ilustran un pericito adosado al eje longitudinal de un capilar y la detección de inmunofluorescencia para la Panx1 en su membrana (cabeza de flecha en a'). (b – b'') Imágenes fluorescentes de un mismo campo de la CxSS muestran un pericito ubicado en la bifurcación de un capilar y la detección de inmunofluorescencia para la Panx1 en su membrana. En b se ilustra un pericito en la bifurcación de un capilar (violeta), en b' se muestran la distribución de Panx1 (verde) en la membrana celular del pericito (cabezas de flecha) y los núcleos celulares marcados con DAPI y en b'' se ilustra la superposición de las imágenes previas b y b'. Estas imágenes son representativas de 4 ratones.

3. Los pericitos pericapilares de la corteza somato-sensorial interactúan con el fluido cerebral circundante a través de una vía mediada por la panexina1

(b.1) La panexina1 regula el intercambio entre los pericitos pericapilares de la capa IV de la CxSS y el fluido cerebral circundante en el animal despierto en condiciones de comportamiento libre (in vivo)

Mediante la técnica de captación de bromuro de etidio “*in vivo*”, determinamos los niveles de captación del colorante por los pericitos pericapilares en los barriles de la capa IV de la CxSS en ratones (P21-P30) no deprivados despiertos en condiciones de comportamiento libre de tipo (a) salvajes o wild-type (WT) y (b) knockout globales para la Panexina1 (Panx1^{-/-}). En el esquema de la Figura 12 (A) se describen las etapas experimentales para evidenciar la actividad de panexones pericitarios en condiciones *in vivo*. En primera instancia, administramos el colorante bromuro de etidio por vía intraperitoneal (200 mg/kg ip) a los ratones, los cuales fueron luego colocados en sus jaulas tras la inyección. Después de transcurridos 40 minutos, se procedió al sacrificio del animal y se obtuvieron las rodajas corticales que incluyen pericitos que han incorporado el colorante bromuro de etidio. La intensidad de fluorescencia del colorante captado por los pericitos dependerá del número de canales de gran poro abiertos en su membrana en el animal despierto en dichas condiciones de comportamiento libre. Las rodajas agudas pre-cargadas con bromuro de etidio, se incuban en aCSF conteniendo el fluoróforo TO-PRO-3 para marcar los pericitos cerebrales como ya fue descrito (Mai-Morente y cols., 2021a; 2021b). Considerando que el bromuro de etidio es un colorante intercalante que se fija en forma irreversible a los ácidos nucleicos intracelulares, una vez que ingresa al pericito ya no sale del mismo y por lo tanto, descartamos que los pericitos presenten fuga de colorante durante la obtención y la manipulación de las rodajas cerebrales. En estas condiciones experimentales, los pericitos cerebrales corticales de los ratones KO Panx1^{-/-}, mostraron una disminución significativa de la captación del fluoróforo de un 68 % respecto a los pericitos del ratón WT (Figura 12, B y C). Los valores de fluorescencia obtenidos fueron (en unidades arbitrarias o AU; Media ± S.E.M.): [WT: 8785 ± 645 AU, 59 pericitos, 3 ratones; KO Panx1^{-/-}: 2815 ± 148 AU, 137 pericitos, 3 ratones; p < 0.0001; Mann-Whitney test]. El área de los barriles de la CxSS

de los animales WT y KO $Panx1^{-/-}$ fue calculado para descartar diferencias entre ambas cepas. Efectivamente, no observamos diferencias significativas entre las áreas de los barriles de dichas cepas [WT: $16185 \pm 1817 \mu m^2$ (Media \pm S.E.M.) 24 barriles, 5 ratones; KO $Panx1^{-/-}$, $16598 \pm 1739 \mu m^2$ (Media \pm S.E.M.) 23 barriles, 5 ratones; ns, unpaired-t test] (Figura 11, C).

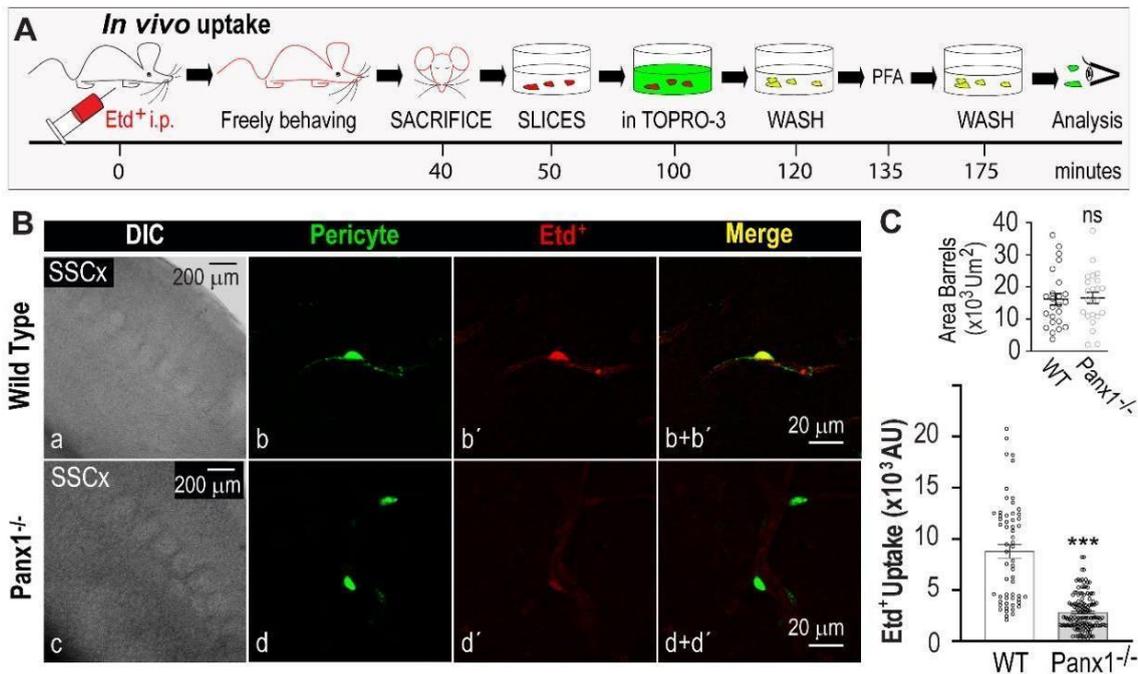


Figura 12 - Los pericitos se comunican con el medio extracelular mediante canales de panexina1 en el animal despierto (*in vivo*) en condiciones de comportamiento libre. (A) El esquema ilustra el diseño experimental de la captación de bromuro de etidio (BrEtd) *in vivo* (200 mg/kg ip; 40 min). El ratón permanece en condición de comportamiento libre durante 40 minutos, es sacrificado mediante dislocación cervical, luego se obtienen rodajas conteniendo la CxSS, las cuales se incuban en aCSF con TO-PRO-3. **(B)** Las microfotografías ilustran la captación de BrEtd por los pericitos corticales de animales WT y knockout para la panexina 1. Las fotografías izquierdas ilustran la capa IV de la CxSS visualizada mediante DIC para los ratones WT y KO $Panx1^{-/-}$; nótese los barriles separados por los septums en dicha capa IV. En las imágenes fluorescentes se identifican los pericitos mediante el fluoróforo TO-PRO-3 (pericyte; verde) en la capa IV y la captación de BrEtd por los pericitos de la CxSS (Etd⁺; rojo). Nótese la disminución significativa en la captación de BrEtd por los pericitos de los ratones KO $Panx1^{-/-}$ en comparación a los pericitos de los ratones WT. En las fotografías de la última columna se superpusieron las imágenes fluorescentes anteriores (merge; donde los pericitos captantes aparecen en amarillo). **(C)** El gráfico superior muestra el área en (μm^2) de los "barriles" en ratones WT y KO $Panx1^{-/-}$ evidenciando ausencia de diferencia significativa a nivel morfológico en esta región (ns; unpaired t-test). El gráfico de barras representa en unidades arbitrarias (AU) la captación de BrEtd en pericitos de ratones WT y KO $Panx1^{-/-}$ de los experimentos mostrados en B. Se evidencia la disminución significativa de la captación de BrEtd en animales KO $Panx1^{-/-}$ respecto al WT ($p < 0.0001$; Mann-Whitney test).

(b.2) Los pericitos pericapilares de la capa IV de la CxSS interactúan con el fluido cerebral circundante en rodajas agudas cerebrales por una vía mediada por la panexina1 (condiciones *ex vivo*)

Mediante la técnica de captación de bromuro de etidio (10 μ M; 20 min) “*ex vivo*” en rodajas agudas cerebrales conteniendo la CxSS de ratones salvajes no deprivados (P21-P30) determinamos los niveles de captación del colorante por los pericitos pericapilares en condiciones control y en presencia de un bloqueante específico para la panexina1, el péptido mimético 10 Panx1 (150 μ M) (Figura 13) el cual interactúa con los loops extracelulares de las panexinas inhibiéndolas (Evans y cols., 2006). El tratamiento de las rodajas de la CxSS con 10 Panx1 disminuyó en un 51 % la captación del bromuro de etidio (Media \pm S.E.M.) por parte de los pericitos respecto al control [control, 15476 \pm 1634 (AU); 34 pericitos, 3 ratones; 10 Panx1, 7629 \pm 603 (AU), 85 pericitos, 3 ratones; $p < 0.001$, Mann-Whitney test].

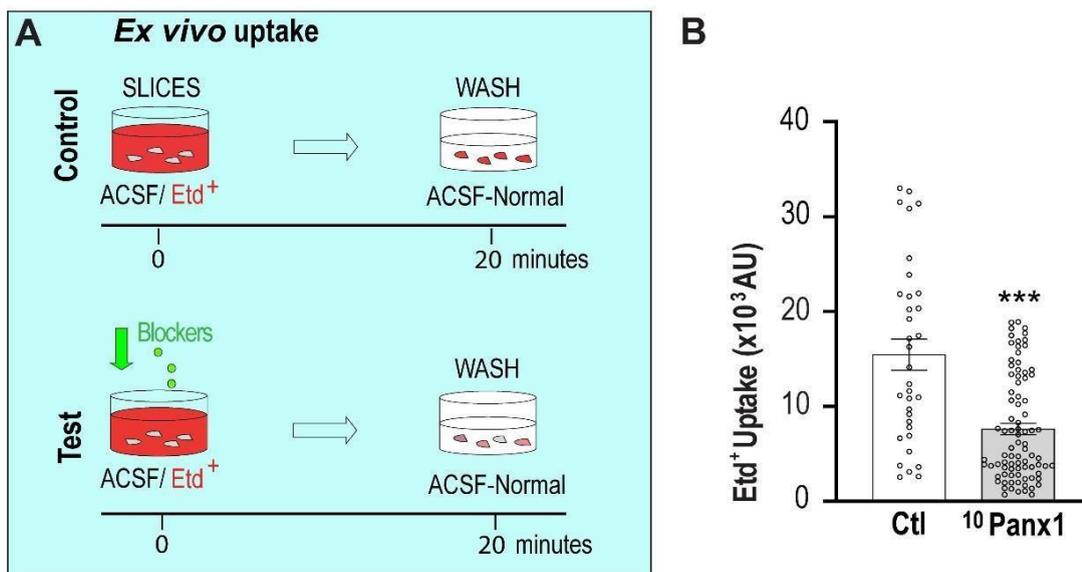


Figura 13- La captación de bromuro de etidio por los pericitos de la CxSS está mediada por canales de panexina1 (Panx1). (A) Se muestra un esquema del procedimiento experimental que ilustra la incubación de los cortes de CxSS con Etd⁺ junto con bloqueantes específicos para la Panx1. (B) Se representa gráficamente la captación de Etd⁺ en unidades arbitrarias (AU) para el grupo control y en presencia del 10 Panx1, bloqueante específico de la Panx1. Se evidencia una disminución significativa de la captación del colorante, por parte de los pericitos, en presencia del bloqueante.

En suma, tanto las aproximaciones experimentales *in vivo* (ratones despiertos en condición de comportamiento libre) que emplean herramientas genéticas (ratones que tienen suprimida la panexina1) como los experimentos realizados en condiciones *ex vivo* (en rodajas agudas de CxSS) que emplean herramientas farmacológicas (bloqueante específico de la panexina1) indican que los pericitos pericapilares de la CxSS de ratones capturan bromuro de etidio por una vía mediada por la panexina1; estos resultados evidencian la existencia de un intercambio molecular entre el pericito y el fluido cerebral extracelular en condiciones basales mediado por dicha proteína. Los pericitos de los ratones KO *Panx1*^{-/-} presentaron cierto nivel de fluorescencia basal; en forma concordante, los pericitos tratados con el péptido mimético ¹⁰Panx1 también mostraron una captación basal residual. Esto podría indicar una captación inespecífica o la presencia de otros canales de gran poro expresados en la membrana de los pericitos permeables al bromuro de etidio o de transportadores que mediaran el ingreso de este colorante al interior celular.

4. La entrada sensorial remodela la comunicación de los pericitos con el exterior mediada por la Panx1 en la CxSS

Como vimos anteriormente, nuestros hallazgos sugieren que los panexones de los pericitos pericapilares de la capa IV de la CxSS se encuentran activos en condiciones basales permitiendo el intercambio con el microentorno cerebral tanto en el animal *in vivo* como en rodajas agudas cerebrales *ex vivo*. Considerando que la experiencia remodela los circuitos y las interacciones neuro-glio-vasculares, y que la actividad cerebral modula las propiedades y el estado funcional de los pericitos pericapilares, nos preguntamos si la comunicación mediada por la panexina1 en los pericitos de la CxSS presenta plasticidad dependiente de la experiencia. Para responder esta pregunta, inducimos una privación sensorial mediante remoción unilateral de vibrisas en ratones WT y KO Panx1^{-/-} por 15 días. Los pasos experimentales principales se ilustran en el esquema de la Figura 14 (A). La privación comienza en el sexto día post-natal (ratones P06) cuando se remueven diariamente todas las vibrisas de forma unilateral (lado derecho). En la Figura 14 (B) se muestran los resultados de estos experimentos. La captación de colorante por los pericitos de los barriles de la capa IV en el ratón WT control no-privado, no presentó diferencias significativas entre ambas hemi-cortezas somato-sensoriales (izquierda y derecha) en condiciones control (Figura 14, Bc). Sin embargo, de manera interesante, la privación sensorial unilateral indujo en el ratón WT privado (a) una disminución de un 32.9 % en la interacción de los pericitos con el microentorno mediada por canales de gran poro en la hemicorteza contralateral compensatoria derecha en comparación con los pericitos de la HCxSS derecha del grupo control, y (b) un incremento de un 78.2 % en la interacción mediada por canales de gran poro de los pericitos con el fluido extracelular en los barriles de la hemicorteza somato-sensorial privada izquierda en comparación con los pericitos de la HCxSS izquierda del grupo control (Figura 14, Ba-c). Los valores de captación de colorante (Media \pm S.E.M.) en unidades arbitrarias (AU) de los grupos mencionados anteriormente fueron: grupo control no privado: HCxSS derecha (RHCx) 15354 \pm 938 (AU) (123 pericitos, 4 ratones); HCxSS izquierda (LHCx) 14430 \pm 814 (AU) (154 pericitos, 4 ratones); grupo privado:

HCxSS derecha compensatoria (RHCx) 10299 ± 605 (AU) (138 pericitos, 4 ratones); HCxSS izquierda deprivada (LHCx) 25709 ± 1068 (AU) (142 pericitos, 4 ratones); ns, no significativo, *** $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis test seguido de post-test, entre los grupos indicados por las barras horizontales. Para determinar si los cambios en el intercambio entre los pericitos y su microentorno inducidos por la disrupción sensorial están mediados por la modulación de la actividad de panexones, repetimos estos experimentos en ratones KO $Panx1^{-/-}$. Los resultados obtenidos y su comparación con los datos previos encontrados en ratones WT se representan como índice de captación Izquierda/Derecha en el gráfico “d” de la Figura 14. Definimos este índice de captación como el cociente entre la captación de los pericitos de la HCxSS izquierda sobre la media de captación de los pericitos de la HCxSS derecha. Para el grupo de ratones WT controles no deprivados, este índice fue cercano a 1 pues no obtuvimos diferencias significativas entre las medias de captación de los pericitos de ambas HCxSS encontrándose un valor (Media \pm S.E.M.) de 0.94 ± 0.05 (154 pericitos, 4 ratones). En cambio, para el grupo de ratones WT deprivados, el índice de captación fue de 2.5 ± 0.10 (142 pericitos, 4 ratones) ya que los pericitos de la HCxSS izquierda o deprivada aumentaron su captación mientras que los pericitos de la HCxSS derecha no deprivada o compensatoria la disminuyeron como vimos en el gráfico “c” de la Figura 14. El grupo control de ratones KO $Panx1^{-/-}$ (no deprivado), no presentó un índice de captación Izquierda/Derecha significativamente diferente al de los ratones WT, 1.06 ± 0.07 (88 pericitos, 4 ratones) (Figura 14, gráfico d) indicando que los pericitos de ambas HCxSS derecha e izquierda muestran una captación similar. A diferencia del grupo de ratones WT deprivados, en el caso de los pericitos de ratones KO $Panx1^{-/-}$ deprivados, el índice de captación Izquierda/Derecha también fue cercano a la unidad, a saber, 1.07 ± 0.05 (156 pericitos, 4 ratones) (Figura 13, gráfico d); ns, no significativo, *** $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis test seguido de post-test, entre los grupos indicados por las barras horizontales. Este hallazgo indica que los pericitos de los ratones KO $Panx1^{-/-}$ deprivados de las HCxSS derecha o compensatoria y la izquierda o deprivada captaron en forma similar y no mostraron regulación por la disrupción de la entrada sensorial, lo cual es compatible con la idea de que la experiencia modula el intercambio de los pericitos por una vía mediada por la panexina1 en los ratones salvajes o WT.

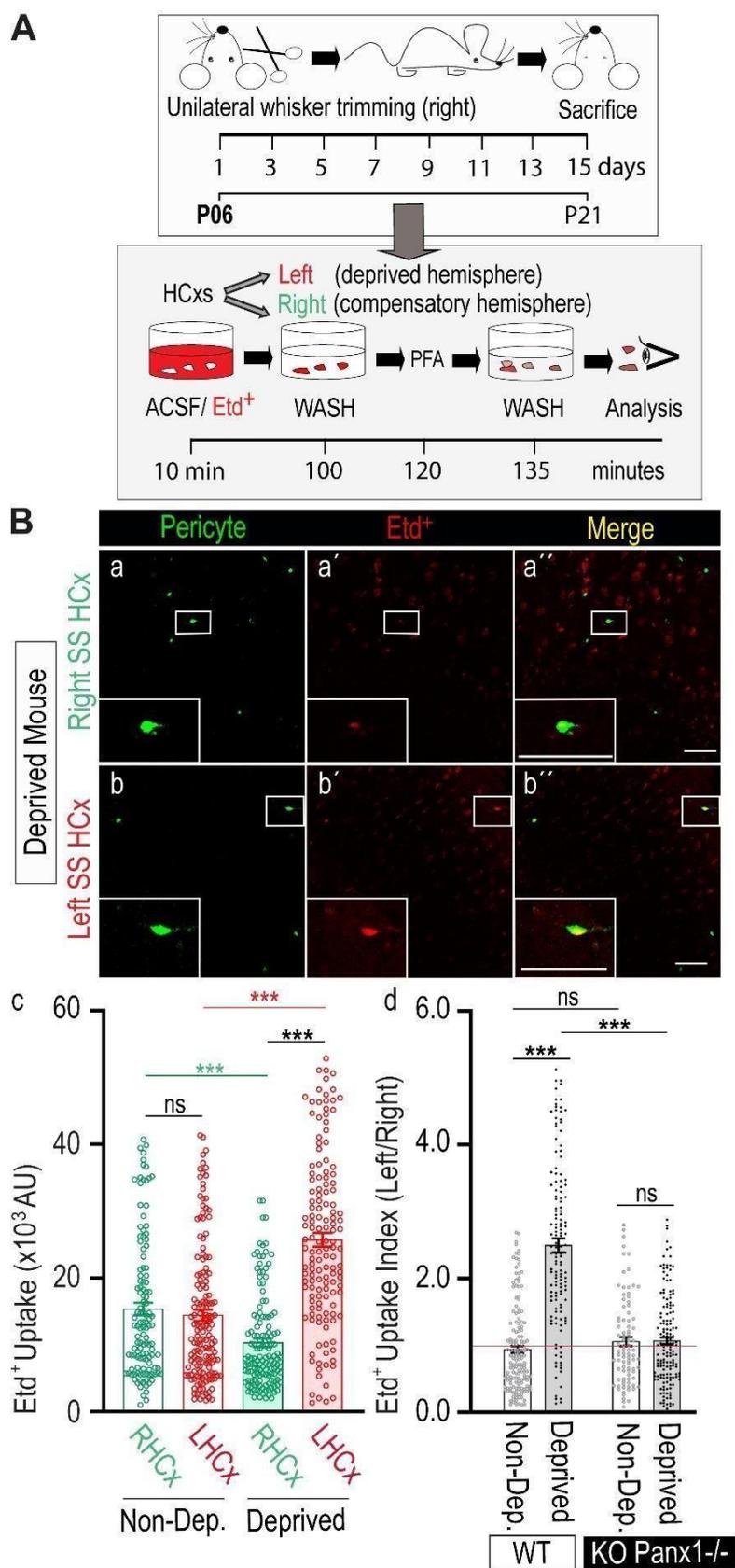


Figura 14 – El número de panexones funcionales en los pericitos de los barriles de la capa IV de la CxSS se remodela por cambios en la experiencia sensorial en condiciones *in vivo*. (A) El esquema representa el procedimiento para inducir la deprivación sensorial, mediante la remoción unilateral de las vibrisas derechas (día por medio) desde el día 06 post-nacimiento y por 15 días. Luego, se sacrifica el animal, se obtienen rodajas cerebrales agudas que contienen la corteza somato-sensorial (CxSS derecha e izquierda), las cuales se tratan para identificar pericitos y exponer a bromuro de etidio (Etd⁺). (B) Fotografías fluorescentes de un mismo campo de la CxSS izquierda o deprivada (Left SSHCx) y de la CxSS derecha o no deprivada (Right SSHCx) muestran un pericito hipercaptante en la primera (a-a') e hipocaptante en la segunda (b-b'). (c) Los resultados de la captación de colorante para los pericitos de las CxSS izquierda y derecha se graficaron para ratones salvajes (WT) no deprivados o controles (Non-Dep.) y para ratones deprivados (Deprived). La captación de colorante por los pericitos de ambas cortezas fue similar en los ratones controles (Non-Dep); la deprivación táctil derecha indujo un aumento de la captación de colorante por los pericitos de la CxSS izquierda o deprivada (LHCx) y una disminución de la captación por los pericitos de la CxSS derecha no-deprivada (RHCx) en relación a los controles. (d) Se grafica el índice de captación Izq/Der para los ratones deprivados WT y KO totales para la Panx1 (KO Panx1^{-/-}). Nótese la ausencia de modulación de la captación de colorante en los pericitos corticales por la entrada sensorial en los ratones KO Panx1^{-/-}.

En conjunto, los resultados obtenidos durante la deprivación sensorial por remoción unilateral de vibrisas durante 15 días, sugieren que la experiencia remodela la interacción entre los pericitos pericapilares corticales y el medio cerebral extracelular circundante a través de una vía mediada por canales de Panx1; en este escenario, la deprivación sensorial unilateral aumentó la comunicación entre el pericito y el fluido cerebral en la hemicorteza somato-sensorial deprivada y la disminuyó en la hemicorteza contralateral (derecha), por cambios en el número de panexones pericitarios funcionales.

5. La comunicación pericitaria mediada por la Panx1 y su regulación por la entrada sensorial son dependientes del desarrollo

Considerando que la expresión de la Panx1 en el sistema nervioso de los roedores es mayor en estadios embrionarios y etapas post-natales tempranas (Bruzzone y cols., 2003; Vogt y cols., 2005; Ray y cols., 2005), nos preguntamos si la dependencia de la expresión de Panx1 al desarrollo impactaría en la regulación por la experiencia de la comunicación pericitaria a través de Panx1. Para ello repetimos los experimentos esquematizados en la Figura 14A, pero iniciándolos a una edad más tardía (P21) tal como se ilustra en el esquema de la Figura 14(a). Los resultados obtenidos se graficaron en la Figura 15. En estos ratones deprivados a la edad P21, el comportamiento de la

comunicación pericitaria mediada por canales de gran poro fue similar al de los experimentos iniciados al día 6 postnatal. Así, la captación de colorante por los pericitos de los barriles de la capa IV en el ratón WT control no-deprivado, no presentó diferencias significativas entre ambas hemi-cortezas somato-sensoriales (izquierda y derecha) (Figura 15, Ab). De manera similar a lo observado cuando se inició la remoción de vibrisas a partir del día 6 post-natal, la deprivación sensorial unilateral a partir del día 21 post-natal, también indujo en el ratón WT deprivado, (a) una disminución de un 32.8 % en la interacción de los pericitos con el microentorno mediada por canales de gran poro en la hemicorteza contralateral (derecha) en comparación con los pericitos de la HCxSS derecha del grupo control y (b) un incremento del 26.1 % en la interacción mediada por canales de gran poro de los pericitos con el fluido extracelular en los barriles de la hemicorteza somato-sensorial deprivada izquierda en comparación con los pericitos de la HCxSS izquierda del grupo control (Figura 15, Ab). Los valores de captación de colorante (Media \pm S.E.M.) en unidades arbitrarias (AU) de los grupos mencionados anteriormente fueron: grupo control no deprivado: HCxSS derecha (RHCx) 5156 ± 511 (AU) (59 pericitos, 4 ratones); HCxSS izquierda (LHCx) 5367 ± 668 (AU) (48 pericitos, 4 ratones); grupo deprivado: HCxSS derecha (RHCx) 3465 ± 283 (AU) (65 pericitos, 3 ratones); HCxSS izquierda deprivada (LHCx) 6767 ± 556 (AU) (53 pericitos, 3 ratones); ns, no significativo, *** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis test seguido de post-test, entre los grupos indicados por las barras horizontales. Si comparamos el comportamiento de la comunicación pericitaria en el ratón deprivado cuando la remoción de las vibrisas se inició al día 6 o al día 21 post-natal, vemos que la magnitud de la disminución de la captación por los pericitos de las HCxSS derechas fue de un 33% aproximadamente en ambos casos. Sin embargo, el aumento de la captación por los pericitos de la HCxSS deprivada izquierda fue menor en los experimentos de inicio más tardío (P21) que en los de comienzo más temprano (P06) (26.1 % vs 78.2 % respectivamente), y en consecuencia el índice de captación Izquierda/Derecha fue significativamente mayor en los ratones cuya remoción se inició a la edad P06 (Índice I/D para P06: 2.5 ± 0.05 (Media \pm S.E.M.) (154 pericitos, 4 ratones); Índice I/D para P21: 1.79 ± 0.14 (Media \pm S.E.M.) (50 pericitos, 3 ratones); *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test (Figura 14B). Esto podría explicarse por una mayor expresión de la proteína panexina1 a edades más tempranas.

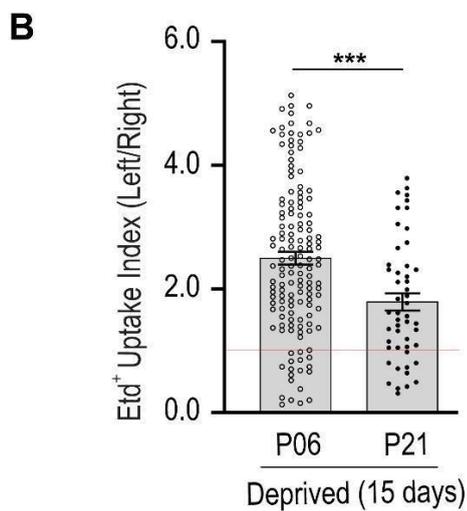
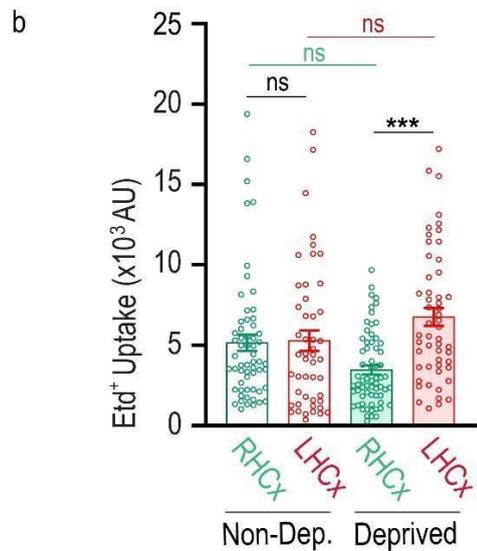
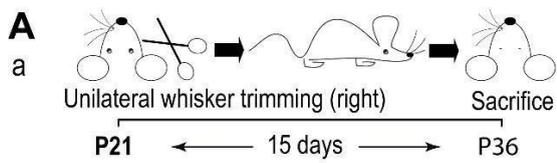


Figura 15 - Captación de colorante BrEtd mediada por canales de gran poro es mayor cuando la privación se inicia a edades más tempranas. (A) En el esquema (a) de la figura A se representa el procedimiento de privación sensorial, la cual se realiza de forma unilateral desde el día 06 y 21. (b) Captación de colorante para los pericitos de las CxSS izquierda y derecha para ratones salvajes (WT) no privados o controles (Non-Dep.) y para ratones privados (Deprived). **(B)** El gráfico de barras representa el índice de captación I/D para pericitos de ratones privados durante 15 días iniciando la modificación sensorial a los 6 y 21 días. Se evidencia que esta relación es significativamente mayor para el grupo de menor edad (P06).

En línea con esta idea, decidimos explorar la interacción entre los pericitos pericapilares corticales y su microentorno a través de canales de gran poro a distintas edades, P06, P21 y P36. Al comparar los niveles de comunicación pericitaria, efectivamente confirmamos que los pericitos de los ratones P06 captan más colorante que los pericitos de los ratones P21 y P36 lo que indicaría mayor intercambio entre los pericitos y el medio extracelular por actividad de canales de gran poro en su membrana. En todas las edades, los pericitos de ambas HCxs captaron de la misma forma (Figura 16). Los valores de captación (Media \pm S.E.M.) de estos experimentos en unidades arbitrarias (AU) fueron los siguientes: ratones P06: HCxSS derecha (RHCx) 8881 ± 814 (AU) (30 pericitos, 4 ratones); HCxSS izquierda (LHCx) 8709 ± 521 (AU) (44 pericitos, 4 ratones); ratones P21: HCxSS derecha (RHCx) 5524 ± 360 (AU) (99 pericitos, 5 ratones); HCxSS izquierda (LHCx) 6073 ± 430 (AU) (69 pericitos, 5 ratones); ratones P35: HCxSS derecha (RHCx) 5972 ± 882 (AU) (74 pericitos, 3 ratones); HCxSS izquierda (LHCx) 6051 ± 845 (AU) (51 pericitos, 3 ratones); ns, no significativo en relación a la media de captación de la HCxSS derecha; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis test seguido de post-test, entre los grupos indicados por las barras horizontales.

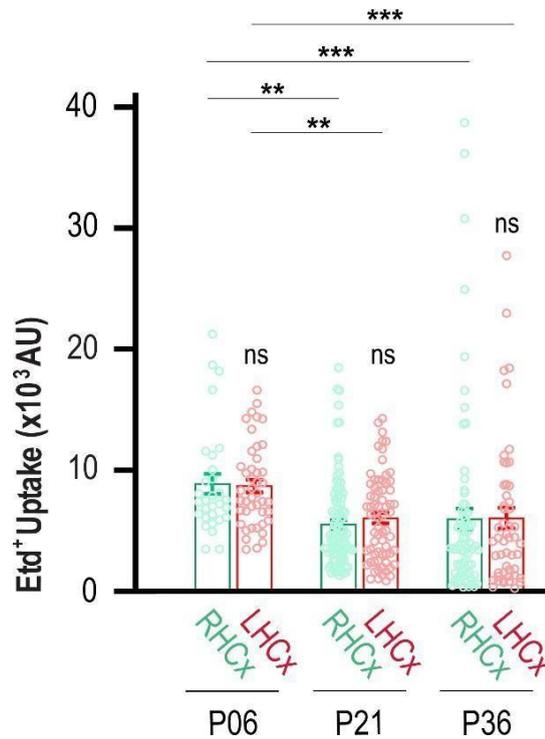


Figura 16 – La comunicación mediada por canales de gran poro entre los pericitos cerebrales corticales y el medio extracelular es mayor a edades más tempranas. El gráfico de barras representa la captación de bromuro de etidio en unidades arbitrarias (AU) a tres edades diferentes en ratones no deprivados. Se observa que la captación es significativamente mayor en el grupo P06 respecto al P21 manteniéndose estable durante edades más adultas (P35). No se obtuvieron cambios significativos de la captación de BrEtd entre las hemicortezas de la misma edad.

6. La regulación de la comunicación pericitaria mediada por la Panx1 depende de la duración de la deprivación sensorial

Para determinar si la duración de la deprivación sensorial podría afectar la regulación de la actividad de los canales de gran poro en los pericitos de las HCxSS derecha e izquierda o deprivada, incrementamos la duración de la remoción sensorial unilateral de 15 a 30 días iniciando esta deprivación el día 21 post-natal y comparamos sus efectos con los resultados obtenidos con la deprivación de 15 días (esquema en la Figura 17a). En el caso de la deprivación sensorial por 15 días, el grupo control de ratones WT no deprivados (a la edad de P36) no presentó diferencias significativas entre las medias de captación de los pericitos de ambas HCxSS encontrándose un valor de 1.02 ± 0.12 (Media \pm S.E.M.) (48 pericitos, 3 ratones) mientras que el grupo de ratones WT deprivados, presentó un índice de captación de 1.95 ± 0.16 (Media \pm S.E.M.) (53 pericitos, 3 ratones)

(Figura 17b). Cuando la deprivación duró 30 días comenzando el día 21 post-natal, en forma similar al caso anterior, la captación de colorante por los pericitos de los barriles de la capa IV en el grupo control de ratones WT no-deprivados (a la edad de P51), no presentó diferencias significativas entre ambas hemi-cortezas somato-sensoriales (izquierda y derecha) y en consecuencia el índice de captación Izquierda/Derecha correspondió a la unidad, a saber, 1.00 ± 0.06 (Media \pm S.E.M.) (99 pericitos, 4 ratones) mientras que en el grupo de ratones deprivados dicho índice fue mayor a la unidad ya que la captación de los pericitos de la HCxSS izquierda deprivada fue superior a la de la HCxSS derecha 1.3 ± 0.04 (Media \pm S.E.M.) (54 pericitos, 4 ratones), aunque en proporción significativamente menor que en el caso de una deprivación de 15 días, 1.95 ± 0.16 (Media \pm S.E.M.) (53 pericitos, 4 ratones); ns, no significativo, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis test seguido de post-test, entre los grupos indicados por las barras horizontales (Figura 17b).

Por lo tanto, aunque aumentar el tiempo de deprivación a 30 días desde un P21 sigue mostrando el mismo patrón de respuesta en la captación de BrEtd por los pericitos, esta respuesta disminuye en comparación con un periodo de deprivación menor (15 días desde P21). Esto podría deberse a que en la condición de 30 días de deprivación, ésta se realiza posteriormente al período crítico. Es interesante destacar que aún en un animal adulto, se continúa encontrando una respuesta a la deprivación sensorial. Por lo tanto, sería pertinente ampliar los experimentos evaluando, mediante captación de BrEtd, la expresión funcional de Panx1 en el adulto, luego del cierre del período crítico, a diferentes tiempos de deprivación, proponiendo posibles mecanismos de re-apertura del período crítico mediado vía Panx1, para continuar evaluando los mecanismos plásticos en el adulto.

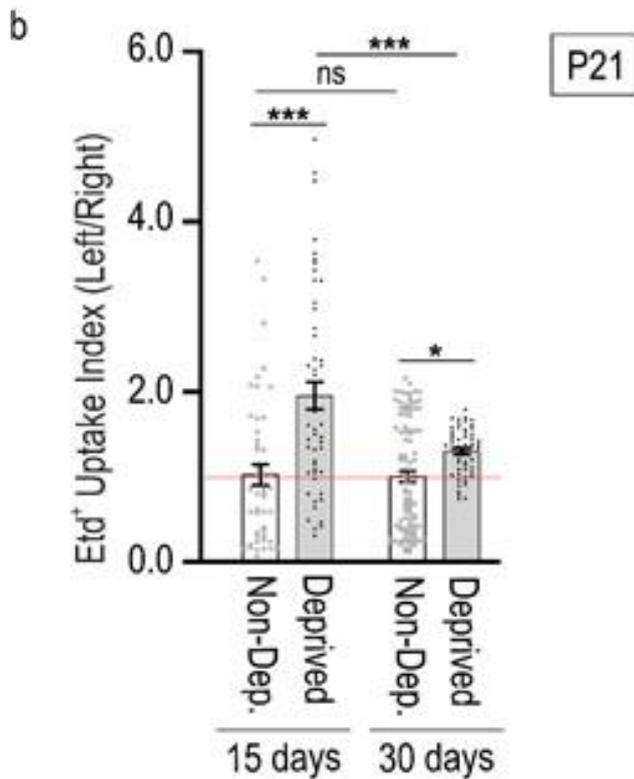
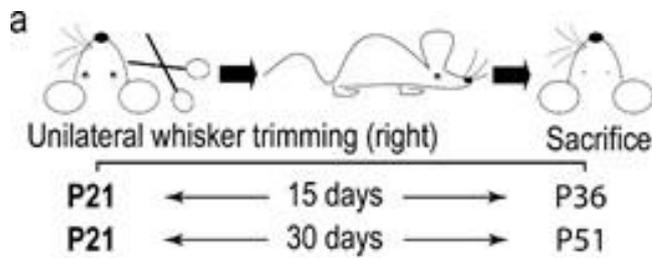
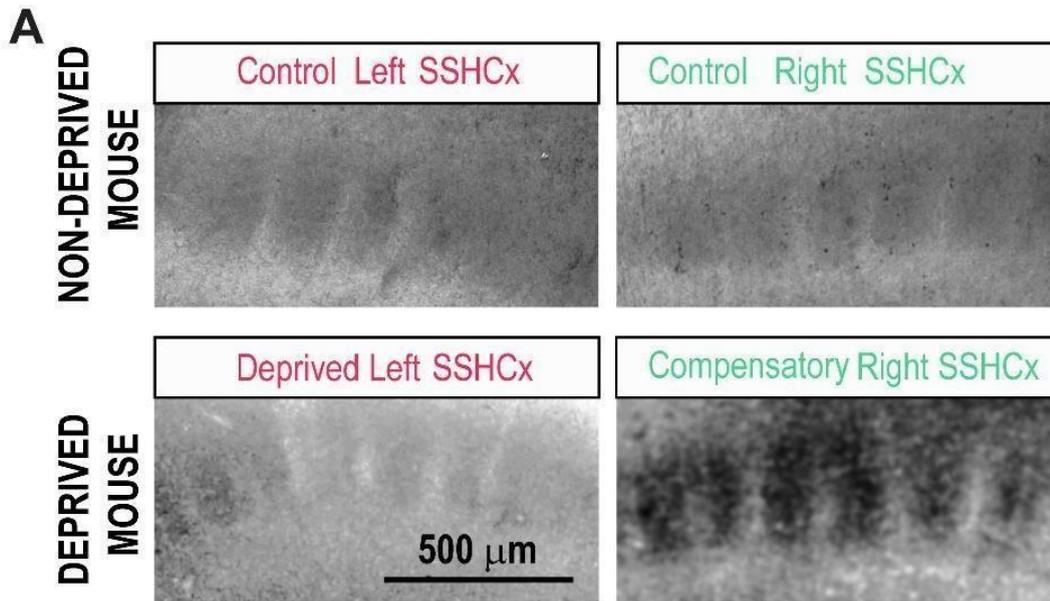


Figura 17 – El aumento de la duración (30 días) de la privación sensorial en el ratón se asocia a una disminución de la regulación de la comunicación pericitaria en comparación a una duración más breve (15 días). En (a) se representa un esquema del procedimiento empleado. En ambos casos la remoción unilateral de las vibras derechas comienza el día 21 post-natal. En el esquema superior en (a) se muestra el diseño experimental; en el mismo se ilustra la remoción de vibras de forma unilateral derecha, se dejan trascorrir 15 y 30 días desde el día P21 para dos grupos experimentales y se procede al sacrificio. En b se muestra un gráfico en el cual se representa el índice de captación I/D de BrEtd para las hemicortezas de los ratones privados y no privados.

7. La privación sensorial modula la actividad metabólica neuronal en los barriles de la capa IV de la CxSS

La privación sensorial unilateral determinará una disminución de la actividad neuronal en la HCxSS privada-izquierda y un aumento de dicha actividad en la HCxSS compensatoria-derecha; estos cambios en la actividad cerebral se traducirán en variaciones en el consumo metabólico cerebral. Para evidenciar si los cambios en la actividad de los plexones pericitarios corticales inducidos por la privación sensorial, se asocian a variaciones en el consumo neurometabólico, el cual depende a su vez de la actividad neuronal, estimamos el metabolismo neuronal en las distintas condiciones experimentales estudiadas. Mediante la técnica histoquímica de la citocromo-C-oxidasa evaluamos la actividad mitocondrial, y de forma indirecta la actividad metabólica celular en la capa IV de la CxSS. Como ya mencionamos, la capa IV de la CxSS, está formada mayoritariamente por neuronas estrelladas que se agrupan conformando los barriles que constituyen el último relevo de la vía sensorial táctil del roedor. Tal como esperábamos, evidenciamos una disminución de la actividad metabólica neuronal en la HCxSS privada izquierda respecto a la HCxSS derecha en el grupo sometido a privación sensorial, no obtuvimos diferencias entre las HCxSS izquierda y derecha del grupo control. En la Figura 18A se ilustran las HCxSS controles y privadas, dichas imágenes muestran que la HCxSS privada-izquierda presenta mayor luminosidad respecto a la HCxSS derecha, la cual aumenta su intensidad de color oscuro por mayor reacción con la citocromo-C-oxidasa. Este resultado revela un aumento del consumo neurometabólico por las neuronas de los barriles de la HCxSS compensatoria-derecha, y una disminución del mismo por las neuronas correspondientes a la HCxSS privada-izquierda. Se representan de forma gráfica estos resultados como el índice metabólico (I/D) para los grupos control, 1.06 ± 0.1 (Media \pm S.E.M.) (15 barriles, 3 ratones controles y 3 ratones privados) y privado, 0.6 ± 0.05 (Media \pm S.E.M.) (53 barriles, 5 ratones controles y 5 ratones privados), encontrándose una disminución significativa del 43% de este índice en el grupo privado ($p < 0.001$, Mann-Whitney test).



B

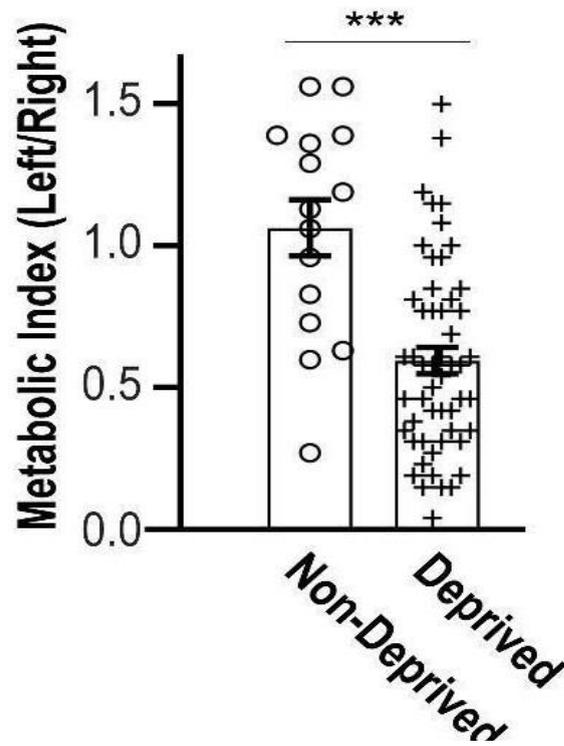


Figura 18 - La privación sensorial determina una disminución del metabolismo celular en la HCxSS izquierda y un aumento en la HCxSS derecha. (A) Fotografías de microscopía de luz confocal de la capa IV de la CxSS identificando los barriles mediante la técnica histoquímica de la citocromo-C-oxidasa. (B) Se grafica el índice metabólico (I/D) en los grupos privado y control (p < 0.001, Mann-Whitney test).**

6. Discusión

En este trabajo, se estudió la interacción pericito-neurona, a través de hemicanales de Panx1 expresados en pericitos cerebrales de la corteza somato-sensorial, y se determinó su regulación en un modelo de plasticidad dependiente de la experiencia, durante el desarrollo.

Inicialmente, se evidenció que los pericitos de la corteza somato-sensorial del ratón, se identifican mediante el marcador nuclear fluorescente TO-PRO-3 (642/661). En trabajos publicados por el equipo de trabajo del laboratorio donde se desarrolló esta tesis y de los cuales soy coautora, se evidenció que los pericitos son identificados con TO-PRO-3 ya que captan este fluoróforo de forma específica cuando están vivos en la corteza somatosensorial, el hipocampo y la retina mediante un transporte activo aún no determinado (Mai y cols., 2021a y 2021b). Así, los pericitos positivos para TO-PRO-3 colocalizan con inmunomarcadores de los pericitos tales como NG2 y PDGFRbeta y capturan selectivamente el fluoróforo NeuroTrace 500/525 en rodajas agudas vivas, marcador específico de pericitos cerebrales (Damisah y cols., 2017). En la corteza somato-sensorial, los pericitos capturan el TO-PRO-3 de manera equivalente en distintas etapas del desarrollo (Figura 18).

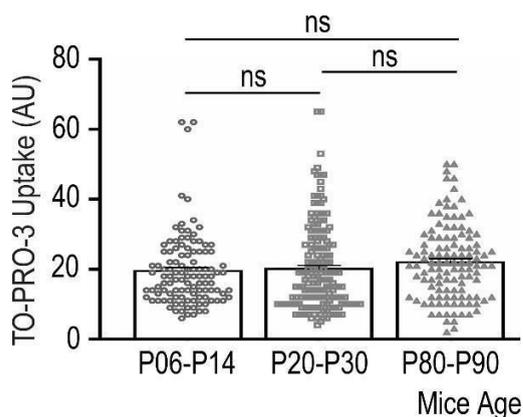


Figura 19 - Captación de TO-PRO-3 por pericitos cerebrales de ratón a diferentes edades. En el gráfico, se ilustra la captación de TO-PRO-3 (media \pm SEM) en unidades arbitrarias (AU), por pericitos de rodajas de hipocampo, derivadas de ratones de diferentes edades (P06-P14, $n = 4$ ratones; P20-P30, $n = 3$ ratones; P80-P90, $n = 3$ ratones). ns, no significativo, Kruskal–Wallis-test seguido por Dunn post-test. Cada punto representa la captación de TO-PRO-3 por un pericito individual. Tomado de Mai-Morente y cols., 2021a.

También se evidenció que los pericitos TO-PRO-3 positivos se encuentran adyacentes a la microvasculatura, especialmente a vasos de pequeño calibre (5-10 μm) y provistos de una capa discontinua de músculo liso, características compatibles con capilares. Debido a que las paredes de los capilares están formadas fundamentalmente por endotelio, los mismos no pueden regular su diámetro por sí mismos. Dada la disposición de los pericitos y sus prolongaciones que rodean los capilares, y al disponer de miofibrillas contráctiles, este tipo celular es el indicado para modular el calibre capilar conforme a las señales del ambiente.

En esta tesis comprobamos además que, en condiciones basales, los pericitos interactúan con el medio extracelular a través de una vía mediada por canales de gran poro cuya naturaleza molecular está compuesta por la panexina1. En otras palabras, en condiciones basales, los pericitos corticales expresan panexones funcionales que comunican el citosol con el entorno cerebral circundante. Esta comprobación se fundamenta en los siguientes hallazgos: (1) en condiciones basales, los pericitos corticales capturan el BrEtd, un fluoróforo de tamaño relativamente grande, tanto en abordajes *ex vivo* (rodajas agudas cerebrales) como en condiciones *in vivo* (animal despierto) (ver Figuras 12 y 13); (2) la captación del marcador BrEtd por los pericitos corticales disminuyó significativamente en presencia de un inhibidor específico de panexones, el péptido mimético ¹⁰Panx1 cuando éste fue aplicado en la solución fisiológica (aCSF) que perfunde las rodajas cerebrales agudas (ver Figura 13); (3) en los pericitos corticales de los ratones knockout globales para la Panx1 (Panx1^{-/-}) se evidenció una menor captación de BrEtd en comparación con los pericitos cerebrales de las cortezas somato-sensoriales de los ratones salvajes o silvestres (WT) (ver Figuras 12) y finalmente (4) detectamos la proteína panexina1 en la membrana de los pericitos cerebrales de la CxSS mediante inmunohistoquímica (ver Figura 11). Estos hallazgos además fueron concordantes con aquellos obtenidos por nuestro laboratorio en pericitos del hipocampo en rodajas cerebrales agudas (*ex vivo*) o en el animal despierto (*in vivo*).

En este proyecto se evidenció además que la interacción del pericito con el medio extracelular a través de canales de gran poro depende del estadio del desarrollo. Esto se basa en el hecho de que a edades tempranas (P06), la captación de BrEtd por los pericitos de la CxSS fue mayor respecto a edades más avanzadas (P06, P21, P36) (ver Figura 16). Esto podría explicarse por el patrón de expresión reportado para la Panx1 en el cerebro durante el desarrollo. La Panx1 inicia su expresión en el embrión (E14), incrementándose a edades postnatales (hasta P15), para disminuir en el animal adulto (P20-30) y estabilizarse (Bruzzone y cols., 2003; Vogt y cols., 2005; Ray y cols., 2005). Los resultados obtenidos en este trabajo fueron consistentes a los descritos en los trabajos antedichos por lo que sugerimos que se expresa un número mayor de panexones funcionales en la membrana de los pericitos corticales en estadios postnatales tempranos (P06) en relación a etapas más tardías (P21 y P36). Mediante otros tipos de abordajes experimentales, se debería confirmar, si el aumento en la actividad de los panexones pericitarios de la CxSS en P06 evaluado por captación de colorante responde a un aumento en el número de panexones de Panx1 en la membrana pericitaria y/o a variaciones en las propiedades cinéticas de los canales tales como aumento del tiempo y/o de la frecuencia de apertura o de la conductancia individual de cada hemicanal o a todos ellos.

En esta tesis, demostramos además que la experiencia sensorial modula la expresión funcional de la Panx1 el número de panexones funcionales en la membrana de los pericitos de la CxSS y así la interacción pericito-medio extracelular y que dicha modulación es dependiente de la duración de la experiencia. Así, frente a la deprivación sensorial unilateral, se evidenció un incremento de captación de BrEtd por los pericitos de la corteza contralateral a las vibrisas removidas (corteza deprivada), por un aumento del número de panexones funcionales en los pericitos corticales, y una disminución de la captación de BrEtd por los pericitos de la corteza homolateral a la deprivación (hemicorteza derecha) por una reducción del número de panexones funcionales pericitarios en dicha corteza (ver Figura 14).

En la hemicorteza contralateral al recorte de las vibrisas (hemicorteza izquierda) se

observa una disminución del metabolismo neuronal (evidenciada por la disminución de la intensidad de la tinción para la citocromo-C-oxidasa en la (Figura 18) y un aumento en la actividad de los panexones funcionales pericitarios (Figura 14). Por su parte, los barriles de la capa IV de la HCxSS compensatoria u homolateral muestran un aumento del metabolismo neuronal (evidenciado por un incremento de la intensidad de la tinción para la citocromo-C-oxidasa en la Figura 18) y una reducción de la actividad de los panexones funcionales pericitarios (evidenciado por una inhibición de la captación de colorante por los pericitos corticales en la Figura 14). Esto sugiere que los panexones pericitarios corticales son capaces de sensor la actividad neuronal y responder a la misma mediante la regulación de su expresión funcional. Para ello, los panexones pericitarios deben decodificar la información de las neuronas corticales en cada HCxSS posiblemente mediante la liberación de neurotransmisores.

Además de evidenciar que la experiencia modula la comunicación pericito-medio extracelular mediada por panexones pericitarios, se demostró que dicha modulación es dependiente del desarrollo siendo mayor cuando se inicia a edades más tempranas (P06 vs P21). Se evidenció que el cambio en la comunicación pericito-medio extracelular, era mayor a menor edad post natal. Además de explicarse por una mayor expresión de la Panx1 en estadios tempranos como mencionamos anteriormente, esto se podría también corresponder con el cierre del período crítico; esta interpretación interesante y pertinente precisa mayor explicación. El cerebro en etapas post-natales, está caracterizado por períodos críticos dependientes de la experiencia, los cuales permiten el remodelamiento de los circuitos neuronales, durante los cuales los cambios plásticos circuitales se efectúan con mayor facilidad. El cierre de los períodos críticos es de importancia para establecer la madurez del sistema; de hecho, fallas durante este período contribuyen a patologías del neurodesarrollo. Durante las primeras semanas de vida post-natal en el ratón, la sinaptogénesis se desarrolla y se moldea de forma acelerada (Doll y Broadie, 2014). Estos períodos post-natales tempranos coinciden con la gran expresión de panexina1 en el cerebro cuya detección aumenta fundamentalmente en las 2 primeras semanas de vida a partir de la etapa embrionaria (Bruzzone y cols., 2003; Vogt y cols., 2005; Ray y cols., 2005) y con los hallazgos aquí descritos, que mostraron que (a) la comunicación mediada por la Panx1 en los pericitos

cerebrales es mayor a la edad P06 (vs P21 y P36) y (b) el impacto de la modulación de dicha comunicación por la experiencia también fue mayor cuando se inició a P06 (vs P21). En línea con la asociación temporal existente entre el cierre de los periodos críticos en etapas postnatales, la mayor expresión de panexina1 en el cerebro y nuestros hallazgos acerca de una regulación en la expresión funcional actividad de la panexina1 pericitaria, y considerando que, la sinaptogénesis precisan de un consumo metabólico elevado, podemos postular que la regulación de la panexina1 pericitaria por la experiencia juegue algún rol en la distribución de nutrientes por los capilares cerebrales corticales durante estas etapas para acompañar la actividad y el desarrollo neuronal. En este sentido, nos planteamos la siguiente pregunta:

¿Qué roles jugarían la expresión de los panexones de los pericitos corticales (capa IV-CxSS) y su modulación por la experiencia en la interfaz neurovascular?

Nuestra principal hipótesis, como ya sugerimos, es que la expresión y la funcionalidad de la Panx1 pericitaria regularían propiedades de la microvasculatura de manera tal de acoplar el aporte de nutrientes al estado metabólico de las neuronas de la CxSS durante la PDE según el estadio del desarrollo.

En primera instancia, postulamos que la panexina1 pericitaria participa de la regulación de la resistencia capilar cortical que tiene lugar durante la PDE para suministrar O₂ y nutrientes a las neuronas de acuerdo a su actividad (Figura 20).

De acuerdo a reportes recientes, los pericitos cerebrales contráctiles, estratégicamente ubicados en la interface neuro-vascular, regulan el aporte de energía al cerebro mediante ajustes en la resistencia capilar. Más allá de la controversia acerca de los mecanismos que acoplan la actividad y el FS, el intercambio metabólico hemato-encefálico tiene lugar en la red capilar; los capilares, principales responsables de la resistencia cerebrovascular (Hall y cols., 2014; Gould y cols., 2017), constituyen la fuente primordial de suministro de energía al cerebro. Los pericitos pericapilares contienen proteínas contráctiles (Peppiatt y cols., 2006; Hall y cols., 2014; Mishra y cols., 2017;

Kisler y cols., 2017; Kisler y cols., 2017; Nelson y cols., 2020; Kawamura y cols., 2003; Lacar y cols., 2012; Isasi y cols., 2019; Nortley y cols., 2019; Hartmann y cols., 2021; Ivanova y cols., 2021; Mai-Morente y cols., 2021) y son los únicos moduladores del calibre capilar; al contraerse o relajarse, ellos ajustan el diámetro (vasoconstricción/vaso-relajación respectivamente) y regulan el FS en la microcirculación y así el intercambio hemato-encefálico (disminuciones/aumentos respectivamente).

Evidencias crecientes indican que múltiples mecanismos subyacen la regulación del FS capilar. La vía final común para este control sería la modulación del Ca^{2+} intracelular, determinante del tono contráctil pericitario (Peppiatt y cols., 2006; Attwell y cols., 2010; Hall y cols., 2014; Pfeiffer y cols., 2020; Fredholm y cols., 2014; Wu y cols., 2003; Borysova y cols., 2013). Por su parte, el agente vasoactivo ATP incrementa el Ca^{2+} pericitario por estimulación de receptores purinérgicos catiónicos (activados por ligando) P2X1/7 y metabotrópicos (acoplados a proteína G) P2Y2/4/6 evocando así contracción capilar y aumento de la resistencia al FS (Peppiatt y cols., 2006; Kawamura y cols., 2003; Lacar y cols., 2012; Crawford y cols., 2011), pero este nucleótido también puede estimular la función de la actomiosina por activación de los P2X7r (Bao y cols., 2012). Como fue mencionado en la introducción, los panexones constituyen una vía dinámica para la liberación de ATP y entonces el número de panexones funcionales ajusta los niveles extracelulares de ATP en el microambiente cercano a dichos panexones. El ATP señala de forma autócrina y parácrina activando los canales de P2, los cuales activan cascadas de señalización celular, e incrementan los niveles de Ca^{2+} citoplasmático lo cual permitiría la contracción pericitaria (ver Figura 19).

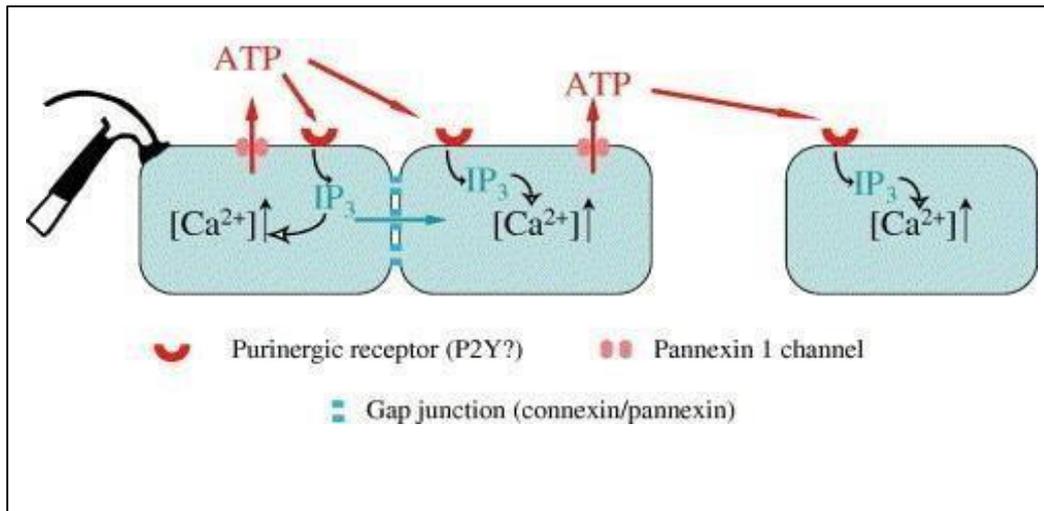


Figura 20 - En el esquema se representa la interacción entre los canales de Panx 1 y los P2 a partir de un estímulo mecánico. Tomado de Locovei y cols., 2005.

Experimentos realizados en nuestro laboratorio (Mai-Morente y cols., no publicado) muestran que los panexones pericitarios modulan la dinámica de Ca^{2+} en pericitos cerebrales. En pericitos cerebrales cultivados precargados con el indicador de Ca^{2+} Fura4/AM, el cierre de panexones por administración del péptido mimético $^{10}\text{Panx1}$, bloqueante específico de los panexones, inhibió el aumento del Ca^{2+} intracelular inducido por ATP exógeno sugiriendo que la Panx1 amplifica el incremento intrapericitario de Ca^{2+} . Consistentemente, encontramos que la Panx1 está implicada en la regulación del calibre capilar en el hipocampo por el ATP. El silenciamiento génico de la expresión de la panexina1 específicamente en pericitos de ratones condicionales $\text{Panx1}^{\text{fl/fl}}/\text{Cre}^+$ previno la disminución del calibre capilar cerebral provocada por ATP observada en rodajas hipocampales derivadas de ratones salvajes sugiriendo fuertemente que los canales de panexina1 expresados en la membrana de los pericitos cerebrales mediarían la regulación del FS capilar en respuesta a agentes vasoactivos.

En suma, proponemos que la panexina1 actúa como un reóstato que ajusta la resistencia capilar cerebral mediante la regulación del tono contráctil del pericito, de forma de acoplar las demandas neuronales al aporte neuro-metabólico. El signo de la modulación de la actividad de los panexones pericitarios, aumento o disminución, se asociaría inversamente al signo del cambio del diámetro del capilar, disminución (constricción) o

aumento (dilatación) respectivamente resultando en, disminución y aumento del flujo sanguíneo cerebral (Figura 21). Durante la activación neuronal aumentada que tiene lugar en la hemicorteza derecha durante la PDE, incrementos en las demandas metabólicas neuronales inhibirían los panexones en las áreas cerebrales activas, es decir, en la HCxSS derecha, disminuyendo la liberación de ATP y los niveles pericitarios de Ca^{2+} resultando en la relajación del pericito y la dilatación del capilar adyacente con el consiguiente aumento del flujo sanguíneo a ese nivel; vasodilatadores difusibles (de origen neuronal, astrocitario y/o endotelial), acoplarían la actividad neuronal al estado funcional de los panexones pericitarios. Por su parte, agentes constrictores, liberados por terminales nerviosas y/o por el endotelio en situación de baja demanda metabólica, de estrés o de injuria, abrirían los panexones pericitarios en la HCxSS izquierda o deprivada, amplificando la liberación de ATP e incrementando la concentración intracelular de Ca^{2+} y el tono contráctil pericitarios; estos hechos promoverían la contracción capilar, el aumento de la resistencia microvascular y la disminución del flujo sanguíneo.

En consistencia con estos antecedentes, reportes recientes indican que la Panx1 está implicada en la regulación del flujo sanguíneo en los grandes vasos de resistencia donde los panexones regulan el tono muscular vascular y el flujo sanguíneo. Las células endoteliales y de músculo liso vascular liberan el agente vasoactivo ATP a través de panexones funcionales (Lohman y cols., 2012; Lohman e Isakson, 2014; Gödecke y cols., 2012). Las purinas liberadas a través de panexones de células vasculares han sido implicadas en la regulación del tono y del flujo sanguíneo arteriales (Lohman y cols., 2015; Begandt y cols, 2017; Lohman e Isakson, 2014; Billaud y cols., 2011; Billaud y cols., 2012; Good y cols., 2018); en esta línea, se ha reportado que el eflujo de ATP por panexones expresados en células musculares lisas arteriales produce vasoconstricción en las arterias de resistencia por un efecto acoplado a receptores alfa1-adrenérgicos (Billaud y cols., 2011).

Si bien a la fecha no se cuenta con bibliografía que explique cambios a nivel pericitario dependientes de la experiencia, se han evidenciado cambios plásticos gatillados por la

experiencia en otros componentes de la unidad neurovascular tales como en la morfología astrocitaria o en la densidad microvascular por citar algunos ejemplos (Freitas-Andrade y cols., 2023; Lacoste y cols., 2014; Lacoste y Gu, 2015).

En el cerebro, el adecuado aporte metabólico por los capilares en respuesta a la actividad neuronal, depende, además de la regulación del flujo sanguíneo a este nivel, del adecuado desarrollo y de la preservación de la microvasculatura. En este sentido, la formación y la extensión de la microvasculatura durante el estadio embrionario y post-natal, coexisten con el desarrollo del sistema nervioso. Los mecanismos implicados en la comunicación entre ambos sistemas, vascular y nerviosa, continúan en investigación. En este sentido, los panexones pericitarios podrían jugar un rol en la regulación del flujo capilar durante la neurogénesis o en la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). En línea con esto, se sabe que las vías de señalización Panx1/ATP/purinérgica/pirimidinérgica regulan la neurogénesis y la angiogénesis; i.e., en los nervios periféricos, estas vías controlan la extensión, la ramificación y la densidad axonales (Horton y cols., 2017), mientras que en el sistema nervioso central (SNC), la Panx1 promueve la proliferación neuronal y la migración celular al interactuar con el citoesqueleto (Wicki-Stordeur y cols., 2012; Wicki-Stordeur y cols., 2013). En el sistema vascular, el ATP, el UTP y la adenosina inducen el control a largo plazo de la proliferación y migración de las células endoteliales (CEs) y células del músculo liso vascular (VSMs) (revisado en Burnstock, 2008; 2009) y fueron propuestos tempranamente como factores angiogénicos (Teuscher y Weidlich, 1985). Los principales efectos tróficos del ATP, UTP y ADP implican la estimulación de la síntesis de ADN y la proliferación celular de las VSMs durante el desarrollo embrionario y post-natal. En las CEs, la activación de los receptores purinérgicos P2Y promueve la migración (Kaczmarek y cols., 2005), la proliferación y la angiogénesis en parte a través de la regulación del VEGF (Burnstock, 2009; 2017; Cha y cols., 2000; Gerasimovskaya y cols., 2008; Rumjahn y cols., 2009; Gast y cols., 2011). Se han reportado efectos proliferativos y antiproliferativos de la adenosina en las células VSMs (revisado en Burnstock, 2009). En las CEs, la adenosina y el ATP aumentan la migración y la formación de tubos (Lutty y cols., 1998; Gerasimovskaya y cols., 2008), mientras que la adenosina estimula la proliferación, en parte a través del VEGF (Grant y cols., 1999). De esta forma, los canales de Panx1 se presentan como vías potenciales

para liberar moléculas con efectos angiogénicos (ATP) y capaces de acoplar células neurales y endoteliales durante la angiogénesis cerebral.

Entonces, la mayor expresión de panexones pericitarios expresados en los pericitos corticales durante las primeras semanas de vida, podría relacionarse con la formación de vasos y la organización de la citoarquitectura microvascular durante este periodo, indispensable para el correcto desarrollo del sistema nervioso.

6. Conclusiones y perspectivas

En esta tesis se evidenció que los pericitos pericapilares de la corteza somato-sensorial del ratón expresan la proteína Panx1, la cual oligomeriza formando hemicanales funcionales, que están abiertos en condiciones basales, en preparados ex vivo e in vivo. Se evidenció que el intercambio entre el medio extracelular y el pericito fue dependiente del desarrollo, siendo mayor a edades más tempranas.

La experiencia (mediante deprivación sensorial unilateral), se asoció con un aumento del intercambio medidado por Panx1 entre el pericito y el medio extracelular en la hemicorteza contralateral; contrariamente, en la corteza no deprivada, se evidenció una disminución en dicha comunicación. Estos efectos fueron mayores a edades más tempranas, y de menor magnitud cuando se aumentó la duración de la deprivación.

Los cambios a nivel del intercambio pericito-extracelular y de la actividad neuronal frente a la deprivación sensorial, se podrían explicar por los cambios plásticos dependientes de la experiencia siendo los primeros, debido a la variación en la expresión funcional de los hemicanales de Panx1. Sugerimos que la experiencia modelaría la expresión funcional de los canales de Panx1 en pericitos, en respuesta a la demanda metabólica a partir de la actividad neuronal.

Se plantea como parte de las perspectivas de este proyecto, investigar los mecanismos que subyacen la regulación de la panexina1 pericitaria, y si esta regulación afecta el estado contráctil de los pericitos pericapilares, y de esta forma, la resistencia de la red capilar cerebral el cual debe adaptarse a la funcionalidad cerebral.

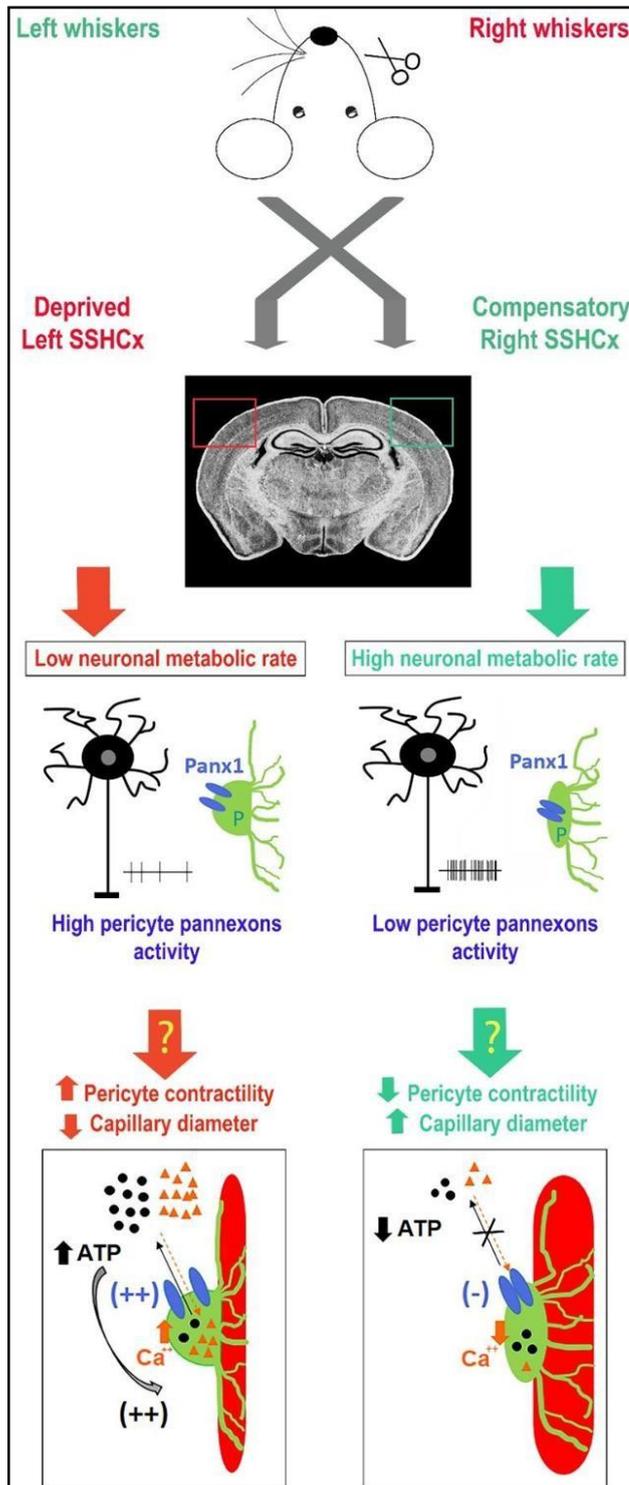


Figura 21 – Secuencia de eventos gatillados por la PDE sensorial que tendrían lugar en los barriles de la capa IV de la HCxSS a partir de la modulación de los panexones corticales.

Bibliografía

1. Abudara V, Retamal MA, Del Rio R, Orellana JA. Synaptic Functions of Hemichannels and Pannexons: A Double-Edged Sword. *Front Mol Neurosci*. 2018 Dec 4;11:435. doi: 10.3389/fnmol.2018.00435.
2. Allene C., Cossart R. Early NMDA receptor-driven waves of activity in the developing neocortex: physiological or pathological network oscillations? *J Physiol*. 2010 Jan 1;588(Pt 1):83-91. doi: 10.1113/jphysiol.2009.178798.
3. Angelika Vogt A., Hormuzdi S., Monyer H. Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Nov 18;141(1):113-20. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.08.002. Epub 2005 Sep 6. PMID: 16143426 DOI: 10.1016/j.molbrainres.2005.08.002
4. Arnold T., Betsholtz C. Correction: The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc Cell*. 2013 Jun 25;5(1):12. doi: 10.1186/2045-824X-5-12.
5. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*.(2010)Nov 11;468(7321):232-43. doi: 10.1038/nature09613. Review.
6. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):232-43. doi: 10.1038/nature09613.
7. Attwell D. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*. 2014 Apr 3;508(7494):55-60. doi: 10.1038/nature13165.
8. Bao BA, Lai CP, Naus CC, Morgan JR. Pannexin1 drives multicellular aggregate compaction via a signaling cascade that remodels the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2012 Mar 9;287(11):8407-16. doi:

10.1074/jbc.M111.306522.

9. Barth A L., McKenna M., Glazewski S., Hill P., Impey S., Storm D., Fox K. Upregulation of cAMP response element-mediated gene expression during experience-dependent plasticity in adult neocortex. *J Neurosci*. 2000 Jun 1;20(11):4206-16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-11-04206.2000.
10. Bautch V., James J. Neurovascular development: The beginning of a beautiful friendship. *Cell Adh Migr*. 2009 Apr-Jun;3(2):199-204. doi: 10.4161/cam.3.2.8397.
11. Bavelier D., Levi D., Li R., Dan Y., Hensch Y. Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *J Neurosci*. 2010 Nov 10;30(45):14964-71. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4812-10.2010.
12. Begandt D, Good ME, Keller AS, DeLalio LJ, Rowley C, Isakson BE, Figueroa XF. Pannexin channel and connexin hemichannel expression in vascular function and inflammation. *BMC Cell Biol*. 2017 Jan 17;18(Suppl 1):2. doi: 10.1186/s12860-016-0119-3.
13. Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone B, Mayshar Y, Yan H, Gu G. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature*. 2014 May 22;509(7501):507-11. doi: 10.1038/nature13324.
14. Bennett MV, Zukin RS. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain *Neuron*2004 Feb 19;41(4):495-511. doi: 10.1016/s0896-6273(04)00043-1.

15. Billaud M, Lohman AW, Straub AC, Looft-Wilson R, Johnstone SR, Araj CA, Best AK, Chekeni FB, Ravichandran KS, Penuela S, Laird DW, Isakson BE. Pannexin1 regulates α 1-adrenergic receptor- mediated vasoconstriction. *Circ Res*. 2011 Jun 24;109(1):80-5. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237594.
16. Billaud M, Sandilos JK, Isakson BE. Pannexin 1 in the regulation of vascular tone. *Trends Cardiovasc Med*. 2012 Apr;22(3):68-72. doi: 10.1016/j.tcm.2012.06.014.
17. Bisht K, Okojie KA, Sharma K, Lentferink DH, Sun YY, Chen HR, Uweru JO, Amancherla S, Calcuttawala Z, Campos-Salazar AB, Corliss B, Jabbour L, Benderoth J, Friestad B, Mills WA 3rd, Isakson BE, Tremblay MÈ, Kuan CY, Eyo UB. Capillary-associated microglia regulate vascular structure and function through PANX1-P2RY12 coupling in mice. *Nat Commun*. 2021 Sep 6;12(1):5289. doi: 10.1038/s41467-021-25590-8.
18. Black J. E., Zelazny A. M, Greenough W. T., Capillary and mitochondrial support of neural plasticity in adult rat visual cortex. *Exp Neurol*. 1991 Feb;111(2):204-9. doi: 10.1016/0014-4886(91)90008-z.
19. Borysova L, Wray S, Eisner D, Burdyga T. How calcium signals in myocytes and pericytes are integrated across in situ microvascular networks and control microvascular tone. *Cell Calcium*. 2013 Sep;54(3):163-74. doi: 10.1016/j.ceca.2013.06.001.
20. Brecht M., Helmchen F., Petersen C., Poulet J., Staiger J. F., Luhmann H. J., Schwarz C., Progress in Neurobiology. *Eur J Neurosci*. Author manuscript; available in PMC 2013 May 1. Published in final edited form as: *Eur J Neurosci*. 2012 May; 35(10): 1540–1553. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08075.x
21. Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A. 2003 Nov 11;100(23):13644-9. doi: 10.1073/pnas.2233464100.
22. Burnstock G. Dual control of vascular tone and remodelling by ATP released from nerves and endothelial cells. *Pharmacol Rep.* 2008 Jan- Feb;60(1):12-20. Review.
23. Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res.* 2017 Jan 6;120(1):207-228. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309726. Review.
24. Cao Y., Langer R., Ferrara N. Targeting angiogenesis in oncology, ophthalmology and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2023 Jun;22(6):476-495. doi: 10.1038/s41573-023-00671-z.
25. Cha SH, Hahn TW, Sekine T, Lee KH, Endou H. Purinoceptor-mediated calcium mobilization and cellular proliferation in cultured bovine corneal endothelial cells. *Jpn J Pharmacol.* 2000 Mar;82(3):181-7.
26. Chakravarthy U, Gardiner TA, Anderson P, Archer DB, Trimble ER. The effect of endothelin 1 on the retinal microvascular pericyte. *Microvasc Res.* 1992 May;43(3):241-54. doi: 10.1016/0026-2862(92)90022-h.
27. Chakravarthy U, Gardiner TA, Archer DB, Trimble ER. Altered endothelin-1 induced contraction and second messenger generation in bovine retinal microvascular pericytes cultured in high glucose medium *Microvasc Res.*1992;43:241-254.
28. Cheung G, Chever O, Rouach N. Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. *Front Cell Neurosci.* 2014 Nov 4;8:348. doi: 10.3389/fncel.2014.00348.
29. Chiu, Y.H., X. Jin, C.B. Medina, S.A. Leonhardt, V. Kiessling, B.C. Bennett, S. Shu,

- L.K. Tamm, M. Yeager, K.S. Ravichandran, and D.A. Bayliss. 2017. A quantized mechanism for activation of pannexin channels. *Nat. Commun.* 8:14324. <https://doi.org/10.1038/ncomms14324>.
30. Coelho-Santos V., Shih AY. Postnatal development of cerebrovascular structure and the neurogliovascular unit. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2020 Mar;9(2):e363. doi: 10.1002/wdev.363.
31. Contreras JE, Sánchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Klaus Willecke K, Feliksas F, Bukauskas F, Bennett MVL, Sáez JC. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):495-500. doi: 10.1073/pnas.012589799.
32. Cotman CW, Nieto-Sampedro M. Cell biology of synaptic plasticity. *Science* . 1984 Sep 21;225(4668):1287-94. doi: 10.1126/science.6382610.
33. Cox SB, Woolsey TA, Rovainen CM. Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrels. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993 Nov;13(6):899-913. doi: 10.1038/jcbfm.1993.113.
34. Crawford C, Kennedy-Lydon TM, Callaghan H, Sprott C, Simmons RL, Sawbridge L, Syme HM, Unwin RJ, Wildman SS, Peppiatt-Wildman CM. Extracellular nucleotides affect pericyte-mediated regulation of rat in situ vasa recta diameter. *Acta Physiol (Oxf).* 2011 Jul;202(3):241-51. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02310.x.
35. Dahl G. ATP release through pannexon channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 Jul 5;370(1672):20140191. doi: 10.1098/rstb.2014.0191.

36. Damisah EC, Hill RA, Tong L, Murray KN, Grutzendler J. A fluoro-Nissl dye identifies pericytes as distinct vascular mural cells during in vivo brain imaging. *Nat Neurosci*. 2017 Jul;20(7):1023-1032. doi: 10.1038/nn.4564.
37. Daneman R., Zhou L., Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010 Nov 25;468(7323):562-6. doi: 10.1038/nature09513.
38. Diamond M E., Armstrong-James M., Ebner F F. Experience-dependent plasticity in adult rat barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 1;90(5):2082-6. doi: 10.1073/pnas.90.5.2082.
39. Eichmann A., Thomas JL. Molecular parallels between neural and vascular development. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Jan 1;3(1):a006551. doi: 10.1101/cshperspect.a006551.
40. ElAli A, Thériault P, Rivest S. The role of pericytes in neurovascular unit remodeling in brain disorders. *Int J Mol Sci*. 2014 Apr 16;15(4):6453-74. doi: 10.3390/ijms15046453.
41. Erzurumlu R y Gaspar P. Development and Critical Period Plasticity of the Barrel Cortex. *Eur J Neurosci*. Author manuscript; available in PMC 2013 May 1. Published in final edited form as:*Eur J Neurosci*. 2012 May; 35(10): 1540–1553. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08075.x
42. Feldmeyer D., I Brecht M., Helmchen F., Petersen C., Poulet J., Staiger J., Luhmann H., Schwarz C. Barrel cortex function. *Prog Neurobiol*. 2013 Apr;103:3-27. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.11.002. Epub 2012 Nov 27.
43. Fernández-Klett F, Offenhauser N, Dirnagl U, Priller J, Lindauer U. Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 21;107(51):22290-5. doi: 10.1073/pnas.1011321108.

44. Fernández-Klett F, Priller J. Diverse functions of pericytes in cerebral blood flow regulation and ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015 Jun;35(6):883-7. doi: 10.1038/jcbfm.2015.60.
45. Fox K. A critical period for experience-dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex. *J Neurosci.* 1992 May;12(5):1826-38. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-05-01826.1992.
46. Figares M, Marset MV, Mai-Morente S., Abudara V. Modulación de manexones y conexones pericitarios por sustancias vasoactivas. Proyecto PAIE 2017.
47. Finnerty GT., Roberts LS., Connors WB. Sensory experience modifies the short-term dynamics of neocortical synapses. *Nature.* 1999 Jul 22;400(6742):367-71. doi: 10.1038/22553.
48. Flores-Muñoz C., García-Rojas F., Pérez M.A, Santander O., Mery E., y cols. The Long-Term Pannexin 1 Ablation Produces Structural and Functional Modifications in Hippocampal Neurons. *Cells* 2022 Nov 17;11(22):3646. doi: 10.3390/cells11223646.
49. Fredholm BB. Adenosine--a physiological or pathophysiological agent? *J Mol Med (Berl).* 2014 Mar;92(3):201-6. doi: 10.1007/s00109-013-1101-6.
50. Gajardo, I.; Salazar, C.S.; Lopez-Espíndola, D.; Estay, C.; Flores-Muñoz, C.; Elgueta, C.; Gonzalez- Jamett, A.M.; Martínez, A.D.; Muñoz, P.; Ardiles, Á.O. Lack of Pannexin 1 Alters Synaptic GluN2 Subunit Composition and Spatial Reversal Learning in Mice. *Front. Mol. Neurosci.* 2018, 11,114.
51. Garré JM, Retamal MA, Cassina P, Barbeito L, Bukauskas FF, Sáez JC, Bennett MVL, Abudara V. FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Dec 28;107(52):22659-64. doi: 10.1073/pnas.1013793107.
52. Gast RE, König S, Rose K, Ferenz KB, and Kriegelstein J. Binding of ATP to vascular

- endothelial growth factor isoform VEGF-A165 is essential for inducing proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *BMC Biochem.* 2011 May 27;12:28. doi: 10.1186/1471-2091-12-28.
53. Gerasimovskaya EV, Woodward HN, Tucker DA, Stenmark KR. Extracellular ATP is a pro- angiogenic factor for pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells. *Angiogenesis.* 2008;11(2):169-82.
54. Giaume C, Naus CC, Sáez JC, Leybaert L. Glial Connexins and Pannexins in the Healthy and Diseased Brain. *Physiol Rev.* 2021 Jan 1;101(1):93-145. doi: 10.1152/physrev.00043.2018.
55. Glazewski S., Barth AL. Stimulus intensity determines experience-dependent modifications in neocortical neuron firing rates. *Eur J Neurosci.* 2015 Feb;41(4):410-9. doi: 10.1111/ejn.12805.
56. Glazewski S., McKenna M, Jacquin M., Fox K. Experience-dependent depression of vibrissae responses in adolescent rat barrel cortex. *Eur J Neurosci.* 1998 Jun;10(6):2107-16. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00222.x.
57. Gödecke S, Roderigo C, Rose CR, Rauch BH, Gödecke A, Schrader J. Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012 Mar 15;302(6):C915-23. doi: 10.1152/ajpcell.00283.2010.
58. Gordon SR, Essner E. Actin, myosin, and laminin localization in retinal vessels of the rat. *Cell Tissue Res.* 1986;244(3):583-9. doi: 10.1007/BF00212537.
59. Good ME, Eucker SA, Li J, Bacon HM, Lang SM, Butcher JT, Johnson TJ, Gaykema RP, Patel MK, Zuo Z, Isakson BE. Endothelial cell Pannexin1 modulates severity of ischemic stroke by regulating cerebral inflammation and myogenic tone. *JCI Insight.* 2018 Mar 22;3(6):e96272. doi: 10.1172/jci.insight.96272.
60. Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Apr;4(4):285-94. doi: 10.1038/nrm1072.

61. Gould G., P. Tsai, D. Kleinfeld, A. Linninger, The capillary bed offers the largest hemodynamic resistance to the cortical blood supply. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 52–68 (2017). doi:10.1177/0271678X16671146.
62. Graham R. Campbell & Don J. Mahad A Method to Detect Cytochrome c Oxidase Activity and Mitochondrial Proteins in Oligodendrocytes. Protocol First Online: 01 March 2019
63. Grant MB, Tarnuzzer RW, Caballero S, Ozeck MJ, Davis MI, Spoerri PE, Feoktistov I, Biaggioni I, Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells. *Circ Res.* 1999 Oct 15;85(8):699-706.
64. Hagan N., Ben-Zvi A. The molecular, cellular, and morphological components of blood-brain barrier development during embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Feb;38:7-15. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.12.006.
65. Haigh J, Morelli P., Gerhardt H., Haigh K., Tsien J., Damert A., Miquerol L., Muhner U, Klein R, Ferrara N, Wagner E, Betsholtz C, Nagy A. Cortical and retinal defects caused by dosage- dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev Biol.* 2003 Oct 15;262(2):225-41. doi: 10.1016/s0012-1606(03)00356-7.
66. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 2014 Apr 3;508(7494):55-60. doi: 10.1038/nature13165.
67. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Lia A, Di Spiezio A, Speggiorin M, Zonta M. Two decades of astrocytes in neurovascular coupling. *Front Netw Physiol.* 2023 Apr 3;3:1162757. doi: 10.3389/fnetp.2023.1162757.
68. Harauzov A., Spolidoro M., DiCristo G., De Pasquale R., Cancedda L., Pizzorusso T., Viegi A., Berardi N., Maffei L. Reducing intracortical inhibition in the adult visual

cortex promotes ocular dominance plasticity. *J Neurosci*. 2010 Jan 6;30(1):361-71. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2233-09.2010.

69. Harb R, Whiteus C, Freitas C, Grutzendler J. In vivo imaging of cerebral microvascular plasticity from birth to death. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013 Jan;33(1):146-56. doi: 10.1038/jcbfm.2012.152.
70. Harik SI, Hall AK, Richey P, Andersson L, Lundahl P, Perry G. Ontogeny of the erythroid/HepG2- type glucose transporter (GLUT-1) in the rat nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*. 1993 Mar 19;72(1):41-9. doi: 10.1016/0165-3806(93)90157-6.
71. Harris R., Woolsey TA. Dendritic plasticity in mouse barrel cortex following postnatal vibrissa follicle damage. *J Comp Neurol*. 1981 Mar 1;196(3):357-76. doi: 10.1002/cne.901960302.
72. Hartmann DA, Berthiaume AA, Grant RI, Harrill SA, Koski T, Tieu T, McDowell KP, Faino AV, Kelly AL, Shih AY. Brain capillary pericytes exert a substantial but slow influence on blood flow. *Nat Neurosci*. Author manuscript; available in PMC 2021 Aug 18. Published in final edited form as: *Nat Neurosci*. 2021 May; 24(5): 633645. Published online 2021 Feb18. doi: 10.1038/s41593-020-00793-2
73. He L., Wu LG. The debate on the kiss-and-run fusion at synapses *Trends Neurosci*. 2007 Sep;30(9):447-55. doi: 10.1016/j.tins.2007.06.012.
74. Horton SM, Luna Lopez C, Blevins E, Howarth H, Weisberg J, Shestopalov VI, Makarenkova HP, Shah SB. Pannexin 1 Modulates Axonal Growth in Mouse Peripheral Nerves. *Front Cell Neurosci*. 2017 Nov 22;11:365. doi: 10.3389/fncel.2017.00365.
75. Houweling A., Brecht M. Behavioural report of single neuron stimulation in somatosensory cortex. *Nature*. 2008 Jan 3;451(7174):65-8. doi: 10.1038/nature06447.

76. Huang Y, Grinspan JB, Abrams CK, Scherer S. Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional gap junctions. *Glia*. 2007 Jan 1;55(1):46-56. doi: 10.1002/glia.20435.
77. Iglesias R, Dahl G, Qiu F, Spray D, Scemes E. Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels". *J Neurosci*. 2009 May 27;29(21):7092-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6062-08.2009.
78. Irigoyen Juan "Interacción neurona-pericito en una situación de elevada demanda metabólica: caracterización, mecanismos e implicancia" Testis de maestría – PROINBIO - 2022
79. Isasi E, Korte N, Abudara V, Attwell D, Olivera-Bravo S. Glutaric Acid Affects Pericyte Contractility and Migration: Possible Implications for GA-I Pathogenesis. *Mol Neurobiol*. 2019 Nov;56(11):7694-7707. doi: 10.1007/s12035-019-1620-4.
80. Ivanova E, Corona C, Eleftheriou CG, Bianchimano P, Sagdullaev BT. Retina-specific targeting of pericytes reveals structural diversity and enables control of capillary blood flow. *J Comp Neurol*. 2021 Apr 15;529(6):1121-1134. doi: 10.1002/cne.25011.
- Jensen y Killackey. Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. II. The altered morphology of thalamocortical afferents following neonatal infraorbital nerve cut. *J Neurosci*. 1987 Nov;7(11):3544-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.07-11-03544.1987.
81. Kaczmarek E1 , Erb L, Koziak K, Jarzyna R, Wink MR, Guckelberger O, Blusztajn JK, Trinkaus- Randall V, Weisman GA, Robson SC. Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb Haemost*. 2005 Apr;93(4):735-42.
82. Kawamura H, Kobayashi M, Li Q, Yamanishi S, Katsumura K, Minami M, Wu DM, Puro DG. *J Physiol*.(2004)Dec15;561(Pt 3):671-83. doi:

10.1001/archophth.1997.01100160451011.

83. Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, U Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R. Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science*. 2001 May 11;292(5519):1178- 80. doi: 10.1126/science.1060101.
84. Kawamura H, Sugiyama T, Wu DM, Kobayashi M, Yamanishi S, Katsumura K, Puro DG. ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *J Physiol*. 2003 Sep 15;551(Pt 3):787-99. doi: 10.1113/jphysiol.2003.047977.
85. Khazipov R., Luhmann HJ. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci*. 2006 Jul;29(7):414-418. doi: 10.1016/j.tins.2006.05.007.
86. Kisler K, Nelson AR, Rege SV, Ramanathan A, Wang Y, Ahuja A, Lazic D, Tsai PS, Zhao Z, Zhou Y, Boas DA, Sakadžić S, Zlokovic BV. Pericyte degeneration leads to neuro-vascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nat Neurosci*. 2017 Mar;20(3):406-416. doi: 10.1038/nn.4489.
87. Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic BV. Cerebral blood flow regulation and neuro- vascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2017 Jul;18(7):419-434. doi: 10.1038/nrn.2017.48.
88. Kossut M., Hand P. Early development of changes in cortical representation of C3 vibrissa following neonatal denervation of surrounding vibrissa receptors: a 2-deoxyglucose study in the rat. *Neurosci Lett*. 1984 Apr 20;46(1):7-12. doi: 10.1016/0304-3940(84)90190-3.

89. Lacar B, Herman P, Platel JC, Kubera C, Hyder F, Bordey A. Neural progenitor cells regulate capillary blood flow in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci*. 2012 Nov 14;32(46):16435-48. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1457-12.2012.
90. Lacoste B. Neuronal activity influences the development of blood vessels in the brain. *Med Sci (Paris)*. 2014 Dec;30(12):1063-6. doi: 10.1051/medsci/20143012003.
91. Lendvai B., Stern E A., Chen B., Svoboda K. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature*. 2000 Apr 20;404(6780):876-81. doi: 10.1038/35009107.
92. Li H, Liu TF, Lazrak A, Peracchia C, Goldberg GS, Lampe PD, Johnson RG. Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells *J Cell Biol*.(1996)Aug;134(4):1019-30.
93. Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S, Abramsson A, Enge M, Hellstrom M, Backstrom G, Fredriksson S, Landegren U, Nystrom H, Bergstrom G, Dejana E, Ostman A, Lindahl P, Betsholt. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall *Genes Dev*. 2003 Aug 1;17(15):1835-40. doi: 10.1101/gad.266803.PMID: 12897053 PMCID: PMC196228 DOI: 10.1101/gad.266803.
94. Lohman AW, Isakson BE. Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett*. 2014 Apr 17;588(8):1379-88. doi: 10.1016/j.febslet.2014.02.004. Review.
95. Lohman AW, Leskov IL, Butcher JT, Johnstone SR, Stokes TA, Begandt D, DeLalio LJ, Best AK, Penuela S, Leitinger N, Ravichandran KS, Stokes KY, Isakson BE. Pannexin 1 channels regulate leukocyte emigration through the venous endothelium during acute inflammation. *Nat Commun*. 2015 Aug 5;6:7965. doi: 10.1038/ncomms8965.

96. Lohman AW, Billaud M, Isakson BE. Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel Wall. *Cardiovasc Res.* 2012 Aug 1;95(3):269-80. doi: 10.1093/cvr/cvs187.
97. Lohman AW, Billaud M, Straub AC, Johnstone SR, Best AK, Lee M, Barr K, Penuela S, Laird DW, Isakson BE. Expression of pannexin isoforms in the systemic murine arterial network. *J Vasc Res.* 2012;49(5):405-16. doi: 10.1159/000338758.
98. Lübke J., Feldmeyer D. Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. *Brain Struct Funct.* 2007 Jul;212(1):3-17. doi: 10.1007/s00429-007-0144-2.
99. Luty GA, Mathews MK, Merges C, McLeod DS. Adenosine stimulates canine retinal microvascular endothelial cell migration and tube formation. *Curr Eye Res.* 1998 Jun;17(6):594- 607.
100. Ma S, Kwon H, Huang Z. A functional requirement for astroglia in promoting blood vessel development in the early postnatal brain. *PLoS One.* 2012;7(10):e48001. doi: 10.1371/journal.pone.0048001.
101. Mai-Morente SP. " Rol de los conexones y los panexones de los pericitos hipocampales en el intercambio a través de la barrera hematoencefálica". Tesis de doctorado –PEDECIBA 2022
102. Mai-Morente SP, Irigoyen JP, Carriquiry VM, Maset VM, Di Doménico M, Isasi E, Abudara V. Pericyte Mapping in Cerebral Slices with the Far-red Fluorophore TO-PRO-3. *Bio Protoc.* 2021 Nov 20;11(22):e4222. doi: 10.21769/BioProtoc.4222.
103. Mai-Morente SP, Isasi E., Rafael A, Olivera-Bravo S, Viturera N, Abudara V. Pericyte pannexin1 controls hippocampal capillary diameter and recognition

memory. (en revisión). Research Square, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3832782/v1>

104. Margaret T. T. Wong-Riley, Michael M. Merzenich and Patricia A. Leake. Press Changes in endogenous enzymatic reactivity to DAB induced by neuronal inactivity Department of Anatomy (M. T. T. W.-R.). Brain Research, 141 (1978) 185-192 Elsevier/North-Holland Biomedical Coleman Lab and Departments of Physiology and Otolaryngology, University of California, San Francisco, Calif. 94143 (U.S.A.) (Accepted August 31st, 1977)
105. Matsugi T, Chen Q, Anderson DR. Contractile responses of cultured bovine retinal pericytes to angiotensin II Arch Ophthalmol(1997a)Oct;115(10):1281-5.
106. Matsugi T, Chen Q, Anderson DR. Adenosine-induced relaxation of cultured bovine retinal pericytes Invest Ophthalmol Vis Sci.(1997b)Dec;38(13):2695-701.
107. Merzenich M M., Kaas J H., Wall J., Nelson R J., Sur M., Felleman D. Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. Neuroscience. 1983 Jan;8(1):33-55. doi: 10.1016/0306-4522(83)90024-6.
108. Michalski K, Syrjanen J, Henze E, Kumpf J, Furukawa H, Kawate T. The Cryo-EM structure of pannexin 1 reveals unique motifs for ion selection and inhibition. Elife. 2020 Feb 12;9:e54670. doi: 10.7554/eLife.54670.
109. Mink JW, Blumenschine RJ, Adams DB. Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. Am J Physiol. 1981 Sep;241(3):R203-12. doi: 10.1152/ajpregu.1981.241.3.R203.
110. Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine AV, Rusakov DA, Attwell D. Astrocytes mediate neuro-vascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. Nat Neurosci. 2016 Dec;19(12):1619-1627. doi: 10.1038/nn.4428.

Epub 2016 Oct 24. Erratum in: Nat Neurosci. 2017 Jul 26;20(8):1189. Erratum in: Nat Neurosci. 2020 Sep;23(9):1176.

111. Muramoto S, Yamada H, Sadato N, Kimura H, Konishi Y, Kimura K, Tanaka M, Kochiyama T, Yonekura Y, Ito H. Age-dependent change in metabolic response to photic stimulation of the primary visual cortex in infants: functional magnetic resonance imaging study. J Comput Assist Tomogr. 2002 Nov-Dec;26(6):894-901. doi: 10.1097/00004728-200211000-00007.
112. Nelson AR, Sagare MA, Wang Y, Kisler K, Zhao Z, Zlokovic BV. Channelrhodopsin Excitation Contracts Brain Pericytes and Reduces Blood Flow in the Aging Mouse Brain *in vivo*. Front Aging Neurosci. 2020 Apr 29;12:108. doi: 10.3389/fnagi.2020.00108.
113. Nortley R, Korte N, Izquierdo P, Hirunpattarasilp C, Mishra A, Jaunmuktane Z, Kyrargyri V, Pfeiffer T, Khenouf L, Madry C, Gong H, Richard-Loendt A, Huang W, Saito T, Saido TC, Brandner S, Sethi H, Attwell D. Amyloid β oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to pericytes. Science. 2019 Jul 19;365(6450):eaav9518. doi: 10.1126/science.aav9518.
114. Panchin Y, Kelmanson I, Matz M y cols. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. Curr Biol 10:473–474. 2000 [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00576-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00576-5).
115. Palacios-Prado N, Soto PA, López X, Choi EJ, Marquez-Miranda V, Rojas M, Duarte Y, Lee J, González-Nilo FD, Sáez JC. Endogenous pannexin1 channels form functional intercellular cell- cell channels with characteristic voltage-dependent properties. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 May 3;119(18):e2202104119. doi: 10.1073/pnas.2202104119.
116. Paredes I, Himmels P, Ruiz de Almodóvar C. Neurovascular Communication during CNS Development. Dev Cell. 2018 Apr 9;45(1):10-32. doi: 10.1016/j.devcel.2018.01.023.

117. Patel U. Non-random distribution of blood vessels in the posterior region of the rat somatosensory cortex. *Brain Res.* 1983 Dec 19;289(1-2):65-70. doi: 10.1016/0006-8993(83)90006-9.
118. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 2006 Nov 1;25(21):5071-82. doi: 10.1038/sj.emboj.7601378.
119. Penuela S, Gehi R, Laird D. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jan;1828(1):15-22. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.01.017.
120. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* 2006 Oct 12;443(7112):700-4. doi: 10.1038/nature05193.
121. Petersen C. The functional organization of the barrel cortex *Neuron.* 2007 Oct 25;56(2):339-55. doi: 10.1016/j.neuron.2007.09.017.
122. Petrus E., Saar G., Ma Z., Dodd S., Isaac J., Koretsky A. Interhemispheric plasticity is mediated by maximal potentiation of callosal inputs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Mar 26;116(13):6391-6396. doi: 10.1073/pnas.1810132116.
123. Pfeiffer T, Li Y, Attwell D. Diverse mechanisms regulating brain energy supply at the capillary level. *Curr Opin Neurobiol.* 2021 Aug;69:41-50. doi: 10.1016/j.conb.2020.12.010
124. Provis JM, Leech J, Diaz CM, Penfold PL, Stone J, Keshet E. Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression. *Exp Eye Res.* 1997 Oct;65(4):555-68. doi: 10.1006/exer.1997.0365.
125. Qu R, Dong L, Zhang J, et al. Cryo-EM structure of human heptameric Pannexin 1

channel. *Cell Res.* 2020;30:446–448. doi: 10.1038/s41422-020-0298-5.

126. Raab M, Neuhuber WL. Intraganglionic laminar endings and their relationships with neuronal and glial structures of myenteric ganglia in the esophagus of rat and mouse. *Histochem Cell Biol.* 2004 Nov;122(5):445-59. doi: 10.1007/s00418-004-0703-z.
127. Rash BG., Grove EA. Area and layer patterning in the developing cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol.* 2006 Feb;16(1):25-34. doi: 10.1016/j.conb.2006.01.004.
128. Raichle ME (1998). Behind the scenes of functional brain imaging: A historical and physiological perspective. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:765-772.
129. Ramachandran E, Frank R, Kennedy A. Effects of endothelin on cultured bovine retinal microvascular pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993 Mar;34(3):586-95.
130. Retamal MA, Schalper KA, Shoji KF, Orellana JA, Bennett MVL, Sáez JC. Possible involvement of different connexin43 domains in plasma membrane permeabilization induced by ischemia- reperfusion. *J Membr Biol.* 2007 Aug;218(1-3):49-63. doi: 10.1007/s00232-007-9043-y.
131. Reese TS, Karnovsky M. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol.* 1967 Jul;34(1):207-17. doi: 10.1083/jcb.34.1.207.
132. Robert E Sims, John B Butcher, H Rheinallt Parri, Stanislaw Glazewski . Astrocyte and Neuronal Plasticity in the Somatosensory System. *Neural Plast.* 2015;2015:732014. doi: 10.1155/2015/732014.
133. Ronggui Qu R, Dong L, Zhang J, Yu K, Wang L, Zhu S. Cryo-EM structure of human heptameric Pannexin 1 channel. *Cell Res.* 2020 May;30(5):446-448. doi: 10.1038/s41422-020-0298-5.
134. Roy C, Sherrington C. On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol.*

1890 Jan;11(1-2):85-158.17. doi: 10.1113/jphysiol.1890.sp000321.

135. Ruan Z, Orozco IJ, Du J, Lü W. Structures of human pannexin 1 reveal ion pathways and mechanism of gating. *Nature*. 2020;584(7822):646–651. doi: 10.1038/s41586-020-2357-y.
136. Rumjahn SM, Yokdang N, Baldwin KA, Thai J, Buxton IL. Purinergic regulation of vascular endothelial growth factor signaling in angiogenesis. *Br J Cancer*. 2009 May 5;100(9):1465-70. doi: 10.1038/sj.bjc.6604998.
137. Sá-Pereira I, Brites D, Brito M. Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Mol Neurobiol*. 2012 Apr;45(2):327-47. doi: 10.1007/s12035-012-8244-2.
138. Sáez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions *Physiol Rev*.(2003a)Oct;83(4):1359-400. doi: 10.1152/physrev.00007.2003.
139. Sáez JC, Contreras JE, Bukauskas FF, Retamal MA, Bennett MV. Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. *Acta Physiol Scand*.(2003b)Sep;179(1):9-22. doi: 10.1046/j.1365- 201X.2003.01196.x.
140. Segarra M., Aburto M.R, Hefendehl J., Acker-Palmer A., Neurovascular Interactions in the Nervous System. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2019 Oct 6:35:615-635. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100818-125142.
141. Simons D J., Land P W. Neonatal whisker trimming produces greater effects in nondeprived than deprived thalamic barreloids. *J Neurophysiol*. 1994 Sep;72(3):1434-7. doi: 10.1152/jn.1994.72.3.1434.
142. Simons DJ, Land PW. Early experience of tactile stimulation influences organization of somatic sensory cortex. *Nature*. 1987 Apr;326(6114):694-7. doi:

10.1038/326694a0.

143. Sims RE, Butcher J, Parri H, Glazewski S. Astrocyte and Neuronal Plasticity in the Somatosensory System. *Neural Plast.* 2015;2015:732014. doi: 10.1155/2015/732014.
144. Suchting S, Bicknell R., Eichmann A.M. Neuronal clues to vascular guidance. *Exp Cell Res.* 2006 Mar 10;312(5):668-75. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.11.009. Epub 2005 Dec 5.
145. Knudsen E. I. Early Experience and Sensitive Periods – Capitulo 22. Squire L., Bloom F.E., Spitzer N. C., du Lac S., Ghosh A., Berg D. *Fundamental Neuroscience*. Tercera edición. 2008 Elsevier. ISBN: 978-0-12-374019-9
146. Stern EA., Maravall M., Svoboda K. Rapid development and plasticity of layer 2/3 maps in rat barrel cortex in vivo. *Neuron.* 2001 Aug 2;31(2):305-15. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00360-9.
147. Steven M. Horton, Carlos Luna Lopez, Elisabeth Blevins, Holly Howarth, Jake Weisberg,¹ Valery I. Shestopalov, Helen P. Makarenkova, y Sameer B. Shah. Pannexin 1 Modulates Axonal Growth in Mouse Peripheral Nerves. *Front Cell Neurosci.* 2017; 11: 365. Published online 2017 Nov 22. doi: 10.3389/fncel.2017.00365
148. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci.* 1995 Jul;15(7 Pt 1):4738-47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-07-04738.1995.
149. Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M. H., Patlak, C. S., Pettigrew, K.

- D., Sakurada, O. and Shinohara, M. (1977). The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* 28, 897-916.
150. Suárez R., Gobius I., Richards L. Evolution and development of interhemispheric connections in the vertebrate forebrain. *Front Hum Neurosci.* 2014 Jul 14;8:497. doi: 10.3389/fnhum.2014.00497. ECollection 2014.
151. Sweeney M, Ayyadurai S, Zlokovic B. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci.* 2016 May 26;19(6):771-83. doi: 10.1038/nn.4288.
152. Tata M., Ruhrberg C., Fantin A. Vascularisation of the central nervous system. *Mech Dev.* 2015 Nov;138 Pt 1:26-36. doi: 10.1016/j.mod.2015.07.001.
153. Teuscher E., V. Adenosine nucleotides, adenosine and adenine as angiogenesis factors. *Biomed Biochim Acta.* 1985;44(3):493-5.
154. Tropea D., Van Wart A., Sur M. Molecular mechanisms of experience-dependent plasticity in visual cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009 Feb 12;364(1515):341-55. doi: 10.1098/rstb.2008.0269.
155. Van der Loos y Woolsey. Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. *Science.* 1973 Jan 26;179(4071):395-8. doi: 10.1126/science.179.4071.395.
156. Vanlandewijck M, He L, Mäe MA, Andrae J, Ando K, Del Gaudio F, Nahar K, Lebouvier T, Laviña B, Gouveia L, Sun Y, Raschperger E, Räsänen M, Zarb Y, Mochizuki N, Keller A, Lendahl U, Betsholtz C. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature.* 2018 Feb 22;554(7693):475-480. doi: 10.1038/nature25739.

157. Vannucci RC, Vannucci RJ. Glucose metabolism in the developing brain. *Semin Perinatol.* 2000 Apr;24(2):107-15. doi: 10.1053/sp.2000.6361.
158. Vogt A, Hormuzdi SG, Monyer H. Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005 Nov 18;141(1):113-20. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.08.002.
159. Wallace H., Fox K. Local cortical interactions determine the form of cortical plasticity. *J Neurobiol.* 1999 Oct;41(1):58-63.
160. Watanabe K, Kamatani D, Hishida R, Shibuki R. Timing-dependent effects of whisker trimming in thalamocortical slices including the mouse barrel cortex Niigata 951–8585, Japan. Accepted 10 February 2011 Available online 17 February 2011
161. Whitaker V., Cui L., Miller S., Yu S., Wei L. Whisker stimulation enhances angiogenesis in the barrel cortex following focal ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Jan;27(1):57- 68. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600318.
162. Whiteus C, Freitas C, Grutzendler J. Perturbed neural activity disrupts cerebral angiogenesis during a postnatal critical period. *Nature.* 2014 Jan 16;505(7483):407-11. doi: 10.1038/nature12821.
163. Whyte-Fagundes P, Zoidl G. Mechanisms of pannexin1 channel gating and regulation. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2018 Jan;1860(1):65-71. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.07.009.
164. Wiesel, Hubel. Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cats lateral geniculate body. *J Neurophysiol.* . 1963 Nov;26:978-93. doi: 10.1152/jn.1963.26.6.978.
165. Wiesel, Hubel. Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in

one eye. *J Neurophysiol.* 1963 Nov;26:1003-17. doi: 10.1152/jn.1963.26.6.1003.

166. Wiesel, Hubel. Receptive fields of cells in striate cortex of very young, visually inexperienced kittens. *J Neurophysiol.* 1963 Nov;26:994-1002. doi: 10.1152/jn.1963.26.6.994.
167. Wicki-Stordeur, L. E., Dzugalo, A. D., Swansburg, R. M., Suits, J. M., and Swayne, L. A. (2012). Pannexin 1 regulates postnatal neural stem and progenitor cell proliferation. *Neural Dev.* 2012 Jul 4;7:11. doi: 10.1186/1749-8104-7-11.
168. Wicki-Stordeur, L. E., and Swayne, L. A. (2013). Panx1 regulates neural stem and progenitor cell behaviours associated with cytoskeletal dynamics and interacts with multiple cytoskeletal elements. *Cell Commun Signal.* 2013 Aug 21;11:62. doi: 10.1186/1478-811X-11-62.
169. Woolsey TA. Some anatomical bases of cortical somatotopic organization. *Brain Behav Evol.* 1978;15(5-6):325-71. doi: 10.1159/000123786.
170. Wu DM, Kawamura H, Sakagami K, Kobayashi M, Puro DG. pericyte-containing retinal microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Jun;284(6):H2083-90. doi: 10.1152/ajpheart.01007.2002.
171. Wu DM, Kawamura H, Sakagami K, Kobayashi M, Puro DG. Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*(2003)Jun;284(6):H2083-90. DOI:10.1152/ajpheart.01007.2002
172. Yamada M, Huang Z, Dalkara T, Endres M, Laufs U, Waeber C, Huang PL, Liao JK, Moskowitz MA. Endothelial nitric oxide synthase-dependent cerebral blood flow augmentation by L-arginine after chronic statin treatment. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Apr;20(4):709-17. Doi: 10.1097/00004647-200004000-00008.
173. Yemisci M, Yasemin GURSOY-OZDEMIR Y, VURAL A, CAN A, TOPALKARA K, DALKARA T.

Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1031-7. doi: 10.1038/nm.2022.

174. Yeung AK, Patil CS, Jackson MF. Pannexin-1 in the CNS: Emerging concepts in health and disease. *J Neurochem.* 2020 Sep;154(5):468-485. doi: 10.1111/jnc.15004.

175. Yi-Jen Huang YJ, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper S. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 10;104(15):6436-41. doi: 10.1073/pnas.0611280104.

176. Zheng Ruan Z, Ian J Orozco IJ, Du J, Lü W. Structures of human pannexin 1 reveal ion pathways and mechanism of gating. *Nature.* 2020 Aug;584(7822):646-651. doi: 10.1038/s41586-020-2357-y.

177. Zheng Ruan Z, Ian J Orozco IJ, Du J, Lü W. Structures of human pannexin 1 reveal ion pathways and mechanism of gating. *Nature.* 2020 Aug;584(7822):646-651. doi: 10.

