

Informe final publicable de proyecto

Canales de panexina 1 acoplan la interfaz neuro-vascular en pericitos cerebrales

Código de proyecto ANII: FCE_1_2017_1_136103

24/03/2021

ABUDARA HAIM, Verónica (Responsable Técnico - Científico)

ISASI CAPELO, Eugenia Eloisa (Investigador)

MAI MORENTE, Sandra Paola (Investigador)

OLIVERA BRAVO, Silvia (Investigador)

VITUREIRA SERPA, Nathalia (Investigador)

BLANCO CÁMERA, Fabiana (Investigador)

IRIGOYEN TELLECHEA, Juan (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS. FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

Resumen del proyecto

En la interface neurovascular, los pericitos cerebrales contráctiles ajustan el diámetro capilar para acoplar el flujo sanguíneo local a las demandas metabólicas neuronales, fenómeno conocido como acoplamiento neurovascular: sus mecanismos moleculares y su regulación permanecen aún poco explorados.

Reportes recientes implican a canales de membrana de gran poro formados por panexina1-Panx1 (panexones) en la regulación de las interacciones neuro-gliovasculares y del tono muscular y flujo sanguíneo de los grandes vasos. Los panexones proporcionan una vía para transferir iones/moléculas (ingreso de Ca²⁺; liberación de ATP) entre los medios intracelular y extracelular.

Demostramos aquí que los pericitos pericapilares cerebrales expresan panexones funcionales capaces de mediar un intercambio molecular con el microentorno cerebral en ratones despiertos (in vivo), rodajas agudas (ex vivo) y cultivos primarios (in vitro). En condiciones control, dicho intercambio es mantenido por la secreción basal de ATP endógeno y receptores purinérgicos ionotrópicos P2X7(P2X7R) y metabotrópicos P2Y6(P2Y6R). El neurotransmisor glutamato, los receptores neuronales glutamatérgicos NMDA/AMPA, la actividad neuronal inducida por inhibición de receptores GABAA, la descarga epiléptica, y los vasodilatadores acetil-colina y adenosina, disminuyeron la interacción pericito-fluido cerebral por cierre de panexones pericitarios; la PGE2 inhibió panexones solamente en presencia de noradrenalina. La privación sensorial, los vasoconstrictores ATP, noradrenalina, endotelina-1 y angiotensina-II y los P2Y6R incrementaron dicha interacción por apertura de panexones. En pericitos cerebrales cultivados, la Panx1 amplificó el aumento del Ca²⁺ intracelular inducido por ATP exógeno.

Nuestros resultados sugieren que los panexones pericitarios sensan y responden a la actividad neuronal y los niveles extracelulares de neurotransmisores y moléculas vasoactivas mediante cambios en su actividad; su estado funcional modula el Ca²⁺ intrapericitario y consecuentemente el tono contráctil de los pericitos. La panexina1 pericitaria, estratégicamente ubicada en la interfaz sangre/cerebro, surge como un nuevo mecanismo para regular el flujo sanguíneo microvascular y el intercambio a través de la barrera hemato-encefálica.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Neurociencias (incluye Psicofisiología) / Comunicación intercelular

Palabras clave: pericitos / panexinas / neurovascular /

Introducción

Antecedentes:

La actividad cerebral presenta un elevado consumo energético (20% de la energía corporal total en reposo) que emplea fundamentalmente en revertir los flujos iónicos para restaurar los potenciales de membrana y el ciclo de las vesículas sinápticas (1, 2). Sin embargo las reservas energéticas disponibles en el cerebro son escasas; así, el cerebro requiere para su correcto funcionamiento de una fina regulación del flujo sanguíneo cerebral. Para satisfacer los requerimientos metabólicos y evitar la privación energética, en las zonas cerebrales activas aumenta el aporte de glucosa y oxígeno a expensas del aumento del flujo sanguíneo (FS) y del intercambio en la microcirculación local (3), respuesta conocida como hiperemia funcional (1). Los mecanismos que subyacen esta respuesta son motivo de controversia, pero se acepta que están coordinados por la Unidad NeuroVascular (UNV) constituida por vasos sanguíneos y células perivasculares (pericitos, astrocitos, neuronas y microglia) (Fig.1 Anexa). Si bien las concepciones clásicas asignan un rol predominante al efecto inhibitorio de los astrocitos sobre la resistencia arteriolar pre-capilar (4), estudios recientes proponen que los pericitos pericapilares son quienes inician el acoplamiento neuro-vascular al relajarse activamente para aumentar el FS en condiciones fisiológicas in vitro e in vivo. El capilar sería el primer elemento vascular en ajustar su diámetro en respuesta a la actividad y las arteriolas se relajarían a partir de señales pericitarias (5-8). Los mecanismos moleculares que subyacen y regulan el acoplamiento entre la actividad neuronal y el aporte de glucosa y oxígeno se encuentran aún poco explorados.

En la red capilar, donde tiene lugar el intercambio metabólico, el tono contráctil de los pericitos regula la resistencia al flujo. Los pericitos, - que contienen proteínas contráctiles (39-41) al contraerse o relajarse determinan ajustes en el diámetro capilar (vaso-constricción o vaso-relajación respectivamente), que a su vez impactan en el FS y el intercambio (disminuciones o aumentos respectivamente) (5; 7; 8; 42). El tono contráctil de los pericitos es modulado mediante

variaciones en su $[Ca^{2+}]_i$ (5; 7; 8; 42-44). El ATP incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ 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 (5; 45-47). También incrementan el tono pericitario, la noradrenalina (5), y moléculas vasoconstrictoras liberadas por el endotelio tales como endotelina-1 (48; 49), tromboxanoA2 (50) y angiotensina II (52; 55). La actividad neuronal, algunos neurotransmisores y agentes vasodilatadores inhiben el tono pericitario; en esta categoría se encuentran, el glutamato (8), la acetil-colina (43), el Óxido Nítrico (8; 53; 54), la prostaglandina E2 (PGE2) (8) y la adenosina (55). Los vasodilatadores liberados durante la actividad cerebral pueden acoplar la activación neuronal a la microcirculación local. En el cerebelo, el glutamato exógeno dilata capilares mediante PGE2 en presencia de óxido nítrico (8). La adenosina, producto de degradación del ATP, es un potente vasodilatador cerebral (56) que se acumula extracelularmente en situaciones de elevada demanda metabólica. En el hipocampo la adenosina controla la actividad (57-59) pudiendo también acoplar la actividad sináptica al FS microvascular.

Este proyecto postula que la proteína panexina1 (Panx1) se expresa en los pericitos pericapilares cerebrales y modula el acoplamiento neurovascular. Los canales de membrana formados por hexámeros de Panexina1 (Panx1) (denominados panexones) poseen un gran poro central que permite el ingreso de calcio y la liberación de ATP proporcionando vías dinámicas para la señalización autócrina y parácrina en la interacción neuroglivascular y en la regulación del tono contráctil y del flujo sanguíneo en los vasos de resistencia (9, 31).

La Panx1 forma parte de una familia de glicoproteínas integrales de membrana de tres miembros: Panx1, Panx2 y Panx3, siendo la Panx1 la más extendida en el sistema nervioso de mamíferos (Fig.2A Anexa) (10; 11). La Panx1 está ampliamente expresada en neuronas (11-13) y en células endoteliales y musculares lisas vasculares (8-14). Los panexones poseen un poro central de gran diámetro que admite el intercambio de iones y moléculas (hasta 1.2kDa) entre el citosol y el medio extracelular (19; 20); los panexones actúan como vías para liberar ATP u otros mensajeros (21-25). Los panexones se abren a potenciales de membrana negativos, a concentraciones extracelulares fisiológicas de Ca^{2+} (26) y en condiciones de isquemia, baja tensión de O_2 , bajo pH, estrés hipotónico, estimulación mecánica y por activación de receptores purinérgicos (P2X4/7, P2Y1/2/6), alfa1-adrenérgicos, y glutamatérgicos (N-metil-D-aspartato) (27-31) (Fig.2B) Anexa). La asociación entre receptores purinérgicos y la liberación de ATP por los panexones, ha conducido a proponer un mecanismo de liberación de ATP inducida por ATP en el cual la liberación del nucleótido a través de los panexones activa nuevos panexones mediante la estimulación de receptores purinérgicos a modo de feed-back positivo, resultando en la amplificación de la señal de ATP (23; 32). Así, los panexones emergen como reguladores fundamentales de la liberación de ATP en varios tipos celulares. Las células vasculares muscular lisa y endotelial liberan este agente vasoactivo a través de panexones abiertos (14; 30; 33). En el endotelio vascular, el ATP es liberado durante cambios en el flujo sanguíneo que involucran shear-stress (revisado en 34 y 35) y los panexones, que son mecanosensibles (36) mediarían esta descarga (21). Las purinas liberadas a través de panexones de células vasculares han sido implicadas en la regulación del tono vascular y del flujo sanguíneo (16; 18; 30; 31; 37; 38); en esta línea, se ha reportado que el eflujo de ATP por panexones expresados en células musculares lisas arteriales determina vasoconstricción en las arterias de resistencia por un efecto acoplado a receptores alfa1-adrenérgicos (31). Recientemente, se ha determinado que los pericitos expresan RNA para la panexina1 (60) aunque aún no se ha reportado la expresión de la proteína.

Descripción del Estudio:

Este proyecto determinará la expresión de panexones formados de Panx1 en la membrana de los pericitos cerebrales y su función como vías de intercambio molecular en la interfase neurovascular y caracterizará su regulación y su rol en la microvasculatura. Para ello, planificamos abordar distintas etapas que se describen a continuación. (1) Determinar la identidad celular de los pericitos en el árbol capilar del hipocampo mediante el fluoróforo TO-PRO-3. Este objetivo incluye caracterizar (a) la población celular identificada con el marcador TO-PRO-3, (b) la expresión de la proteína contráctil ? SMA en los pericitos TO-PRO-3-positivos, (c) la asociación anatómica de los pericitos TO-PRO-3-positivos con los demás elementos de la UNV y (d) los mecanismos que subyacen el ingreso del TO-PRO-3 a través de la membrana pericitaria. (2) Determinar si en condiciones basales los pericitos cerebrales interactúan con el microentorno extracelular a través de canales funcionales de Panx1 expresados en su membrana en el animal despierto en situación comportamiento libre (in vivo), en rodajas de hipocampo y corteza somato-sensorial (ex vivo) y en cultivos primarios de pericitos cerebrales (in vitro). Caracterizaremos los receptores y los mediadores que subyacen dicho intercambio. Se investigarán (a) el ATP que se sabe es liberado a través de panexones y (b) los receptores purinérgicos de tipo ionotrópico P2X7 y metabotrópico P2Y6 que en otros sistemas están acoplados a la panexina1. (3) Determinar si la actividad cerebral modula el intercambio molecular mediado por panexones entre los pericitos pericapilares y su microentorno. Se investigarán los efectos de, la actividad neuronal, el neurotransmisor glutamato, los receptores neuronales AMPA/NMDA, la descarga epiléptica y la privación sensorial. (4) Determinar si los agentes vasoactivos modulan el intercambio molecular mediado por

panexones entre los pericitos pericapilares y su microentorno. Se investigarán los efectos de agentes vasoconstrictores (ATP, noradrenalina, endotelina-1, angiotensina-II) y vasodilatadores (acetil-colina, adenosina, PGE2) que se conoce afectan el tono contráctil pericitario. (5) Determinar si el número de panexones abiertos en la membrana de los pericitos pericapilares cerebrales se asocia a variaciones de su fenotipo contráctil y al estado funcional de la microcirculación. Se investigarán el efecto de los panexones en (a) el perfil de respuesta del calcio pericitario y (b) la regulación del diámetro capilar. Esta última parte del proyecto se encuentra actualmente en desarrollo.

Abordaje:

Los objetivos de este proyecto se desarrollan en cultivos primarios de pericitos, rodajas de hipocampo y corteza somato-sensorial y en el animal despierto, mediante un abordaje múltiple e integrativo que incluye, imagenología funcional para investigar la captación del fluoróforo TO-PRO-3 por los pericitos y la técnica de captación de colorante para estudiar la actividad de los panexones pericitarios y su regulación, estudios de la dinámica de Ca²⁺ intracelular mediante el indicador de calcio Fluo4/AM y el marcaje de la vasculatura para estudios de diámetro capilar (DIC, fluoróforos), técnicas bioquímicas, histológicas y de detección inmune (inmunofluorescencia y western blotting), herramientas farmacológicas (empleo de bloqueantes y agonistas de canales y receptores, administración de neurotransmisores y agentes vasoactivos) y genéticas (empleo de ratones knockout globales para la panexina1 y actualmente animales condicionales para la panx1 en pericitos).

Resultados esperados:

Esperamos evidenciar un intercambio molecular mediado por panexones entre los pericitos pericapilares cerebrales y su microentorno en las distintas preparaciones empleadas (in vitro, ex vivo e in vivo) mediante el ingreso a los pericitos del colorante bromuro de etidio que permea estos canales. Esperamos además que la apertura de los panexones pericitarios esté acoplada como en otros sistemas, al ATP y a los receptores purinérgicos P2X7 y P2Y6, que las maniobras experimentales tendientes a aumentar la actividad cerebral o neuronal induzcan una disminución del número de panexones abiertos en los pericitos lo cual se evidenciará por una disminución de la captación del colorante Etd+. Además esperamos que, en forma concordante, los agentes vasodilatadores imiten y medien el efecto inducido por el aumento de la actividad neuronal. También esperamos que una inhibición de la actividad neuronal y, de manera consistente, los agentes vasoconstrictores induzcan un efecto opuesto, es decir, un aumento del número de panexones funcionales evidenciado por un incremento en la captación del colorante Etd+ por los pericitos. Finalmente esperamos que disminuciones en el número de panexones abiertos en la membrana de los pericitos se asocie a disminuciones en las respuestas dinámicas del calcio pericitario y del calibre capilar frente a los agentes vasoactivos y que por el contrario, un aumento en el número de panexones funcionales en los pericitos se acompañe de un aumento en la ganancia de las respuestas dinámicas de calcio intrapericitario y del calibre capilar frente a los agentes vasoactivos. Así, el estado funcional de los panexones pericitarios cerebrales potenciará la respuesta de los pericitos y su efecto sobre el calibre de la microvasculatura amplificando tanto las variaciones a la baja como al alza.

Metodología/diseño del estudio

Los procedimientos experimentales se realizaron siguiendo las directrices del Instituto Nacional de Salud para cuidado y uso de animales de laboratorio (Publicaciones de los NIH No. 8023, revisada en 1978) y la regulación local [Exp. CDC. 4332/99, Diario Oficial No. 25467, 21 de febrero de 2000, Universidad de la República, Uruguay]. El Comité de Ética en Investigación Animal (Ley 18.611) (Facultad de Medicina-Udelar) aprobó el protocolo (Resolución del 29/08/2012, Exp.Nº071140-000792-12). Minimizamos el número de animales utilizados y su sufrimiento, probando distintas condiciones en cortes derivados del mismo animal. Se utilizaron ratones salvajes (*Mus musculus*) y knockout totales *Panx1*^{-/-} con fondo C57BL/6 (61) de edad P20-P31 (a menos que se especifique) pues expresan conexinas (>21 días) (17) y presentan menor daño vascular (63) y ratas (Sprague Dawley; P30) de ambos sexos. Los ratones salvajes (RRID: IMSR_JAX: 000664) fueron proporcionados por el Laboratorio Jackson (Maine, USA) y las ratas (SD, cepa código 400) se adquirieron al Laboratorio Charles River (MA-USA). Los ratones *Panx1*^{-/-} homocigotos se obtuvieron a partir de embriones *Panx1*^{+/-} heterocigotos donados por Genentech Corporation (San Francisco, CA94080-USA) que fueron crío-recuperados por la Unidad de Animales Transgénicos y Experimentales (UATE-Institut Pasteur de Montevideo-Uruguay). La línea condicional se desarrolla actualmente en la UATE. Para obtener ratones transgénicos con inactivación condicional de la *Panx1* específicamente en pericitos (PDGFRbeta-P2A-CreERT2/*Panx1*) se cruza la línea de ratón *Panx1*^{fl/fl} con los sitios *LoxP* flanqueando los exones 3 y 4 en un gen *Panx1* de copia única (B6;129-Casp4del *Panx1*^{tm1Vshe/J}) (61) con ratones *Csln*^{>/JB6.CgPdgfrbtm1.1(cre/ERT2)*Csln*}, ambas líneas adquiridas a Jackson-USA; la inactivación se induce con

tamoxifeno; la interrupción del gen se confirma mediante RT-PCR y la ablación de la proteína Panx1 por técnicas inmunes. Los animales son criados y alojados a temperatura controlada en ciclos (12h) luz/oscuridad en la Unidad de Reactivos Experimentales y Biomodelos (URBE - Facultad de Medicina). Todos estos animales son alimentados ad libitum con comida y agua.

Empleamos rodajas agudas de cerebro (hipocampo, corteza somato-sensorial) (300 μ m) preparación por excelencia para investigar la biología de los pericitos cerebrales (Mishra y col, 2014) pues permiten localizar la administración de sustancias y controlar su concentración final; además preservan los circuitos neuronales y las interacciones neuro-glio-vasculares. También utilizamos cultivos de pericitos cerebrales que si bien carecen de UNV, permiten establecer el origen celular de ciertos mecanismos. También validamos algunos comportamientos en pericitos del animal intacto que conserva las interacciones neuro-glio-vasculares (aunque no discrimina si los cambios en los capilares obedecen a éstos o a variaciones en la presión de arteriolas o vénulas que alteran pasivamente el diámetro capilar). En retinas, identificamos pericitos mediante TO-PRO-3. Las rodajas agudas de cerebro, los cultivos primarios de pericitos y las retinas se obtienen según protocolos publicados con modificaciones (62; 70; 71; 72; 64).

Para identificar los pericitos incubamos las rodajas vivas con el marcador nuclear fluorescente (excitación/emisión 642/661nm máximos) TO-PRO-3 (10 μ M; 20 min) o con el marcador pericitario NeuroTrace 500/525 (51) en ACSF (Artificial CerebroSpinal Fluid) [composición en mM: NaCl(134); KCl(2.8); NaHCO₃(29); NaH₂PO₄(1.1); glucosa(12); MgSO₄(1.5); CaCl₂(2.5) equilibrado con carbógeno (95%O₂, 5%CO₂)] (46; 64). Mediante inmunohistoquímica, en rodajas y cultivos fijados (paraformaldehído-PFA 4% en PBS, 40 min) comprobamos que los pericitos TO-PRO-3-positivos se marcan con anticuerpos que detectan pericitos (anti-NG2; anti-PDGFRbeta) y exploramos la distribución celular de la Panexina1. Para evaluar la expresión funcional de panexones en rodajas cerebrales empleamos la técnica de captación de trazadores permeables a hemicanales (bromuro de etidio; Etd+; PM 394.33 g/mol) (12; 65). Las rodajas se incuban en ACSF conteniendo Etd+ (10 μ M; 15-30 min). El Etd+ ingresa a la célula por panexones abiertos y al fijarse al ADN/ARN emite fluorescencia (excitación/emisión 528 nm/598 nm máximos). Durante las maniobras experimentales, los bloqueantes, los agonistas, los neurotransmisores y los agentes vasoactivos se aplican durante la captación con Etd+. Luego del lavado (ACSF; 10 min), las rodajas se fijan (PFA 4%, 40 min), se incuban con Dapi (1 μ M; 10 min) y se montan para adquisición de imágenes en un microscopio confocal (Leica modelo TCS SP5 II, Unidad de Microscopía Confocal, Facultad de Medicina); para poder comparar distintas condiciones, empleamos los mismos parámetros (ganancia, offset) en cada experimento independiente. Mediante un software (Image-J) en las imágenes adquiridas cuantificamos la intensidad de captación del Etd+ en unidades arbitrarias como la diferencia (F-F₀) entre la fluorescencia (F) en los pericitos y la fluorescencia de fondo (F₀) medida en el mismo campo en zonas sin células marcadas. En cada experimento se normaliza la fluorescencia de Etd+ en las distintas condiciones en relación a la media del control. Para estudiar la captación de Etd+ en cultivos, los pericitos se incuban en medio de cultivo conteniendo Etd+ (10 μ M; 20 min). Para estudiar la captación de Etd+ en condiciones in vivo de comportamiento libre, administramos Etd+ (100 mg/kg peso; ip) al animal; luego de 50 min disecamos los hipocampos y obtenemos rodajas que procesamos para análisis. Previo a la administración de Etd+, inyectamos (a) suero fisiológico (vehículo; 5 ml/kg; ip) al grupo control o (b) un inhibidor de Panx1, el probenecid (200 mg/kg; ip) disuelto en volumen equivalente de suero fisiológico o (c) picrotoxina (1 mg/kg y 8 mg/kg peso; ip), un inhibidor de receptores GABAA. En los experimentos in vivo, la fluorescencia de Etd+ fue normalizada respecto al grupo control (vehículo). En comparación con el registro de la captación de colorante in vivo "on line" mediante microscopía bifotónica, el método propuesto presenta inconvenientes y ventajas [Desventajas: (a) brinda la resultante de las variaciones en la captación durante el tiempo estudiado y no discrimina variaciones individuales ocurridas en dicho período, (b) alteraciones importantes en la permeabilidad de la BHE independientes del estado funcional de los pericitos podrían modificar los resultados; Ventajas: (a) no depende del Microscopio Bifotónico, (b) permite estudiar la captación en situaciones conductuales (durante comportamiento libre y crisis epilépticas) sin necesidad de anestésicos, los anestésicos inhiben los canales de uniones gap y los hemicanales cerebrales (15), (c) permite acceder a estructuras cerebrales más profundas (hipocampo) y no quedar restringidos a capas corticales superficiales, es (d) metodológicamente más sencillo y (e) menos traumático]. La permeabilidad pericitaria basal en el animal medido con este método presentó un comportamiento similar al de los pericitos de las rodajas agudas permitiéndonos validar nuestra técnica.

Confirmamos la contribución de los panexones en la permeabilidad basal de los pericitos cerebrales [Objetivo Específico (I)] al comprobar que la captación pericitaria de Etd+ fue similar en animales que presentaron silenciamiento de la proteína Panx1 (Knock-out totales; Panx1^{-/-}) y en animales salvajes tratados con PBD o 10Panx1 (in vitro e in vivo). Para confirmar que los panexones-Panx1 están expresados en pericitos donde constituyen una vía para el pasaje de Etd+ determinamos (a) el efecto de la administración exógena de ATP a rodajas de ratones Panx1^{-/-} y (b) la captación en pericitos cultivados en presencia de bloqueantes de Panx1. Si los panexones se expresan en pericitos, entonces en (a) no

aumentará la captación al administrar ATP en pericitos derivados de ratones Panx1^{-/-} y en (b) la captación de Etd⁺ en los pericitos cultivados disminuirá en presencia de bloqueantes. Si los panexones están permitiendo la liberación de ATP por un tipo celular no pericitario (y este ATP no-pericitario determina el influjo de Etd⁺ a los pericitos por una vía diferente a los panexones), entonces en (a) el ATP exógeno recuperará la captación de Etd⁺ en pericitos derivados de ratones Panx1^{-/-} mientras que en (b) no observaremos diferencias en las captaciones de Etd⁺ entre el control y ante la presencia de bloqueantes de Panx1. Si bien en condiciones basales los astrocitos del hipocampo liberan ATP de manera tónica para modular la transmisión sináptica basal, la vía de liberación del ATP glial ocurre a través de hemicanales de Cx43 y no de panexones (66); en nuestro caso, una contribución mayoritaria de ATP por neuronas, astrocitos y endotelio en comparación a la fuente pericitaria parece poco probable ya que, estos tipos celulares presentan menor captación de Etd⁺ que los pericitos control. Para caracterizar los mecanismos que subyacen la comunicación mediada por panexones en condiciones basales [Objetivo Específico (II)], evaluamos la captación de Etd⁺ en presencia de bloqueantes y análogos de receptores purinérgicos y de apirasa. Para determinar si el intercambio pericito-medio cerebral mediado por Panx1 es actividad-dependiente [Objetivo Específico (III)] in vitro evaluamos la captación de Etd⁺ por pericitos en presencia de glutamato [exposición menor a 15 min para evitar excitotoxicidad (Weilinger y col, 2016)] en baja concentración de Mg⁺⁺ [ACSF en mM: NaCl(135); KCl(2.8); NaHCO₃(29); NaH₂PO₄(1.1); glucosa(12); MgSO₄(0.5); CaCl₂(2.5)] para permitir la activación del NMDAr. Evaluamos el efecto del glutamato en cultivos de pericitos libres de neuronas donde no esperamos obtener importantes efectos pues (a) el glutamato actuará primariamente en receptores neuronales induciendo la liberación de un mediador que modulará la actividad de los panexones, y (b) los pericitos de roedores son insensibles per se a concentraciones milimolares de l-glutamato y NMDA (67). El glutamato y el NMDA dilatan los vasos in vivo (8) pero no in vitro (68; 69) indicando que no tienen efectos directos sobre los pericitos ni sobre las células endoteliales cerebrales. Además también evaluamos la captación de Etd⁺ ante maniobras que promueven la descarga neuronal por administración de picrotoxina (PTX, 10 μ M) que genera descargas neuronales masivas las cuales in vivo (ver abajo), desencadenan convulsiones asociadas a importantes incrementos del flujo sanguíneo cerebral. Variaciones en la captación de Etd⁺ ante estas maniobras, se bloquean en condiciones ex vivo silenciando la descarga neuronal mediante tetrodotoxina (TTX; 0.5 μ M), un bloqueante de canales de Na⁺-activados por voltaje. In vivo, las crisis epilépticas se inducen farmacológicamente (picrotoxina 8 mg/kg ip; 5 min post-Etd⁺) y se filman para determinar latencia, duración y estadío según escala modificada de Racine.

Para caracterizar los mecanismos responsables de la modulación neural de los panexones pericitarios [Objetivo Específico (IV)] exploramos los efectos de (a) los receptores glutamatérgicos y (b) los mediadores (solubles/difusibles) involucrados en las acciones de la actividad neuronal. Para fortalecer nuestra hipótesis, evaluamos también (c) los efectos de agentes vasoactivos sobre la permeabilidad pericitaria. Para (a) y (b) exploramos si el componente glutamato-sensible de la captación de Etd⁺ puede prevenirse por inhibidores de receptores glutamatérgicos, y si el componente PTX-sensible de captación de Etd⁺ puede prevenirse por inhibidores de receptores de adenosina respectivamente. Para determinar (c), evaluamos los efectos de vasoconstrictores (ATP, noradrenalina, endotelina-1, angiotensina-II) y vasodilatadores (adenosina, acetil-colina, prostaglandina E₂).

Para investigar si el número de panexones abiertos en pericitos pericapilares se asocia a variaciones del fenotipo contráctil de los pericitos y al estado funcional de la microcirculación [Objetivo Específico (V)] investigamos variaciones en la [Ca²⁺]_i, pericitaria y el diámetro capilar ante maniobras que silencien (bloqueantes de Panx1 o ratones Panx1^{-/-}) o activen (ATP) canales de Panx1. Considerando que los bloqueantes de Panxs pueden inhibir panexones endoteliales, localizaremos la microperfusión en inmediación a pericitos y en sectores capilares desprovistos de pericitos como control (5) y usaremos a futuro los ratones transgénicos condicionales para Panx1 en pericitos. Evaluamos la [Ca²⁺]_i mediante sondas fluorescentes específicas (Fluo-4-AM) en pericitos cerebrales cultivados bajo microscopía confocal. El diámetro capilar se cuantifica en los segmentos vasculares de máximo efecto (73). Empleamos rodajas precontraídas (NA 1.5 μ M) para compensar la ausencia de presión de perfusión en la rodaja. Bajo fluorescencia confocal [por tratamiento de las rodajas con FITC-isolectina B4 o por inyección retro-orbital de FITC-dextrano de elevado peso molecular] o bajo DIC (Microscopía de Contraste Diferencial interferencial) identificamos capilares (diámetro <10 micrómetros; ausencia de músculo liso) saludables según criterios publicados (63). En este trabajo, los valores se presentan como media \pm SEM. Se emplean tests no paramétricos (Mann-Whitney y ANOVA Kruskal-Wallis). El nivel de significación se establece para p < 0.05.

Resultados, análisis y discusión

En una primera instancia demostramos que el fluoróforo TO-PRO-3 (642/661) de espectro rojo lejano, generalmente empleado como colorante nuclear en tejido fijo, actúa como un colorante específico de pericitos en el sistema nervioso (NS) de murinos cuando se aplica en tejido vivo (trabajo adjunto, Mai-Morente y col, 2020). En estas condiciones, los pericitos pericapilares de rodajas vivas de corteza, hipocampo, médula espinal y de la retina incorporaron de manera selectiva y robusta al TO-PRO-3. Inmunomarcadores clásicos de los pericitos como el antígeno condroitín sulfato proteoglicano neural-glial 2 (NG2) y el antígeno del receptor del factor de crecimiento beta derivado de plaquetas (PDGFR α) así como el recientemente reportado colorante de pericitos, el fluoróforo NeuroTrace 500/525, confirmaron la especificidad celular del marcado con TO-PRO-3 en pericitos. La señal con TO-PRO-3 permitió la cuantificación de la densidad pericitaria en el cerebro y la caracterización morfológica de los pericitos así como la visualización de los pericitos asociados con otros componentes de la unidad neurovascular (vasos y endotelio, astrocitos y neuronas). Un subconjunto de pericitos marcados con TO-PRO-3 expresó la proteína contráctil α -SMA, indicativa de su capacidad para controlar el diámetro capilar. La captación de TO-PRO-3 no involucró canales de gran poro formados de conexina o pannexina, pero fue muy sensible a la temperatura (Q₁₀~5) y mostró saturación cuando se emplearon distintas dosis de colorante, lo que sugiere que el TO-PRO-3 es incorporado a los pericitos a través de un mecanismo activo mediado por un transportador de identidad aún desconocida. Concluimos que el marcaje de pericitos con TO-PRO-3 proporciona una herramienta confiable, potente y sensible para identificar pericitos en la microvasculatura del sistema nervioso del murino sin la necesidad de emplear animales transgénicos o inmunohistoquímica.

Mediante técnicas funcionales (captación de bromuro de etidio, trazador intercalante que permea panexones), y herramientas farmacológicas y genéticas (empleo de ratones knockout), evidenciamos, en rodajas agudas de hipocampo (ex vivo), en cultivos primarios de pericitos cerebrales (in vitro) y en el animal despierto en condiciones de comportamiento libre (in vivo), que canales de panexina1 abiertos en reposo (condiciones basales) se expresan en los pericitos cerebrales donde permiten la transferencia molecular entre las células murales y su microambiente extracelular circundante. Los bloqueantes de Panx1 (probenecid, péptido mimético 10Panx1) y los bloqueantes genéricos de Pxs y Cxs (carbenoxolona) pero no los bloqueantes de conexinas (lantano, péptido miméticos Gap19 y Gap26) inhibieron la captura del colorante por los pericitos cerebrales provenientes de roedores salvajes, y, como era esperable, no fueron efectivos en pericitos de ratones knockout totales para Panx1 (Panx1^{-/-}) (Figs. 3 y 4 Anexas). Técnicas de detección inmune evidenciaron además la expresión de la proteína panexina1 en los pericitos cerebrales y su localización en el citoplasma y la membrana pericitarios (Figs. 3 y 4 Anexas). La interacción mediada por panexones entre los pericitos y el microentorno cerebral en condiciones basales es mantenida por el ATP endógeno y por vías purinérgicas. En este sentido, la permeabilidad pericitaria al colorante Etd⁺ fue inhibida por la apirasa, una enzima que degrada el ATP, por bloqueantes genéricos de los receptores purinérgicos ionotrópicos P2X (PPADS) y metabotrópicos P2Y (Reactive-blue) y específicos de los subtipos ionotrópico P2X7 (BBG/A804598) y metabotrópico P2Y6 (MRS2578) en roedores salvajes, efectos que no encontramos en ratones KO (Panx1^{-/-}). Aquellas maniobras experimentales tendientes a incrementar la actividad neuronal cerebral se acompañaron de un cierre de panexones en los pericitos cerebrales, evidenciado por la disminución de la captación de Etd⁺ por estas células. El neurotransmisor glutamato aplicado en forma exógena, a través de la activación de los receptores ionotrópicos AMPA/NMDA, y la estimulación (independiente y conjunta) de receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA, disminuyeron la captación de colorante por los pericitos en ratones salvajes. La inhibición del glutamato fue dosis-dependiente obteniéndose un bloqueo máximo a partir de una concentración 500 μ M. Los efectos del glutamato sobre la actividad de los panexones pericitarios no se observaron en los ratones KO Panx1^{-/-} como era de esperar ni tampoco en los pericitos cerebrales cultivados; esto último indicaría que la acción del glutamato y sus receptores AMPA/NMDA sobre los pericitos es indirecta e involucra otro tipo celular y un mediador. En línea con estos resultados, tratamientos (ex vivo) con un bloqueante de los receptores GABA_A, la picrotoxina (PTX), que determinan un incremento intenso de la actividad y del consumo metabólico neuronales, también inhibieron la interacción pericito-microentorno cerebral mediada por Panx1, efecto que fue prevenido por el silenciamiento neuronal mediante tetrodotoxina (TTX) lo cual confirma la dependencia de la actividad de los panexones a la actividad neuronal. Como era esperable, la inhibición de panexones por la PTX no se observó en pericitos derivados de ratones KO (Panx1^{-/-}). La acción inhibitoria de la descarga neuronal sobre la actividad de los panexones pericitarios fue mediada por el potente vasodilatador adenosina a través de receptores de tipo A₁ ya que el efecto fue totalmente sensible al bloqueante de estos receptores (DPCPX). La adenosina imitó además el efecto de la PTX tanto en rodajas de hipocampo como en cultivos cerebrales, sugiriendo esto último que la adenosina induce el cierre de panexones por un efecto directo sobre el pericito. Estos fenómenos tuvieron su correlato en condiciones in vivo en ratones despiertos en movimiento libre en los cuales la administración intraperitoneal de PTX indujo convulsiones generalizadas y disminuciones significativas de la captación del colorante por los pericitos cerebrales, efecto que no se observó en los pericitos derivados de ratones KO Panx1^{-/-}. La duración de la crisis epiléptica se correlacionó inversamente con la captación pericitaria de Etd⁺; aumentos tanto en la latencia al inicio como en la latencia al máximo de las crisis, se

correlacionaron directamente con el aumento en la captación pericitaria del colorante. De manera consistente con estos resultados, la experiencia también determinó la regulación del número de panexones funcionales en pericitos: la privación sensorial unilateral inducida mediante rasurado de vibrisas se asoció con un aumento de la captación de colorante por los pericitos pericapilares de la hemicorteza somatosensorial privada y con una disminución de dicha captación por los pericitos de la hemicorteza somatosensorial contralateral, efecto que fue dependiente del estadio de desarrollo siendo mayor cuando la privación (15 días) se inició a edades más tempranas (P06>P21) coincidentes con un mayor intercambio pericito-microentorno a esta edad (P06>P21). Además, en los ratones P21, la duración de la privación sensorial indujo un efecto mayor cuando fue de 15 días en comparación a 30 días de privación. Los agentes vasoactivos regulan el intercambio molecular pericitos - medio extracelular cerebral mediado por panexones. Los agentes vasodilatadores adenosina y acetil-colina, que se sabe ejercen un efecto inhibitorio sobre el tono contráctil de los pericitos, determinaron una disminución de la incorporación del colorante en las células murales por cierre de canales de panexina1. Como mencionamos más arriba, la adenosina medió los efectos de la descarga neuronal inducida por la PTX sobre los panexones pericitarios en una situación de gran consumo metabólico; de hecho en otros sistemas la adenosina se libera ante grandes demandas metabólicas, actuando como un modulador neuro-metabólico. En este sentido, es esperable y consistente que la actividad cerebral y los vasodilatadores afecten la actividad de los panexones pericitarios en el mismo sentido y que sea un cierre de canales. Por su parte, los agentes vasoconstrictores y facilitadores del tono pericitario, tales como el ATP, la noradrenalina, la endotelina-1 y la angiotensina-II, favorecieron el intercambio pericito-microentorno por apertura de panexones. Los efectos del ATP y de la noradrenalina fueron dependientes de la dosis administrada. Para el ATP se registró un aumento máximo de la captación del colorante para una concentración de 100 UM, este incremento fue luego disminuyendo para dosis mayores; la noradrenalina alcanzó un pico máximo de captación pericitaria para una concentración de 15 UM el cual se mantuvo en el mismo nivel para dosis mayores alcanzando un "plateau". Además del ATP, empleamos agonistas de los receptores P2X7 y P2Y6, el análogo no hidrolizable, el BzATP y el UDP respectivamente. Este último indujo un aumento de la captación pericitaria, sin embargo, el BzATP presentó un efecto bifásico, dosis bajas se acompañaron de un aumento de la captación pero dosis más altas de inhibición de la captación. Como es esperable, los efectos de los agentes vasoactivos detectados en los pericitos derivados de ratones salvajes no se observaron en aquellos provenientes de ratones KO *Panx1*^{-/-}. En pericitos cerebrales en cultivo cargados con el indicador de calcio Fura4/AM, el cierre de panexones por administración del péptido mimético 10Panx1 disminuyó los niveles de calcio en condiciones basales, e inhibió el grado de aumento del calcio intracelular inducido por el ATP exógeno. Estos resultados indicarían que la panexina1 posee un efecto potenciador o amplificador de la respuesta del pericito. Actualmente, nos encontramos desarrollando experimentos en ratones condicionales (*PDGFRbeta*-*P2A*-*CreERT2*/*Panx1*) en los cuales se induce un silenciamiento de la expresión de la panexina1 solo en los pericitos mediante tratamiento con tamoxifeno, y cuya progenie fue adquirida con fondos de este proyecto FCE al laboratorio Jackson. Además estamos cuantificando el calibre capilar en distintas condiciones (control, ante la estimulación con agentes vasoactivos en ratones salvajes y KO *Panx1*^{-/-}). Estos últimos experimentos nos permitirán en un futuro cercano, evaluar el impacto de la panexina1 pericitaria en la regulación del calibre capilar y de esta forma, determinar la función de este canal en el ajuste del flujo sanguíneo microvascular.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los mecanismos mediados por la panexina1 pericitaria que describimos a continuación operarían en condiciones fisiológicas en la interface neurovascular cerebral. La apertura de panexones en pericitos cerebrales induciría un aumento del Ca²⁺ intrapericitario por (a) ingreso del ion a través de los canales y (b) liberación de ATP a través de los panexones pericitarios el cual incrementaría el Ca²⁺ intrapericitario por activación de receptores purinérgicos ionotrópicos (de tipo P2X7, activados por ligando que permiten el ingreso del ion) y metabotrópicos (de tipo P2Y6, acoplados a proteína G que gatillan liberación del ion desde sitios de almacenamiento intracelular). El aumento de Ca²⁺ libre en el citosol de los pericitos, aumentará el tono contráctil de estas células, generando en consecuencia, contracción capilar y aumento de la resistencia al flujo sanguíneo en el territorio vascular. Además, el aumento del Ca²⁺ pericitario y la activación de receptores purinérgicos pericitarios acoplados a panexones, reclutarían nuevos panexones abiertos en la membrana celular, acrecentando aún más el ingreso Ca²⁺, la liberación de ATP, y la activación de nuevos receptores purinérgicos dando por resultado un nuevo aumento del Ca²⁺ intracelular a modo de un sistema de retroalimentación positiva. En condiciones fisiológicas, el mecanismo estaría auto-regulado pues como vimos, aumentos del ATP mayores a 100 UM disminuyeron el grado de aumento de la apertura de los panexones. Este mecanismo de amplificación auto-mantenido y auto-regulado conformado por la vía pericitaria *Panx1*/*ATP*/*P2X*-*P2Y*/*Ca*²⁺, constituiría una base molecular y celular para controlar la circulación cerebral. Según las necesidades metabólicas cerebrales, dicha vía se encontraría en modo "apagado" o "prendido". Ante aumentos en los niveles extracelulares de agentes vasoconstrictores, y en condiciones de "reposo cerebral", la activación de panexones en la membrana pericitaria aumentaría el tono contráctil del pericito con la consecuente disminución del diámetro del capilar adyacente, disminución

del flujo sanguíneo a su nivel y del aporte metabólico. Ante aumentos de los requerimientos metabólicos por aumento de la actividad cerebral, situación en la cual se liberan vasodilatadores, los panexones pericitarios se cerrarían con la consiguiente disminución de los niveles intrapericitarios de Ca^{2+} resultando en una disminución del tono contráctil del pericito; esto provocará vasodilatación a nivel de la microvasculatura, y aumento de la perfusión capilar acompañada de un incremento del intercambio metabólico.

Conclusiones y recomendaciones

A continuación enumeramos las principales conclusiones obtenidas en el marco de este proyecto:

- (1) Los pericitos cerebrales expresan canales de panexina1 abiertos en reposo (condiciones basales) los cuales median una transferencia molecular entre los pericitos y su microambiente extracelular circundante tanto en cultivo (in vitro), en rodajas de cerebro (ex vivo) como en el animal despierto y en libre movimiento (in vivo).
- (2) La interacción pericito-fluido extracelular mediada por panexones pericitarios funcionales, requiere de la secreción basal de ATP endógeno y de su efecto autócrino/parácrino sobre receptores purinérgicos ionotrópicos P2X7 y metabotrópicos P2Y6 quienes activan panexones acoplados a estos receptores.
- (3) El número de panexones pericitarios abiertos en condiciones basales, disminuye ante la actividad neuronal, la descarga epiléptica, la administración del neurotransmisor glutamato, la activación de receptores glutamatérgicos neuronales AMPA y NMDA, y durante la exposición a agentes vasodilatadores.
- (4) El número de panexones pericitarios abiertos en condiciones basales, aumenta por la privación sensorial y por la exposición a agentes vasoconstrictores.
- (5) La panexina1 amplifica la respuesta dinámica del Ca^{2+} pericitario inducida por el ATP exógeno.

Los resultados obtenidos en el marco de este proyecto sugieren que el número de panexones pericitarios y su estado funcional (abiertos o cerrados) sería modulado por las demandas metabólicas neuronales. En "estado basal" o "de reposo relativo", un mayor número de panexones pericitarios se encuentra abierto permitiendo la liberación tónica de ATP, el cual, activando de manera autócrina/parácrina receptores purinérgicos y panexones, amplificaría la liberación de ATP (liberación de ATP-inducida por ATP) aumentando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y así el tono contráctil de los pericitos lo que a su vez provocaría una disminución del diámetro capilar y del flujo sanguíneo a ese nivel. Las condiciones que determinan un aumento del consumo metabólico neuronal o cerebral, se asocian con una disminución del número de panexones funcionales en los pericitos. De este modo, frente a aumentos de las demandas metabólicas cerebrales, el mecanismo descrito más arriba se inhibe; así, el cierre de canales de Panx1 en los pericitos de las áreas cerebrales activas se asociaría a una disminución de la liberación de ATP endógeno y de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resultando en la relajación del pericito, vasodilatación del capilar adyacente y aumento del intercambio local a nivel de la BHE. Señales difusibles liberadas durante la activación de receptores neuronales (NMDA y AMPA) acoplarían la actividad neuronal al estado funcional de los panexones. De acuerdo a nuestros resultados, podemos establecer que los panexones pericitarios son capaces de sensar la actividad neuronal a la cual responden mediante un ajuste de su actividad. Esto último impactará en la dinámica intrapericitaria de Ca^{2+} y de este modo, en el tono contráctil del pericito y del calibre capilar.

En suma, la Panx1 pericitaria y el agente vasoactivo ATP, liberado a través de los panexones, emergen como moduladores fundamentales de la comunicación en la interface pericito-microentorno cerebral por su efecto regulador sobre el Ca^{2+} pericitario. De esta forma, la panexina1 en pericitos cerebrales surge como un nuevo mecanismo para regular el flujo sanguíneo en la microvasculatura cerebral.

Referencias bibliográficas

- (1) Attwell & Laughlin; *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Oct;21(10):1133-45. Review. DOI:10.1097/00004647-200110000-00001
- (2) Harris et al.; *Neuron.*(2012)Sep 6;75(5):762-77. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.019. Review.
- (3) Roy & Sherrington. *J Physiol.*(1890)Jan;11(1-2):85-158.17.
- (4) Gordon et al.; *Nature.* 2008 Dec 11;456(7223):745-9. doi: 10.1038/nature07525.
- (5) Peppiatt et al.; *Nature*(2006)Oct12;443(7112):700-4. DOI:10.1038/nature05193
- (6) Armulik et al.; *Nature.*(2010)Nov 25;468(7323):557-61. doi: 10.1038/nature09522.
- (7) Attwell et al.; *Nature.*(2010)Nov 11;468(7321):232-43. doi: 10.1038/nature09613. Review.
- (8) Hall et al.; *Nature*(2014)Apr3;508(7494):55-60. doi:10.1038/nature13165.
- (9) Fields et al.; *Nat Rev Neurosci.*2006; 7:423-436. DOI:10.1038/nrn1928
- (10) Panchin et al.; *J Exp Biol.*(2005)Apr;208(Pt 8):1415-9. Review. DOI:10.1242/jeb.01547
- (11) Bruzzone et al.; *Proc Natl Acad Sci U S A.*(2003)Nov 11;100(23):13644-9. DOI:10.1073/pnas.2233464100
- (12) Vogt et al.; *Brain Res Mol Brain Res.*(2005)Nov 18;141(1):113-20. DOI:10.1016/j.molbrainres.2005.08.002
- (13) Ray et al.; *Eur J Neurosci.*(2005)Jun;21(12):3277-90. DOI:10.1111/j.1460-9568.2005.04139.x
- (14) Lohman et al.; *Cardiovasc Res.*(2012)Aug 1;95(3):269-80. doi: 10.1093/cvr/cvs187. Review.
- (15) Liu et al.; *Glia.* 2016 Apr;64(4):524-36. doi: 10.1002/glia.22946
- (16) Lohman et al.; *Nat Commun.*(2015)Aug 5;6:7965. doi: 10.1038/ncomms8965.
- (17) Ezan et al.; *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.*(2012)Aug;32(8):1457-67. doi:10.1038/jcbfm.2012.45.
- (18) Begandt et al.; *BMC Cell Biol.*(2017)Jan 17;18(Suppl 1):2. doi: 10.1186/s12860-016-0119-3. Review.
- (19) Sáez et al.; *Physiol Rev.*(2003)Oct;83(4):1359-400. Review. DOI:10.1152/physrev.00007.2003
- (20) Sáez et al.; *Exp Cell Res.*(2010)Sep10;316(15):2377-89. doi:10.1016/j.yexcr.2010.05.026.
- (21) Locovei et al.; *Proc Natl Acad Sci U S A.*(2006)May 16;103(20):7655-9. DOI:10.1073/pnas.0601037103
- (22) Iglesias et al.; *J Neurosci.*(2009) May27;29(21):7092-7. DOI:10.1523/JNEUROSCI.6062-08.2009
- (23) Isakson & Thompson, *Channels*(Austin)(2014);8(2):118-23. doi:10.4161/chan.27978. Review
- (24) Shestopalov & Panchin. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Feb;65(3):376-94. DOI:10.1007/s00018-007-7200-1. Review.
- (25) Dahl G. *Philos.Trans.R.Soc.LondB.Biol.Sci.*(2015)Jul5;370(1672).pii:20140191. doi: 10.1098/rstb.2014.0191. Review.
- (26) Barbe et al.; *Physiology (Bethesda).*(2006)Apr;21:103-14. Review. DOI:10.1152/physiol.00048.2005
- (27) Thompson et al.; *Science*(2008)Dec5;322(5907):1555-9. DOI:10.1126/science.1165209
- (28) Pelegrin et al.; *EMBO J.*(2006)Nov1;25(21):5071-82. DOI:10.1038/sj.emboj.7601378
- (29) Garré et al.; *ProcNatlAcadSciU S A.*(2010)Dec 28;107(52):22659-64. DOI:10.1073/pnas.1013793107
- (30) Lohman & Isackson. *FEBS Lett.*(2014)Apr 17; 588 (8): 1379-1388. DOI:10.1016/j.febslet.2014.02.004. Review.
- (31) Billaud et al., *Circ Res.*(2011)Jun 24;109(1):80-5. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237594.
- (32) Orellana et al.; *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets.*(2011)10: 404-414.
- (33) Gödecke et al.; *Am J Physiol Cell Physiol.*(2012)Mar 15;302(6):C915-23. doi: 10.1152/ajpcell.00283.2010.
- (34) Burnstock G. *Pharmacol Rep.*(2008)Jan-Feb;60(1):12-20. Review.
- (35) Burnstock G. *Auton Autacoid Pharmacol.*(2009)Jul;29(3):63-72. doi: 10.1111/j.1474-8673.2009.00435.x. Review.
- (36) Bao et al.; *FEBS Lett.*(2004)Aug 13;572(1-3):65-8. DOI:10.1016/j.febslet.2004.07.009
- (37) Billaud et al.; *Trends Cardiovasc Med.*(2012)Apr;22(3):68-72. doi: 10.1016/j.tcm.2012.06.014. Review.
- (38) Good et al.; *JCI.Insight.*(2018)Mar 22;3(6). pii: 96272. doi: 10.1172/jci.insight.96272.
- (39) Le Beux & Willemot. *Anat Rec.*(1978)Apr;190(4):811-26. DOI:10.1002/ar.1091900404
- (40) Giaume et al., *Methods Mol Biol.*(2012);814:283-303. doi:10.1007/978-1-61779-452-0_19.
- (41) Attwell et al. *J Cereb Blood Flow Metab.*(2016)Feb;36(2):451-5. doi:10.1177/0271678X15610340.
- (42) Fernández-Klett & Priller. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.*(2015)35, 883-887. DOI:10.1038/jcbfm.2015.60
- (43) Wu et al.; *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*(2003)Jun;284(6):H2083-90. DOI:10.1152/ajpheart.01007.2002
- (44) Borysova et al.; *Cell Calcium*54(2013)163-174. DOI:10.1016/j.ceca.2013.06.001
- (45) Kawamura et al.; *J Physiol.*(2003)Sep 15;551(Pt 3):787-99. DOI:10.1113/jphysiol.2003.047977
- (46) Lacar et al.; *J Neurosci.*(2012)Nov 14;32(46):16435-48. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1457-12.2012.
- (47) Crawford et al.; *Acta Physiol (Oxf)*(2011)Jul;202(3):241-51. doi:10.1111/j.1748 1716.2011.02310.x.
- (48) Chakravarthy et al.; *Microvasc Res.*(1992)May;43(3):241-54.
- (49) Ramachandran et al.; *Invest Ophthalmol Vis Sci.*(1993)34:586-595.
- (50) Fernández-Klett et al., *Proc.Natl.Acad.Sci-USA*(2010)Dec21;107(51):22290-5. DOI:10.1073/pnas.1011321108.

- (51) Damisah et al.; *Nat Neurosci.* 2017 Jul;20(7):1023-1032. doi: 10.1038/nn.4564.
- (52) Kawamura et al.; *J Physiol.*(2004)Dec15;561(Pt 3):671-83. DOI:10.1113/jphysiol.2004.073098
- (53) Haefliger et al.; *Invest Ophthalmol Vis Sci.*(1994)Mar;35(3):991-7.
- (54) Sakagami et al.; *Microvasc Res.*(2001)Sep;62(2):196-203. DOI:10.1006/mvre.2001.2343
- (55) Matsugi et al.; *Invest Ophthalmol Vis Sci.*(1997)Dec;38(13):2695-701.
- (56) Phillis JW. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.*(1989)Spring;1(1):26-54. Review.
- (57) Dunwiddie & Masino. *Annu Rev Neurosci.*(2001);24:31-55. DOI:10.1146/annurev.neuro.24.1.31. Review.
- (58) Zhang et al.; *Neuron.*(2003)Dec 4;40(5):971-82.
- (59) Pascual et al.; *Science.* 2005 Oct 7;310(5745):113-6. DOI: 10.1126/science.1116916
- (60) Vanlandewijck, et al.; *Nature.* 2018 Feb 22;554(7693):475-480. doi: 10.1038/nature25739. Epub 2018 Feb 14. Erratum in: *Nature.* 2018 Aug;560(7716):E3.
- (61) Qu et al.; *J.Immunol.*(2011)186:6553–6561. doi: 10.4049/jimmunol.1100478.
- (62) Rouach et al.; *Science.* 2008 Dec 5;322(5907):1551-5. DOI: 10.1126/science.1164022
- (63) Mishra et al. *Nat Protoc.*(2014)Feb;9(2):323-36. doi: 10.1038/nprot.2014.019. Epub 2014 Jan 16. Erratum in: *Nat Protoc.* 2014 Oct;9(10):2513.
- (64) Mai-Morente et al.; *J Neurochem.* 2020 Sep 24. doi: 10.1111/jnc.15193.
- (65) Abudara et al.; *Glia.* 2015 May;63(5):795-811. DOI:10.1002/glia.22785
- (66) Chever et al, *J Neurosci.*(2014)Aug20;34(34):11228-32. doi:10.1523/J Neurosci.0015-14.2014
- (67) Domoki et al., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*(2008)Oct;295(4):R1099-108.
- (68) Wendling et al., *Anesth Analg* 82:264–268(1996).
- (69) Simandle et al., *Microvasc Res* 70:76–83(2005).
- (70) Nakagawa et al., *Neurochem Int.* 2009 Mar–Apr;54(3-4):253-63. doi:10.1016/j.neuint.2008.12.002.
- (71) Tigges et al., *Microvasc Res.*(2012)Jul;84(1):74-80. doi:10.1016/j.mvr.2012.03.008.
- (72) Zetterqvist et al., *J Diabetes Res*(2015)2015:428473. doi:10.1155/2015/428473.
- (73) Yemisci et al.;*Nat Med.*(2009)Sep;15(9):1031-7. doi: 10.1038/nm.2022.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)