



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**CONTROL DEL ACOPLAMIENTO NEUROVASCULAR A TRAVÉS
DE LA REGULACIÓN DE LOS HEMICANALES FORMADOS POR
CONEXINAS O PANEXINAS POR LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO
NÍTRICO EN LOS ASTROCITOS**

**Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con
mención en Ciencias Fisiológicas**

Por

MARIELA DEL CARMEN PUEBLA CATALÁN

DIRECTOR DE LA TESIS: XAVIER FIGUEROA FOESSEL

Julio, 2018

INFORME DE APROBACIÓN

DEDICATORIA

A mi padre, Medardo Puebla Dinamarca (1937-2007), por enseñarme con su ejemplo, que el trabajo arduo siempre trae frutos. Gracias por tu entrega, estarás siempre presente en mis pensamientos y en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que hay detrás de esta tesis y que, de una u otra manera, aportaron a su desarrollo. En primer lugar, agradezco infinitamente al Dr. Xavier Figueroa, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y no sólo apoyar la realización de mi tesis, sino también por su constante preocupación tanto en el ámbito laboral y como personal. Gracias por su confianza, paciencia, tiempo y consideración en todo momento. He conocido a muchos profesores en distintos ámbitos de mi carrera, pero el Dr. Figueroa posee una calidad humana particular, que sin duda es su sello como mentor. Agradezco también a todos mis compañeros de laboratorio: Inés Poblete, Pablo Gaete, Mauricio Lillo, Pía Burboa, Manuel Muñoz, Víctor Lazo, Hilda Espinoza, Alexandra Córdova y Andrea Saavedra, cada uno de ustedes está camuflado entre las líneas de este escrito, gracias por su amistad, toda su ayuda y apoyo.

Quisiera agradecer especialmente al Dr. Juan Carlos Sáez por facilitarme equipamiento de su laboratorio para el desarrollo de mi tesis, gracias a Paola Fernández y a todos los integrantes del laboratorio por su buena voluntad. También a la Dra. María Estela Andrés, por facilitar equipamiento de su laboratorio, en especial a su lab-manager Marcela González y a todos los integrantes de su laboratorio por su buena disposición.

Aprovecho de agradecer también al Dr. Rodrigo Iturriaga por su apoyo y comprensión durante mi extensión de beca.

Los agradecimientos más grandes van para toda mi familia: mi madre y mis hermanos que me apoyan siempre. A mi marido Pablo Tapia, no sé qué haría sin ti, la mitad de esta tesis es tuya y de nuestros maravillosos hijos Emilio y Alicia, ustedes tres han sido mi mayor inspiración y mis mejores títulos, gracias por la comprensión y el apoyo, los amo.

A mi padre, espero que estés orgulloso mí.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Beca Ayudante Becario VRI (2012-2013)

Beca Ayudante Instructor VRI (2014-2017)

Beca complemento Facultad de Ciencias Biológicas (2012-2016)

Beca CONICYT de apoyo eventos cortos (2012, 2014, 2015)

FONDECYT 1100850

FONDECYT 1150530

Proyecto Puente n° 30/2014

ÍNDICE DE MATERIAS

INFORME DE APROBACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
FUENTES DE FINANCIAMIENTO.....	v
ÍNDICE DE MATERIAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Acoplamiento Neurovascular	8
2.- Óxido nítrico y óxido nítrico sintasas.....	13
3.- Uniones en hendidura y hemicanales	14
3.1.- Connexina-43.....	19
4.- Panexina-1	21
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
1.- Animales.....	27
2.- Cultivos primarios de astrocitos	27
3.- Rebanadas intactas.....	28
4.- Inmunofluorescencia	29
5.- Proximity Ligation Assay (PLA).....	32
6.- Western blot.....	32
7.- Biotin switch.....	33
8.- Inmunoprecipitación.....	35
9.- Captación de colorante	36
10.- Detección de la señal de Ca^{2+} con Fluo-4.....	36
11.- Detección de ATP.....	37
12.- Detección de NO	38
13.- Transfección de cultivos primarios	38

14.- Expresión de canales de CALHM1 en ovocitos de <i>Xenopus Laevis</i>	39
15.- Electrofisiología, dos electrodos (dual voltage-clamp)	39
16.- Análisis estadísticos.....	40
RESULTADOS	41
1 Participación del NO en el acoplamiento neurovascular	41
2 Participación de los hemicanales formados por Cx43 y los canales formados por Pannx-1 en la respuesta iniciada por los mGluR	51
3 Participación de la señalización purinérgica en la respuesta asociada al acoplamiento neurovascular	64
4 Participación de CALHM1 en la señalización astrocítica que media el acoplamiento neurovascular	69
DISCUSIÓN	94
CONCLUSIONES.....	102
BIBLIOGRAFÍA	105
APÉNDICE (PAPERS DE LA TESIS).....	120

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribución de las arterias cerebrales.....	3
FIGURA 2. Distribución de la glía limitans.....	5
FIGURA 3. Esquema de la unidad neurovascular.....	10
FIGURA 4. Representación de la estructura de las uniones en hendidura.....	16
FIGURA 5. Expresión de NOS en cerebro y astrocitos de corteza cerebral de rata.....	42
FIGURA 6. Localización de NOS en astrocitos de cerebro de rata.....	44
FIGURA 7. La estimulación con glutamato aumenta la producción de NO en rebanadas de cerebro de rata.....	46
FIGURA 8. La actividad vasomotora de arteriolas parenquimales de corteza de cerebro de rata inducida por glutamato depende de la producción de NO.....	48
FIGURA 9. La activación de mGluR induce aumentos de Ca^{2+} libre dependientes de la producción de NO en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	50
FIGURA 10. La activación de mGluR induce la apertura de canales en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	52
FIGURA 11. Expresión de Cx43 y Panx-1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata....	54
FIGURA 12. Localización de Cx43 y Panx-1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata..	55
FIGURA 13. La actividad de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 es inducida por glutamato en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	57
FIGURA 14. La actividad de canales inducida por la activación de mGluR depende de la producción de NO en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	59
FIGURA 15. El aumento de Ca^{2+} libre inducido por glutamato depende de la actividad de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	61
FIGURA 16. Asociación espacial entre Cx43/eNOS y Panx-1/eNOS en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	63
FIGURA 17. La activación de canales inducida por glutamato depende de la actividad de receptores purinérgicos en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	65

FIGURA 18. El aumento de Ca^{2+} libre inducido por glutamato depende de la actividad de receptores purinérgicos en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	66
FIGURA 19. La activación de mGluR induce la liberación de ATP en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	68
FIGURA 20. El CALHM1 se expresa en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	70
FIGURA 21. La liberación de ATP inducida por glutamato depende de la activación de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	71
FIGURA 22. La actividad de canales inducida por glutamato depende de la activación de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	73
FIGURA 23. El aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por glutamato depende de la activación de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	74
FIGURA 24. La disminución de la expresión de CALHM1 no afecta la expresión de Cx43 o Panx-1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	75
FIGURA 25. La liberación de ATP inducida por glutamato depende de la expresión de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	77
FIGURA 26. La actividad de canales inducida por glutamato depende de la expresión de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	78
FIGURA 27. El aumento de Ca^{2+} libre inducido por glutamato depende de la expresión de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	79
FIGURA 28. Asociación espacial entre CALHM1/eNOS en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	81
FIGURA 29. La señal de S-nitrosilación total aumenta luego de la activación de mGluR en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	83
FIGURA 30. La estimulación con glutamato aumenta el grado de S-nitrosilación de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	85
FIGURA 31. El CALHM1 inmunoprecipita con un anticuerpo anti S-NO en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	87
FIGURA 32. La actividad de CALHM1 depende de la presencia de NO en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	89
FIGURA 33. El aumento de Ca^{2+} libre inducido por NO depende de la actividad de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.....	90

FIGURA 34. La activación de CALHM1 depende de la presencia de NO en ovocitos.....	92
FIGURA 35. El CALHM1 es S-nitrosilado en ovocitos estimulados con donadores de NO.....	93
FIGURA 36. Mecanismo propuesto.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

aCSF: líquido cefalorraquídeo artificial

ATP: Adenosin trifosfato

BK: Canales de K^+ de alta conductancia activados por Ca^{2+}

Ca^{2+} : Ión calcio

$[Ca^{2+}]_i$: Concentración de Ca^{2+} intracelular libre

CALHM1: Modulador de la homeostasis de calcio 1

CO: Monóxido de carbono

Cxs: Conexinas

Cx43: Conexina 43

DEANO: 2-(N,N-dietilamino)- 2-oxido-diazenolato

EDTA: Etilendiamino tetra-acético

EET: Ácido epoxieicosatrienoico

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial, NOS III

GFAP: Proteína fibrilar ácida de la glía

glut: Glutamato

GMPC: Guanilil monofosfato cíclico

H_2S : Sulfuro de hidrógeno

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible, NOS II

IP: Inmunoprecipitación

IP3: Inositol 1,4,5 tri-fosfato

kDa: kilo dalton

K_{ir} : Canales de K^+ rectificadores de entrada

L-NA: N ω -nitro-L-arginina

mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato

MOPS: Ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal, NOS I

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

N ω -propil-Arg: N ω -propil-arginina

Panx-1: Panexina 1

Panx-2: Panexina 2

Panx-3: Panexina 3

PGE: Prostaglandina E

PLA: Ensayo de ligación por proximidad (proximity ligation assay)

PPADS: Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2,4-disulfónico

P2X7: Receptor purinérgico ionotrópico

RNA: Ácido ribonucleico

Rut Red: Rojo rutenio

siRNA: RNA interferente

SNAP: S-nitroso acetil penicilamina

t-ACPD: Ácido trans-1-amino-1,3-ciclopentanodicarboxílico

TTX: Tetrodotoxina

WB: Western blot

RESUMEN

El acoplamiento neurovascular es un mecanismo complejo que relaciona los cambios en la actividad neuronal con el subsecuente cambio en el flujo sanguíneo cerebral local, de manera de asegurar el aporte de nutrientes y oxígeno, proporcional al aumento de la actividad neuronal. De este modo, la función integrada que surge de la comunicación entre una red de múltiples tipos celulares como son neuronas, astrocitos y células vasculares, representa una unidad funcional denominada “unidad neurovascular”.

La actividad neuronal es codificada en los astrocitos en forma de ondas de calcio (Ca^{2+}) intracelular, que se inician principalmente tras la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), y que se propagan hasta los procesos astrocíticos que están en una estrecha relación con las arteriolas cerebrales. La propagación interastrocítica de las ondas de Ca^{2+} es mediada por uniones en hendidura, pero además por la liberación de Adenosin-trifosfato (ATP) y la consiguiente estimulación de receptores purinérgicos. Así, se ha planteado que la liberación de ATP a través de hemicanales formados por conexina-43 (Cx43) o canales formados por panexina-1 (Panx-1) expresados en los astrocitos, podrían participar en la coordinación de las ondas de Ca^{2+} entre los astrocitos. Sin embargo, el rol de estos canales en la señalización de Ca^{2+} observada en los astrocitos durante el acoplamiento neurovascular no está claro. Por otra parte, existen unos pocos trabajos que muestran la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en los astrocitos, por lo que estas células podrían producir óxido nítrico (NO). En este contexto, se ha documentado que el NO induce la apertura de hemicanales formados por Cx43 por directa S-nitrosilación, mientras que la regulación vía NO de la apertura de canales formados por Panx-1 es controversial; sin embargo, no está descrito si el NO producido por los astrocitos participa en la modulación de la apertura de estos canales en el acoplamiento neurovascular. Además, se

ha descrito la existencia de un canal que posee similitudes estructurales con hemicanales formados por conexinas y canales formados por panexinas, el calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1), el cual se ha documentado que participa en la liberación de ATP, pero no se ha estudiado si este canal puede ser modulado por NO, así como tampoco si participa en los mecanismos asociados al acoplamiento neurovascular. Con estos antecedentes, se propuso que la apertura de los hemicanales formados por Cx43 y/o canales formados por Panx-1 a través del NO producido por los astrocitos, contribuye al acoplamiento neurovascular por medio de la liberación de ATP. Los objetivos generales planteados fueron: 1) determinar si el NO producido por los astrocitos participa en el acoplamiento neurovascular; 2) evaluar si la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato induce la apertura de hemicanales formados por Cx43 y/o canales formados por Panx-1 a través de la producción de NO en los astrocitos; 3) determinar si la liberación de ATP a través de hemicanales formados por Cx43 y/o canales formados por Panx-1 participa en el acoplamiento neurovascular. Estos objetivos se desarrollaron principalmente en cultivos primarios de astrocitos y rebanadas de cerebro de rata, encontrándose que la vasodilatación de las arteriolas parenquimales cerebrales inducida por la activación de mGluR depende del aumento en la producción de NO en los astrocitos. Además, la activación de mGluR en los astrocitos indujo un aumento en la apertura de los hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1, mientras que las ondas de Ca^{2+} , generadas tras la activación de mGluR, fueron inhibidas por el bloqueo de estos canales, así como también por el bloqueo de los receptores purinérgicos. Sin embargo, el bloqueo de los hemicanales formados por Cx43 o canales formados por Panx-1 no abolió la liberación de ATP. Adicionalmente, se determinó por primera vez que CALHM1 se expresa en astrocitos y que la activación de mGluR produce la apertura de CALHM1, dependiente de su S-nitrosilación, siendo esta la vía de liberación de ATP. Estos resultados indican que la apertura de CALHM1 vía S-nitrosilación

dependiente de NO, inicia los eventos que llevan al aumento de Ca^{2+} gatillado por la estimulación de los mGluR en los astrocitos. La consecuente liberación de ATP a través de CALHM1 induce la apertura de canales de Cx43 y Panx-1, los cuales junto con la activación de los receptores purinérgicos contribuyen al aumento de Ca^{2+} mediado por los mGluR durante el acoplamiento neurovascular.

ABSTRACT

Neurovascular coupling is a complex mechanism that connects the changes in the neuronal activity with the subsequent change in the local brain blood flow, ensuring the delivery of nutrients and oxygen in a proportional amount to the increase in neuronal activity. This process allows the integrated communication between a network of multiple cellular types, such as neurons, astrocytes and vascular cells, which represent a functional unit called “neurovascular unit”. Neuronal activity is codified in the astrocytes as intracellular calcium (Ca^{2+}) waves, which are initiated by the activation of metabotropic glutamate receptors (mGluR) and are propagated to astrocytic end-feet found in close functional relation with cerebral parenchymal arterioles. The interastrocytic propagation of the Ca^{2+} waves is mediated by gap junctions, but also Adenosin-triphosphate (ATP) release and the subsequent stimulation of purinergic receptors are involved in this process. In this way, it has been proposed that ATP release through connexin-43 (Cx43)-formed hemichannels or pannexin-1 (Panx-1)-formed channels expressed in the astrocytes participate in the coordination of the Ca^{2+} waves between astrocytes. However, the role of these channels in the Ca^{2+} signaling observed in astrocytes during neurovascular coupling is not clear. Furthermore, there are a few reports that showed the expression of the enzyme nitric oxide synthase (NOS) in astrocytes, so these cells could produce nitric oxide (NO). In this context, it has been documented that NO induces the opening of Cx43-formed hemmichannels by direct S-nitrosylation, while the regulation of Panx-1-formed channels by NO is controvertial; nevertheless, it has not been described the participation of astrocytic NO production in the modulation of the opening of these channels in the neurovascular coupling. In addition, it has been described the existence of a channel with similar topological characteristics than connexin-formed hemichannels and pannexin-formed channels, the calcium homeostasis modulator 1

(CALHM1), which has been described that participates in ATP release, but it has not been studied if this channel could be modulated by NO or if it is involved in the mechanism associated to neurovascular coupling. In view of these data, it was proposed that the opening of Cx43-formed hemichannels and/or Panx-1-formed channels by astrocytic NO production contributes to neurovascular coupling through ATP release. The general objectives were: 1) to determine if NO production by astrocytes participates in the neurovascular coupling; 2) to evaluate if the activation of mGluR induces the opening of Cx43-formed hemichannels and/or Panx-1-formed channels through astrocytic NO production; 3) to determine if the ATP release through Cx43-formed hemichannels and/or Panx-1-formed channels participates in the neurovascular coupling. These objectives were developed mainly in primary culture of rat brain cortex astrocytes and rat brain slices and the results show that the vasodilation of the parenchymal arterioles induced by mGluR activation depends on an increase in NO production by astrocytes. In addition, the activation of mGluR in astrocytes induced an increase in the Cx43-formed hemichannel and Panx-1-formed channel opening, while the Ca^{2+} waves generated by the activation of mGluR were inhibited by the blockage of these channels and also by the inhibition of purinergic receptors. Nevertheless, the blockage of Cx43-formed hemichannels and Panx-1-formed channels did not abolish ATP release. Additionally, the data of this work show for first time, that CALHM1 is expressed in astrocytes and that the activation of mGluR leads to CALHM1 opening by NO-dependent S-nitrosylation, which is the pathway of the ATP release observed in this response. These results indicate that CALHM1 opening through NO-dependent S-nitrosylation triggers the events that leads to the Ca^{2+} increase observed in astrocytes in response to mGluR stimulation. The consequent ATP release through CALHM1 induces the opening of Cx43-formed hemichannels and Panx-1-formed channels, which in combination with the

activation of purinergic receptors contributes to the mGluR-mediated Ca^{2+} increase observed during the neurovascular coupling.

INTRODUCCIÓN

El cerebro representa aproximadamente el 2% del peso corporal; sin embargo, recibe entre el 15-20% del gasto cardiaco total, lo cual lo convierte en uno de los órganos más altamente irrigados del cuerpo. La alta demanda metabólica del cerebro, requiere no sólo una gran fracción del gasto cardiaco sino también un flujo sanguíneo acorde a las necesidades (Cipolla, 2010).

La interrupción del flujo sanguíneo genera la detención de las funciones cerebrales en segundos y un daño celular que es irreversible en cuestión de minutos (Iadecola, 2004). Esto ocurre porque el cerebro no posee reservas de energía relevantes, de modo que el suministro sanguíneo debe asegurar una entrega adecuada de oxígeno, glucosa y otros nutrientes importantes, así como también la remoción de metabolitos como ácido láctico y dióxido de carbono (Lecrux y Hamel, 2011).

El suministro de sangre arterial al cerebro humano proviene de dos pares de arterias, la carótida interna derecha e izquierda y las arterias vertebrales derecha e izquierda. Las arterias carótidas internas suministran sangre al cerebro, mientras que las dos arterias vertebrales se unen distalmente para formar la arteria basilar. Las ramas de las arterias vertebrales y basilar suministran sangre al cerebelo y al tronco encefálico. Proximalmente, la arteria basilar se une a las dos arterias carótidas internas y otras arterias comunicantes para formar un completo anillo anastomótico en la base del cerebro, conocido como el círculo o polígono de Willis. El círculo de Willis da lugar a tres pares de arterias principales: las arterias cerebrales anteriores, medias y posteriores, las que se dividen progresivamente hacia arterias más

pequeñas y arteriolas que recorren la superficie hasta penetrar el tejido cerebral para suministrar sangre a las regiones correspondientes de la corteza cerebral (Cipolla, 2010).

Las arterias extracerebrales se bifurcan formando las arteriolas piales que rodean la superficie del cerebro y luego penetran el parénquima cerebral en ángulos rectos como arteriolas penetrantes o parenquimales. Las arteriolas parenquimales a su vez, conforman una extensa red capilar, distribuida para asegurar la demanda metabólica neuronal (Edvinsson y MacKenzie, 2002). La distribución de arterias cerebrales se muestra en la Figura 1.

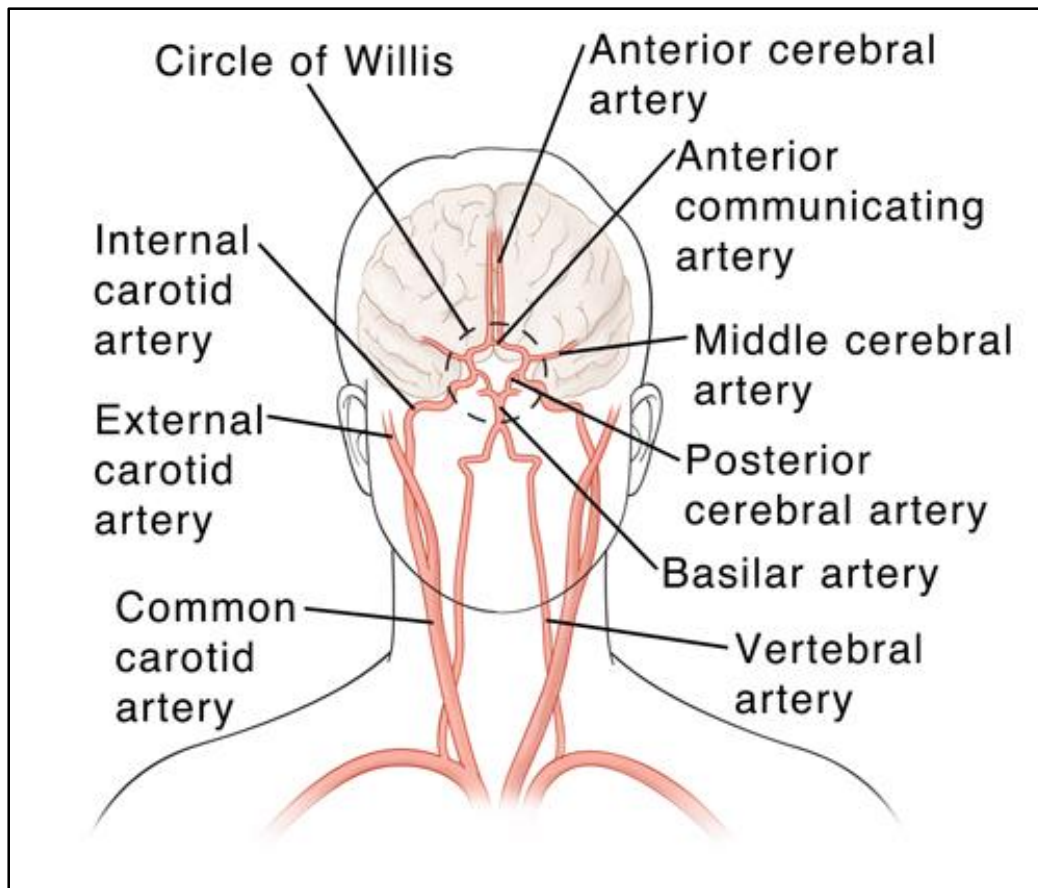


FIGURA 1: *Distribución de las arterias cerebrales*. La densa red vascular cerebral, se forma a partir de las arterias carótidas y vertebrales, las cuales se unen para formar el círculo de Willis, desde donde nacen las arterias cerebrales anteriores, medias y posteriores. Otras arterias recorren la superficie cerebral, constituyendo las arterias piales, que penetran el parénquima y se ramifican densamente, constituyendo así el árbol vascular cerebral.

(Fuente: <https://www.elcaminohospital.org/library/carotid-artery-disease>)

Debido a su fácil acceso, desde el punto de vista quirúrgico, y a su relevancia en la circulación cerebral, las arteriolas piales han sido ampliamente utilizadas en estudios funcionales in vivo. Este tipo de estudios ha demostrado que la relajación de las arteriolas piales está influenciada por la presencia de la glía limitans (Xu *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005; Leffler *et al.*, 2006). La glía limitans corresponde a una densa capa de procesos astrocíticos ubicada en la región más externa de la corteza cerebral (Allt y Lawrenson, 1997; Cipolla, 2010), por debajo de los vasos piales, cuya distribución puede observarse en el corte de corteza de cerebro de rata mostrado en la Figura 2, el cual corresponde a un resultado original obtenido durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

Los procesos astrocíticos recorren la corteza y también recorren los contornos de los vasos sanguíneos cerebrales, por lo que las neuronas tienen un contacto directo muy reducido con los vasos (Iadecola y Nedergaard, 2007), lo que ha llevado a proponer que los astrocitos podrían tener un rol como mediadores intercelulares. Los astrocitos son un tipo celular muy abundante en la corteza cerebral, superando en número a las neuronas, en una relación 3:1 en roedores, cuya generación durante el desarrollo ocurre posterior al de las neuronas en muchas regiones del sistema nervioso central y que se ha descrito constituyen un puente estructural entre las neuronas y los vasos sanguíneos (Bignami *et al.*, 1991; Kacem *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 1991; Paspalas y Papadopoulos, 1998; Iadecola y Nedergaard, 2007; Sofroniew y Vinters, 2010).

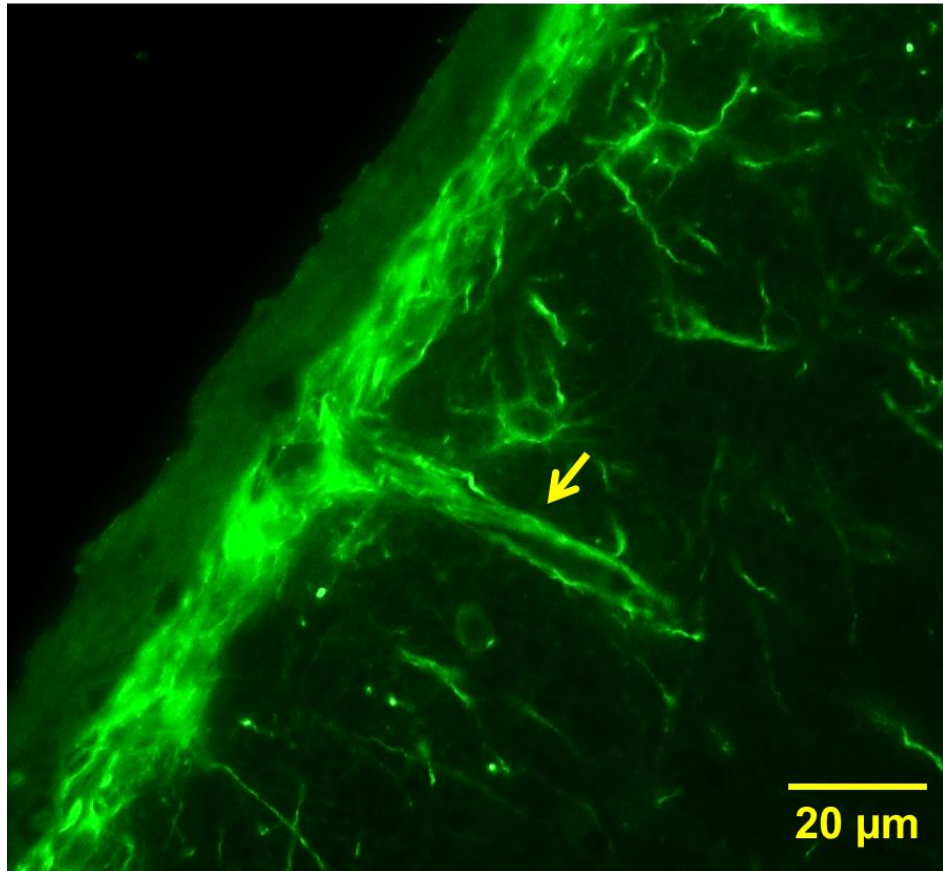


FIGURA 2: *Distribución de la glía limitans.* Inmunofluorescencia del marcador de astrocitos, la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), en la corteza cerebral de rata. La glía limitans recubre densamente la corteza cerebral. Los astrocitos, de igual manera, recubren los bordes de los vasos cerebrales (flecha).

Los astrocitos se caracterizan por poseer una morfología estrellada con prolongaciones denominadas procesos astrocíticos, los cuales envuelven los contactos sinápticos, de manera que se encuentran en una posición estratégica para sensor la actividad sináptica y acoplarla con el metabolismo energético neuronal (Derouiche y Frotscher, 1991).

Si bien los astrocitos inicialmente fueron considerados como elementos pasivos, con una función más bien de soporte estructural en el sistema nervioso central, actualmente son varios los roles que se han demostrado para estas células, dentro de los cuales se incluyen el constituir un soporte metabólico para las neuronas, homeostasis de metabolitos y electrolitos (tamponamiento espacial de potasio), remoción/reciclaje de neurotransmisores, señalización celular, modulación de la sinapsis, entre otros (Kimelberg y Norenberg, 1989, Kirchhoff *et al.*, 2001; Ricci *et al.*, 2009). Se ha documentado que, durante el desarrollo del cerebro, los astrocitos generan uniones moleculares que contribuyen a guiar la migración de los axones de las neuronas en crecimiento, además de participar en la reparación del sistema nervioso (Sofroniew y Vinters, 2010). Por otra parte, también tienen una relación funcional con células no neuronales, ya que se les ha asociado con la promoción de la actividad mielinizante de los oligodendrocitos (Ishibashi *et al.*, 2006).

Debido a que se ha descrito que expresan un gran número de receptores para neurotransmisores en su membrana plasmática, se piensa que los astrocitos se encuentran involucrados en varios procesos de regulación (Vesce *et al.*, 1999a; Vesce *et al.*, 1999b; Volterra y Meldolesi, 2005).

Se han sumado muchos ejemplos de roles específicos y esenciales de los astrocitos en procesos fisiológicos normales, así como también se han descrito enfermedades asociadas a

su funcionamiento deficiente (Volterra y Medolesi, 2005). Se ha descrito que la disfunción de los astrocitos puede alterar su capacidad de regular la homeostasis del sistema nervioso central y de esta manera promover el desarrollo o progresión de desórdenes neurológicos como epilepsia, migraña y alteraciones neuroinflamatorias (Ricci *et al.*, 2009).

Por otra parte, actualmente es bien reconocido que la generación de una señal de Ca^{2+} en los astrocitos es esencial en la comunicación con las neuronas, y que estas elevaciones transitorias de Ca^{2+} en los astrocitos, gatillaría la liberación de moléculas transmisoras (denominadas gliotransmisores) que pueden modular la actividad de las neuronas vecinas (Zonta y Carmignoto, 2002; Schipke y Kettenmann, 2004). La existencia de comunicación recíproca entre neuronas y astrocitos también ha sido documentada en estudios de la función cerebral en humanos, en donde se ha determinado una comunicación funcional bidireccional entre neuronas y astrocitos (Navarrete *et al.*, 2013).

Además, se ha descrito un rol crucial de los astrocitos en la comunicación entre las neuronas y microvasculatura cerebral (Zonta *et al.*, 2003; Schipke y Kettenmann, 2004). Desde el punto de vista de la función vascular, los astrocitos cumplen un papel fundamental en el desarrollo de la barrera hematoencefálica, la cual es una barrera física formada por las células endoteliales y componentes regulatorios como pericitos y astrocitos. Esta barrera impide la entrada al cerebro de ciertas moléculas en función de su tamaño y polaridad, protegiendo, de esta manera, al cerebro de toxinas circulantes y asegurando la mantención del microambiente especializado para la función neuronal (Abbott *et al.*, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010, De Brock *et al.*, 2013). Por otro lado, los astrocitos también participan de manera importante en el control del flujo sanguíneo cerebral a través del mecanismo conocido como “acoplamiento neurovascular”, el cual es esencial para el correcto funcionamiento del cerebro. Los astrocitos

están estratégicamente posicionados para regular tanto la transmisión sináptica como el acoplamiento neurovascular, ya que los procesos de un solo astrocito pueden contactar decenas de miles de sinapsis, mientras que otros procesos de la misma célula forman unas estructuras especializadas denominadas pies astrocíticos, que se proyectan hacia los microvasos y "envuelven" a los capilares y las arteriolas (Haydon y Carmignoto, 2006).

1.- Acoplamiento Neurovascular

El acoplamiento neurovascular es un mecanismo de señalización intercelular que permite la regulación del flujo sanguíneo en las distintas regiones del cerebro, de manera tal, que un aumento en la actividad neuronal se asocia con un incremento proporcional del flujo sanguíneo hacia esa región del cerebro. Inicialmente, se pensaba que la producción de óxido nítrico (NO) observada durante un aumento de la actividad sináptica podía cumplir un papel relevante en el acoplamiento neurovascular (Bredt *et al.*, 1990). Sin embargo, las evidencias sobre la participación del NO en este proceso son controversiales. Aunque varios estudios muestran que la inhibición de la producción de NO reduce la vasodilatación asociada al incremento de la actividad neuronal (Faraci y Brian, 1994; Bhardwaj *et al.*, 2000; Nakahata *et al.*, 2008), la eliminación de la expresión de la enzima que sintetiza el NO en las neuronas, la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (nNOS), sólo atenúa o no tiene efecto sobre el acoplamiento neurovascular (Irikura *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996; Kitaura *et al.*, 2007; Lourenço *et al.*, 2017), lo cual sugiere que el NO está involucrado en el acoplamiento neurovascular, pero no como la señal vasodilatadora que controla directamente la respuesta de las arteriolas parenquimales. Consistente con esta noción, Lindauer *et al.* demostraron que el NO modula el proceso de señalización activado en el acoplamiento neurovascular, pero no es la señal vasodilatadora que produce el aumento del flujo sanguíneo local asociado a la

actividad neuronal (Lindauer *et al.*, 1999), lo cual es también coherente con la probable dificultad del NO para alcanzar los vasos, en vista de su corta vida media y la presencia de los astrocitos entre las neuronas y las arteriolas (Iadecola y Needegard, 2007). De esta manera, en estudios más recientes se ha descrito que el acoplamiento neurovascular depende de la comunicación mediada por los astrocitos de las neuronas con las arteriolas parenquimales (Xu *et al.*, 2008; Girouard *et al.*, 2010; LeMaitre-Stobart *et al.*, 2013).

En este contexto, la integración de la función cerebral a través de una red de comunicación compleja compuesta por múltiples tipos celulares como las neuronas, astrocitos y células vasculares, especialmente células endoteliales, representa una unidad funcional denominada “Unidad Neurovascular” (Zheng *et al.*, 2010, Xue *et al.*, 2013), cuyos componentes poseen interacciones dinámicas que influyen en procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos (del Zoppo y Mabuchi, 2003).

Los reportes más recientes relacionados con la unidad neurovascular han mostrado, a través de estudios *in vitro*, que cada uno de sus componentes es imprescindible para el correcto funcionamiento del mecanismo vasodilatador asociado al incremento de la actividad neuronal (Xue *et al.*, 2013). La Figura 3 muestra los componentes y distribución de la unidad neurovascular.

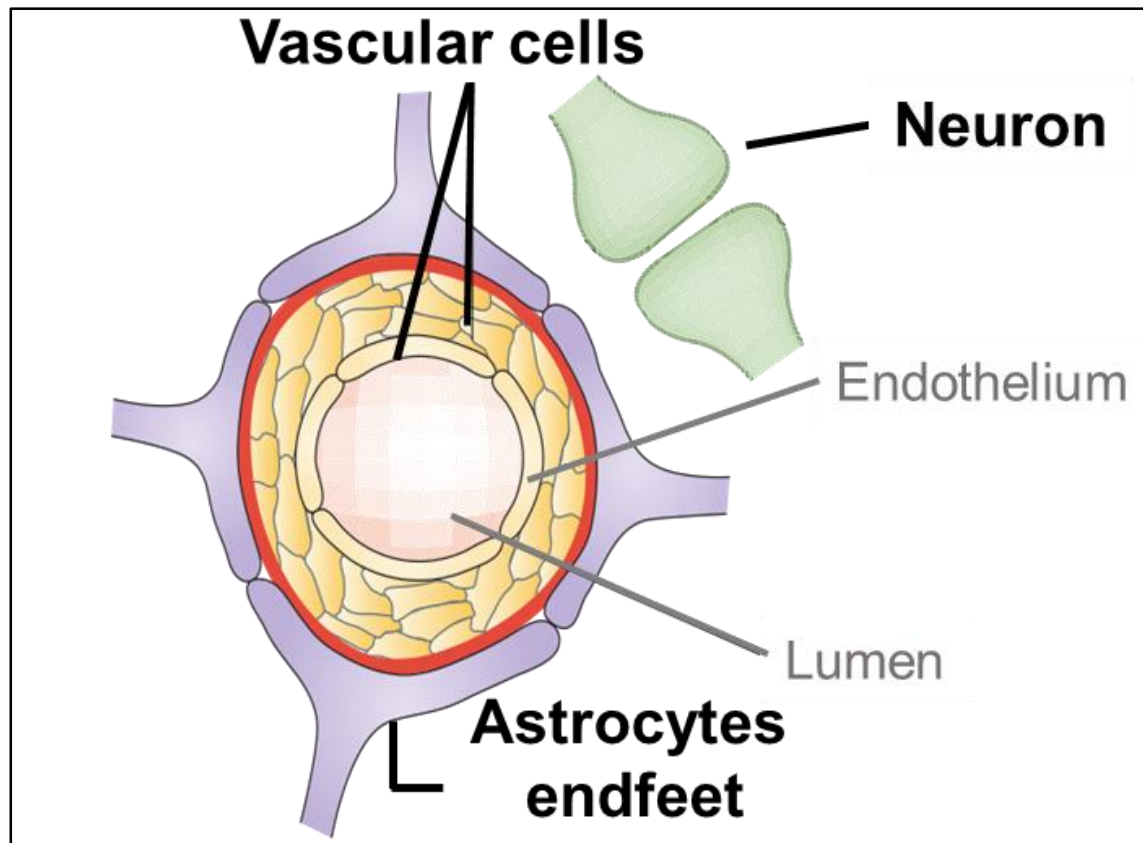


FIGURA 3: *Esquema de la unidad neurovascular.* La unidad neurovascular está compuesta por células vasculares, neuronas y astrocitos. Los astrocitos, específicamente sus estructuras denominadas “pies astrocíticos”, rodean los vasos cerebrales, por lo que se considera que las neuronas no tienen contacto físico directo con los vasos, de modo que serían los astrocitos los que traducen las señales neuronales hacia los vasos, permitiendo así los cambios en la actividad de estos. (Fuente: Modificado de Zlokovic, 2011).

Se ha determinado que los astrocitos pueden “sensar” la actividad neuronal y transmitir esta información a las arteriolas parenquimales, jugando un rol importante en el acoplamiento entre la actividad neuronal y el flujo sanguíneo cerebral (Haydon y Carmignoto, 2006; Xu *et al.*, 2008, Otsu *et al.*, 2015).

La activación de la señalización de Ca^{2+} (Ca^{2+}) intracelular en los astrocitos es el evento clave en el acoplamiento neurovascular, conduciendo a la liberación de gliotransmisores que actúan tanto en neuronas como en células de la vasculatura, permitiendo de esta manera que los astrocitos no sólo regulen la actividad neuronal, sino también el flujo sanguíneo cerebral (Bazargani y Atwell, 2016). La activación de receptores en los astrocitos conduce a la generación ondas de Ca^{2+} intracelular, las cuales se propagan hasta los pies astrocíticos, donde gatillan la producción y la posterior liberación de factores vasodilatadores dependiente de Ca^{2+} (Anderson y Nedergaard, 2003; Zonta *et al.*, 2003; Lovick *et al.*, 2005, Haydon y Carmignoto, 2006; Metea y Newman, 2006; Filosa y Blanco, 2007). Se ha demostrado que varios neurotransmisores, tales como norepinefrina (Duffy y MacVicar, 1995; Kulik *et al.*, 1999), GABA (Kang *et al.*, 1998), acetilcolina (Shelton y McCarthy, 2000; Araque *et al.*, 2002), adenosina (Porter y McCarthy, 1995a), ATP (Bowser y Khakh, 2004; Perea y Araque, 2005) y glutamato (Porter y McCarthy, 1995b; 1996), inducen aumentos de Ca^{2+} en los astrocitos. No obstante, dado que el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro (Meldrum, 2000), la mayoría de los estudios sobre acoplamiento neurovascular y la señalización de Ca^{2+} en astrocitos se han focalizado en las respuestas activadas por este neurotransmisor y, por tanto, es el mejor caracterizado en este tipo de estudios. En este contexto, se piensa que glutamato inicia las ondas de Ca^{2+} en astrocitos a través de la activación de los receptores metabotrópicos de clase I, los cuales están acoplados a la

producción de inositol-trifosfato (IP3) dependiente de fosfolipasa C y la subsecuente liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares sensibles a IP3 (Kawabata *et al.*, 1996). Los estudios sobre el acoplamiento neurovascular han mostrado que las ondas de Ca^{2+} generadas en los astrocitos, en respuesta a un aumento en la actividad sináptica, alcanzan los pies astrocíticos y activan canales de potasio de alta conductancia activados por Ca^{2+} (BK), que se encuentran orientados hacia el espacio perivascular. Esto produce un pequeño aumento en la concentración de potasio ($< 20 \text{ mM}$) en este espacio, lo cual activa a los canales de potasio rectificadores de entrada (K_{ir}) localizados en las células musculares lisas, produciendo la hiperpolarización de la pared vascular y, de esta manera, vasodilatación (Filosa *et al.*, 2006). Además, el incremento en el Ca^{2+} en los pies de los astrocitos también puede iniciar la conversión de ácido araquidónico a los vasodilatadores prostaglandina E (PGE) y ácido epoxieicosatrienoico (EET), los cuales también contribuirían a la vasodilatación observada durante el acoplamiento neurovascular (Haydon y Carmignoto, 2006, Zheng *et al.*, 2010).

El aumento de Ca^{2+} intracelular en los astrocitos, no sólo se podría propagar hacia los pies astrocíticos en la cercanía de los vasos cerebrales, sino que también se puede extender entre los astrocitos vecinos, ya que se ha descrito que los astrocitos forman un amplio sincicio glial, debido a que se encuentran fuertemente acoplados a través de uniones en hendidura o gap junctions (Rouach *et al.*, 2002). Las uniones en hendidura son canales intercelulares formado por una familia de proteínas denominadas conexinas (Cxs), estos canales conectan el citoplasma de células vecinas permitiendo el paso de moléculas de señalización, tal como IP3, también glucosa, glutamato, glutamina y lactato. De esta manera, los astrocitos no se deben considerar como elementos individuales sino más bien como un grupo ordenado de

células comunicantes, permitiendo la coordinación de los mecanismos vasodilatadores en una región parenquimal específica (Leybaert, 1998; Álvarez-Maubecin, 2000; Rouach *et al.*, 2000; Kirchhoff *et al.*, 2001; Metea y Newman, 2006; Ricci *et al.*, 2009, Giaume *et al.*, 2012). La asociación entre astrocitos, permitiría la conducción de la propagación local río arriba, vale decir hasta arteriolas de mayor calibre como arteriolas piales a nivel de la corteza cerebral (Xu *et al.*, 2008).

2.- Óxido nítrico y óxido nítrico sintasas

Las óxido nítrico sintasas (NOS) son una familia de enzimas diméricas del tipo oxidoreductasas que catalizan la oxidación de L-arginina utilizando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y oxígeno como co-sustratos, para formar citrulina y NO (Daff, 2010). El NO actúa como una señal bioquímica en un amplio número de procesos (Bredt y Snyder, 1990; Wang y Marsden, 1995; Stuehr, 1999). Se han descrito tres isoformas de NOS con una organización estructural y funcional altamente conservada y significativa homología en sus secuencias aminoacídicas (Moncada *et al.*, 1997). Las tres isoformas son conocidas como: neuronal, (nNOS o NOS I), inducible (iNOS o NOS II) y endotelial (eNOS o NOS III) (Wang y Marsden, 1995).

La actividad de estas enzimas es controlada mediante la unión de calmodulina al motivo canónico de unión a calmodulina localizado entre los dominios reductasa y oxigenasa de las enzimas (Li y Poulos, 2005). Las isoformas eNOS y nNOS son activadas por aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, mientras que iNOS muestra mayor afinidad por Ca^{2+} /calmodulina, por lo que es constitutivamente activa a concentraciones basales de Ca^{2+} intracelular (Moncada *et al.*, 1997; Alderton *et al.*, 2001).

La nNOS se expresa de manera constitutiva principalmente en el cerebro y tejido neuronal central y periférico, con funciones en la plasticidad sináptica a nivel del sistema nervioso central (Moncada *et al.*, 1997; Bachetti *et al.*, 2004; Förstermann y Sessa, 2012). La iNOS es inducible y se expresa durante la activación de la respuesta inmune (Kanwar *et al.*, 2009; Förstermann y Sessa, 2012). Por otro lado, la eNOS se expresa principalmente en células endoteliales, participando en la dilatación de los vasos sanguíneos a través de la producción de NO, por estimulación de la guanilato ciclasa soluble y el consiguiente incremento de guanilil monofosfato cíclico (GMPc) en células del músculo liso (Rapoport *et al.*, 1983; Förstermann y Sessa, 2012), lo cual es la vía clásica de señalización del NO. Sin embargo, el NO también puede modular la actividad de proteínas de señalización, a través de la S-nitrosilación de residuos de cisteína (Gould *et al.*, 2013).

En ese contexto, cobra relevancia el hecho de que los astrocitos también expresan eNOS y nNOS bajo condiciones fisiológicas (Barna *et al.*, 1996; Gabbott y Bacon, 1996; Kugler y Drenckhahn, 1996; Iwase *et al.*, 2000; Šimic *et al.*, 2000; Catania *et al.*, 2001; Lüth *et al.*, 2001), pero no se han determinado las consecuencias funcionales de la presencia de estas enzimas en este tipo celular. Por otra parte, la expresión de la iNOS en astrocitos, sólo se ha reportado bajo condiciones inflamatorias (Barna *et al.*, 1996; Iwase *et al.*, 2000; Saha y Pahan, 2006).

3.- Uniones en hendidura y hemicanales

Las uniones en hendidura, también conocidas como gap junctions, están ampliamente expresadas en varios tipos celulares del sistema nervioso. Son canales que proveen soporte estructural para la directa comunicación eléctrica y metabólica entre células adyacentes

(Rouarch *et al.*, 2000; Sáez *et al.*, 2003), siendo responsables de la transferencia intercelular directa de iones y pequeñas moléculas, de un tamaño menor a 1000 dalton (Contreras *et al.*, 2004). Estos canales intercelulares están formados por la unión, entre dos células adyacentes, de dos canales denominados conexones o hemicanales. Sin embargo, los hemicanales pueden permanecer desapareados, formando canales funcionales que conectan el espacio extracelular e intracelular, lo cual representa una vía para la liberación de señales paracrinas como ATP, NAD^+ , prostaglandinas y NO. Además, estos canales pueden encontrarse en una configuración abierta o cerrada (Söhl y Willecke, 2004; Spray *et al.*, 2006). La estructura de las uniones en hendidura y los hemicanales se muestra en la Figura 4.

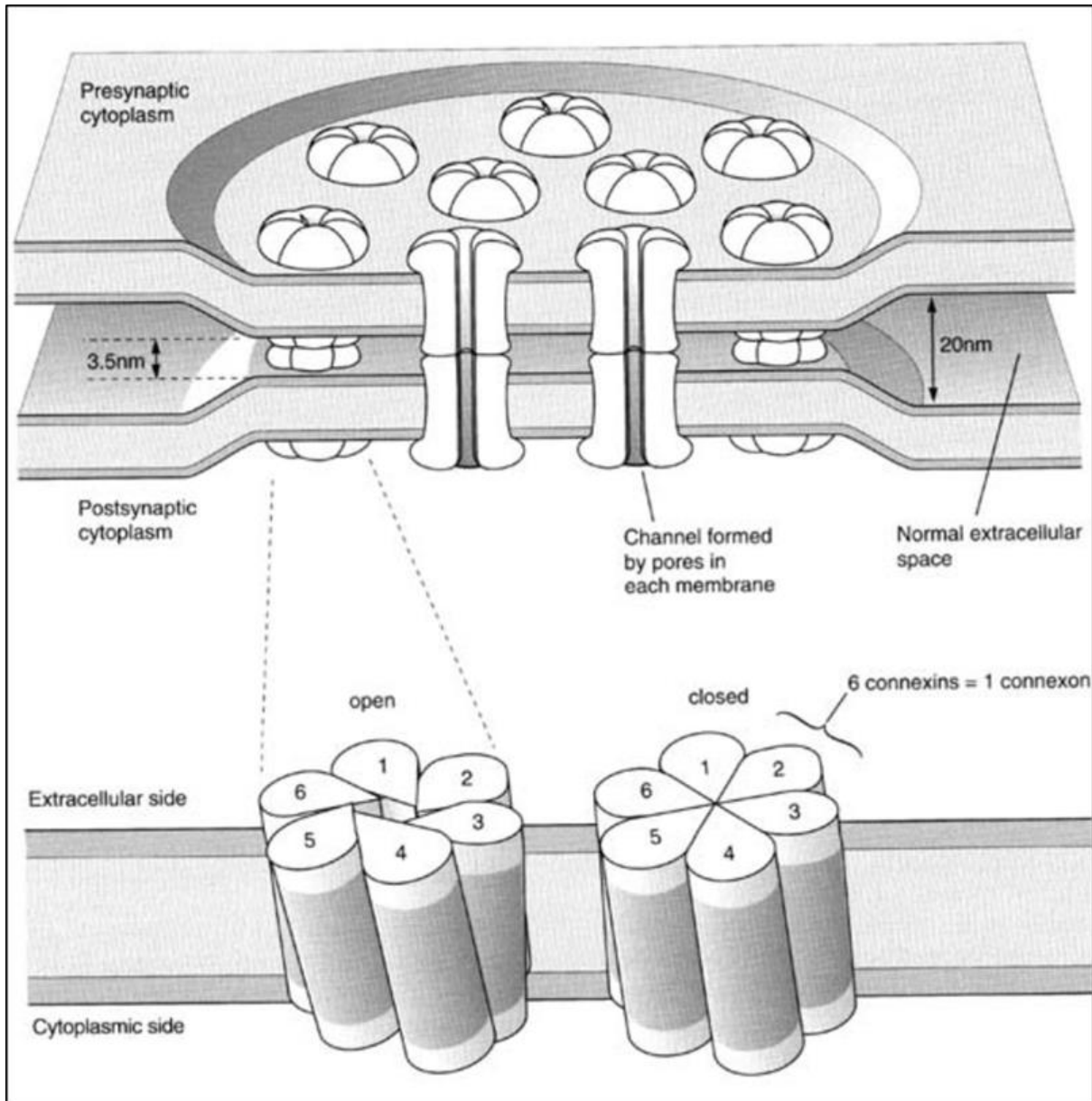


FIGURA 4: *Representación de la estructura de las uniones en hendidura.* Las uniones en hendidura (canales que unen los citoplasmas pre y post sinápticos en la parte superior de la figura) formadas por un hemicanal o conexón, cada uno aportado por cada célula vecina. A su vez, los hemicanales (estructura que conecta la cara extracelular con la citoplasmática en la parte inferior de la figura) se forman por la unión de 6 conexinas y pueden encontrarse en un estado abierto o cerrado (Söhl y Willecke, 2004).

Los hemicanales están constituidos por 6 unidades de proteínas denominadas conexinas, las cuales constituyen una familia de proteínas integrales de membrana que posee 20 y 21 miembros en los genomas de ratón y humano, respectivamente (Söhl y Willecke, 2004). Su denominación se ordena de acuerdo con su masa molecular relativa en kDa, por ejemplo: Cx32, Cx30, etc. (Sáez *et al.*, 2011). Estas proteínas poseen cuatro dominios transmembrana alfa-hélice conectados por un loop citoplasmático y dos loops extracelulares, donde tanto el extremo N y C-terminales son intracelulares (Orellana *et al.*, 2013). Las regiones que abarcan los cuatro dominios transmembrana y los loops extracelulares presentan una gran homología aminoacídica, sin embargo, los dominios citoplasmáticos son únicos para cada conexina. El loop citoplasmático y extremo C-terminal varían extensamente en longitud y composición aminoacídica (Sáez *et al.*, 2003). Las modificaciones post-traduccionales de las conexinas juegan un rol clave en la regulación de la funcionalidad tanto de las uniones en hendidura como de los hemicanales (Burra y Jiang, 2011; Pogoda *et al.*, 2016). Se ha reportado que las conexinas pueden ser modificadas por grado de fosforilación, las condiciones redox incluyendo efectos de NO, sulfuro de hidrógeno (H₂S) o monóxido de carbono (CO), acetilación, metilación o ubiquitinación (Tong *et al.*, 2015, Pogoda *et al.*, 2016).

Existe una amplia distribución de canales de conexinas en las células gliales (esto es astrocitos, oligodendrocitos y microglía), sin embargo, son los astrocitos los que exhiben un nivel más alto de comunicación vía uniones en hendidura comparados con las otras células del sistema nervioso, como las neuronas y los oligodendrocitos. Además, los astrocitos también expresan hemicanales (Giaume y Theis, 2010; Theis y Giaume, 2012). Se ha documentado que los astrocitos expresan las Cxs 26, 30, 40, 43, 45 y 46, de las cuales la Cx43 es la más abundante, aunque la Cx30 se encuentra enriquecida en los procesos astrocíticos (Nagy *et al.*, 1999; Condorelli *et al.*, 2002). Estudios en animales en que se

eliminó en forma específica la Cx43 en astrocitos indicaron que se produce un daño incrementado luego de un tratamiento isquémico, con elevada muerte neuronal, en comparación con el grupo control silvestre, lo que indicaría que los astrocitos tendrían un rol crítico en la neuroprotección durante un insulto isquémico (Nakase *et al.*, 2004). Sin embargo, la delección de Cx43 en astrocitos no elimina totalmente el acoplamiento astrocítico, debido a la presencia de uniones en hendidura formadas por Cx30 (Wallraff *et al.*, 2006). En este contexto, astrocitos de ratones carentes de Cx43 mostraron una disminución del traspaso de colorante, lo que se explica por una reducción en el acoplamiento interastrocítico, de alrededor del 50%, probablemente por la sobre-regulación compensatoria de Cx30 (Theis *et al.*, 2003; Nakase *et al.*, 2004), mientras el acoplamiento en astrocitos con delección en Cx30 sólo mostró una disminución de un 20%, sin sobre-regulación compensatoria de Cx43 (Gosejacob *et al.*, 2011). Consistente con estas observaciones, ratones dobles knockout para Cx43 y Cx30 (mGFAP-Cre Cx43^{fl/fl} Cx30^{-/-}, delección en astrocitos de Cx43 y delección global de Cx30) mostraron un acoplamiento completamente nulo (Wallraff *et al.*, 2006), lo cual desde el punto de vista del comportamiento de estos animales condujo a impedimentos sensorial-motor y de memoria espacial (Lutz *et al.*, 2009). Sin embargo, existe consenso en que en astrocitos la Cx43 es la principal proteína formadora de uniones en hendidura, las cuales se consideran como la vía más importante de propagación intercelular de la señalización de Ca²⁺ en estas células, así como una ruta para la liberación de gliotransmisores como ATP, cuando forma hemicanales, en donde el ATP actuaría como agente paracrino o autocrino (Thompson y MacVicar, 2008; Kang *et al.*, 2008).

3.1.- Conexina-43

La conexina-43 (Cx43), cuyo gen se localiza en el cromosoma 6 en humanos (Fishman *et al.*, 1991), es la proteína más abundante y ubicuamente expresada dentro de la familia de las conexinas, encontrándose en órganos como el cerebro, corazón, pulmones, huesos, estómago e intestino. A nivel celular, se ha documentado su expresión en más de 40 tipos de cultivos celulares primarios, convirtiéndola en la conexina más diversamente expresada dentro de la anatomía humana (Laird, 2006).

Se ha determinado que Cx43 juega un rol primordial en el desarrollo de los mamíferos, siendo esencial en procesos de diferenciación celular (Lo, 1996; Cheng *et al.*, 2015). Si bien se ha descrito que la Cx43 es la principal proteína formadora de uniones en hendidura en el corazón de mamíferos y que la regulación de la expresión de ésta proteína es importante tanto en el desarrollo cardíaco como en las propiedades eléctricas del corazón (De Leon *et al.*, 1994), también ha sido reconocida su importancia en el sistema nervioso central, en donde se han documentado roles relevantes, como por ejemplo participación en la producción y mantenimiento de la mielina (Nagy y Rash, 2000; Basu *et al.*, 2017).

La Cx43 es la principal conexina expresada en astrocitos (Giaume *et al.*, 1991; Dermeitzel *et al.*, 1991), formando tanto hemicanales como uniones en hendidura entre astrocitos (Cx43/Cx43) (Giaume y McCarthy, 1996; Scemes y Spray, 2012; Basu *et al.*, 2017). La activación de receptores en la membrana plasmática de los astrocitos por neurotransmisores como glutamato, puede generar la propagación de ondas de Ca^{2+} a través de dos vías, una de ellas involucra la comunicación directa entre el citosol de las células acopladas a través de uniones en hendidura formada por Cx43, mientras que la otra vía depende de la liberación de gliotransmisores, como ATP, a través de hemicanales formados por Cx43 principalmente,

los cuales activan receptores en células vecinas (Suadicani *et al.*, 2004; Scemes y Giaume, 2006).

La liberación de ATP a través de hemicanales formados por Cx43 en astrocitos ha sido ampliamente reportada, tanto en cultivos primarios como en líneas celulares de astrocitos (Stout *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2008; Orellana *et al.*, 2011; Stehberg *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2014), considerándose una vía clásica de liberación de ATP en mecanismos tan importantes como la regulación de la transmisión sináptica (Chever *et al.*, 2014).

Se ha descrito que Cx43 puede ser regulada por su grado de fosforilación/desfosforilación (Lampe y Lau, 2004; Li *et al.*, 2005; Solan y Lampe, 2009; Pogoda *et al.*, 2016), lo cual ha sido implicado en la regulación de esta conexina a distintos niveles, como oligomerización de hemicanales, exportación de la proteínas a la membrana plasmática, actividad de hemicanales, ensamblaje y apertura de uniones en hendidura, y degradación de la conexina, afectando de esta manera tanto la estructura de la proteína como su función, conduciendo a cambios en la localización, interacción con otras proteínas y la selectividad como canal (Solan y Lampe, 2009). Otro mecanismo de regulación para Cx43 que ha sido reportado, ocurre a través de la S-nitrosilación, en células endoteliales de microvasculatura, se ha evidenciado que la Cx43 que forma uniones en hendidura de uniones mioendoteliales se encuentra constitutivamente S-nitrosilada (Straub *et al.*, 2011). Por otra parte, otros estudios han evidenciado que la Cx43 de los hemicanales en cultivos primarios de astrocitos, puede ser S-nitrosilada en condiciones de estrés oxidativo (Retamal *et al.*, 2006), indicando que puede constituir un blanco para modificaciones de su actividad por S-nitrosilación, lo cual provee un mecanismo de regulación de la permeabilidad de canales formados por Cx43

(Billaud *et al.*, 2013). Esto indicaría que fuentes endógenas de NO como las enzimas óxido nítrico sintasa podrían participar en la activación de los hemicanales formados por Cx43.

4.- Panexina-1

Las panexinas son una familia de glicoproteínas integrales de membrana, que poseen homología con las proteínas formadoras de uniones en hendidura de los invertebrados (inexinas) y una similitud topológica con las conexinas (Panchin *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2007; Orellana *et al.*, 2013). Hasta el momento no se ha mostrado que las panexinas puedan formar uniones intercelulares del tipo uniones en hendidura en condiciones fisiológicas; aunque se ha descrito que panexina-1 (Pax-1) podría formar canales intercelulares bajo condiciones de sobreexpresión, como en ovocitos de rana (Bruzzone *et al.*, 2003).

Se han descrito tres miembros pertenecientes a esta familia de proteínas: panexina-1 (Pax-1), panexina-2 (Pax-2) y panexina-3 (Pax-3), las cuales pueden formar en la membrana plasmática canales similares a los hemicanales formados por las Cxs. Si bien, no existe homología entre las conexinas y las panexinas, estas proteínas presentan una topología similar; es decir, cuatro dominios transmembrana α -hélice, dos loops extracelulares, y un loop intracelular, con N y C-terminales dispuestos hacia el citoplasma (Baranova *et al.*, 2004; Barbe *et al.*, 2006). La región N-terminal es altamente conservada mientras que la mayor variabilidad en la secuencia se encuentra en el dominio C-terminal (Yen *et al.*, 2007).

De los tres miembros de la familia de las panexinas, la Pax-1 es la más expresada en tejidos de mamíferos, mientras que la expresión de Pax-2 y Pax-3 parece estar más restringida (Penuela *et al.*, 2013). La Pax-1 se expresa en numerosos órganos en ratón, rata y humanos, incluyendo el sistema nervioso en desarrollo y maduro. A nivel del sistema nervioso central,

Panx-1 se expresa abundantemente en regiones como hipocampo, bulbo olfatorio, corteza y cerebelo (Bruzzone *et al.*, 2003) y se piensa que sus roles estarían relacionados con el procesamiento sensorial, plasticidad hipocampal, sincronización entre el hipocampo y la corteza y propagación de ondas de Ca^{2+} (Litvin *et al.*, 2006), en concordancia con estas posibles funciones de Panx-1, se ha documentado su expresión en oligodendrocitos, astrocitos y neuronas hipocampales (Huang *et al.*, 2007).

Estudios en astrocitos en cultivo han confirmado la expresión de Panx-1 y se ha propuesto que canales formados por Panx-1 deberían ser considerados como un candidato para la liberación de ATP, de modo que podría estar involucrado en la propagación de las ondas de Ca^{2+} en astrocitos (Locovei *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Thompson y MacVicar, 2008; Iglesias *et al.*, 2009; Iwabuchi y Kawahara, 2011; Suadicaní *et al.*, 2012; Penuela *et al.*, 2013). En estudios realizados en cultivos primarios de astrocitos de ratones nulos para Panx-1, se encontró una menor liberación de ATP y una disminución en la propagación de ondas de Ca^{2+} en respuesta a la estimulación de receptores purinérgicos del tipo P2X7 (Iglesias *et al.*, 2009; Suadicaní *et al.*, 2012). En este contexto, se ha descrito que Panx-1 participaría en la señalización purinérgica en el sistema nervioso, cardiovascular y sistema inmune, donde canales formados por Panx-1 pueden ser activados por estrés mecánico (Bao *et al.*, 2004), señalización de receptores ionotrópicos y metabotrópicos, y a través del procesamiento proteolítico de la región C-terminal (Chiu *et al.*, 2014).

Estudios en ovocitos de rana transfectados con Panx-1 y estimulados mecánicamente mostraron un incremento en la liberación de ATP, lo que apoyaría la observación de que los canales formados por esta proteína son permeables a ATP, pudiendo constituir una vía de

liberación de esta molécula de señalización, de manera que podría participar en la propagación de las ondas de Ca^{2+} (Bao *et al.*, 2004).

Se han descrito varios mecanismos de activación de los canales formados por Panx-1, como la estimulación mecánica, privación de glucosa-oxígeno, incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, clivaje por caspasas y forforilación (Taylor *et al.*, 2015). Sin embargo, en lo que respecta a la modificación de Panx-1 por S-nitrosilación en residuos de cisteína, los resultados son contraversiales y se ha encontrado tanto la inhibición como la activación de los canales formados por Panx-1, expresados en distintos tipos celulares (Penuela *et al.*, 2014). Se ha documentado, en cultivos primarios de neuronas hipocampales, que donadores de NO, así como también la activación de la producción de NO endógeno, activa los canales formados por Panx-1, probablemente a través de S-nitrosilación (Zhang *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios realizados en líneas celulares de riñón y tejido corneal humano han indicado que la S-nitrosilación de Panx-1 disminuye la apertura de los canales formados por esta proteína (Lohman *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2016).

En vista de los antecedentes descritos, se puede proponer que la actividad de los hemicanales formados por Cx43 y los canales formados por Panx-1 podría estar influenciada por la producción de NO. Sin embargo, no se ha estudiado la relación de la actividad de estos canales con la producción de NO en los astrocitos, durante el acoplamiento neurovascular. Dado que eNOS y nNOS son enzimas dependientes de Ca^{2+} y la señalización de Ca^{2+} es crítica en el control mediado por los astrocitos de las respuestas vasodilatadoras a nivel cerebral, estas enzimas podrían activarse durante el acoplamiento neurovascular, lo cual podría modular la actividad de los hemicanales formados por Cx43 y los canales formados por Panx-1 a través de S-nitrosilación

(Retamal *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). La activación de estos canales podría permitir la entrada de Ca^{2+} y/o la liberación de ATP, participando así en la propagación y coordinación de las ondas de Ca^{2+} asociadas al aumento de la actividad neuronal durante el acoplamiento neurovascular, lo cual es consistente con el rol modulador del NO descrito por Lindauer *et al.* (Lindauer *et al.*, 1999). De esta manera, considerando que no existen reportes que asocien directamente al NO producido por los astrocitos en los mecanismos de liberación de ATP y el acoplamiento neurovascular, esta tesis plantea la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

La apertura de los hemicanales de Cx43 y/o Panx-1 a través del NO producido por los astrocitos contribuye al acoplamiento neurovascular por medio de la liberación de ATP.

OBJETIVOS

1.- Determinar si el NO producido por los astrocitos participa en el acoplamiento neurovascular.

1.1.- Determinar que isoformas de NOS se expresan en los astrocitos de la corteza de cerebro de rata.

1.2.- Evaluar si la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato activa la producción de NO en astrocitos de la corteza de cerebro de rata.

1.3.- Determinar la participación de NO en la actividad vasomotora de arteriolas corticales de cerebro de rata.

2.- Evaluar si la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato induce la apertura de hemicanales formados por Cx43 y/o canales formados por Panx-1 a través de la producción de NO en los astrocitos.

2.1.- Determinar si un aumento en la producción de NO por los astrocitos media la apertura de los hemicanales formados por Cx43 y/o canales formados por Panx-1.

2.2.- Determinar la expresión y distribución de Cx43 y Panx-1 en astrocitos de la corteza de cerebro de rata.

2.3.- Determinar si existe una asociación espacial de la eNOS con la Cx43 y con la Panx-1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.

3.- Determinar si la liberación de ATP a través de hemicanales formados por Cx43 y/o canales formados por Panx-1 participa en el acoplamiento neurovascular.

3.1.- Evaluar si la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato se asocia a la liberación de ATP a través de hemicanales formados por Cx43 y/o canales formados por Panx-1 en astrocitos de la corteza de cerebro de rata.

3.2.- Determinar si la apertura de hemicanales formados por Cx43 y/o canales formados por Panx-1 en los astrocitos participa en la vasodilatación de arteriolas de la corteza de cerebro de rata observada durante el acoplamiento neurovascular.

3.3.- Evaluar si el ATP liberado a través de hemicanales formados por Cx43 y/o canales formados por Panx-1 de los astrocitos participa directamente en la actividad vasomotora de arteriolas corticales de cerebro de rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Animales

Se utilizaron ratas machos *Sprague Dawley* neonatos (1-4 días) y adultos (230-250 gramos). Los neonatos fueron utilizados para preparación de cultivos primarios de astrocitos, mientras que las ratas adultas se usaron para la obtención de rebanadas intactas, cortes para inmunofluorescencia y extractos para western blot.

Todos los animales fueron obtenidos en el vivero central de la Pontificia Universidad Católica de Chile, que cuenta con facilidades para la mantención y supervisión veterinaria constante. Todos los protocolos experimentales se diseñaron de acuerdo a las normas establecidas por la Comisión de Bioética y Bioseguridad de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

2.- Cultivos primarios de astrocitos

Ratas macho *Sprague Dawley* neonatos fueron decapitadas, para la obtención de los cerebros, a los cuales se les eliminó la piel, el cráneo y las meninges, de manera de obtener cortezas cerebrales limpias, las que fueron disgregadas mecánicamente en frío en tampón fosfato salino (PBS) 1X pH= 7,4 estéril (composición mM: NaCl 136,9; KCl 2,68; NaH₂PO₄ 10,44 y KH₂PO₄ 1,76) e incubadas en un tubo Falcon de 50 mL en un baño termoregulado a 37°C por 30 minutos en solución con Tripsina-EDTA 10X (Biological Industries, código 03-051-5B). Luego, las muestras fueron centrifugadas a 84 g por 5 minutos y el precipitado resuspendido en medio DMEM completo pH= 7,2 (Gibco código 31600-034, suplementado con 3,7 g/L bicarbonato de sodio (Merck, código 1.063.29.1000), 10% suero fetal de bovino

(Gibco, código 16000-044) y 1X Penicilina/Estreptomicina/Fungizona (Gibco, código 15240) y cultivadas en frascos T75 NUNC (Thermo Fisher, código 156499) en incubador con 5% CO₂ y 95% aire atmosférico a 37°C. Al alcanzar una confluencia aproximada del 80%, los astrocitos fueron purificados de otros tipos celulares, a través de una selección mecánica por agitación en un baño termoregulado por 20 horas a 37°C a 200 rpm, con este protocolo las células como microglía, oligodendrocitos y neuronas se desprenden del frasco de cultivo, mientras los astrocitos permanecen adheridos. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se tripsinizaron para cultivo en placas Falcon (Corning, códigos 353001, 351007, 353003).

3.- Rebanadas intactas

Ratas macho *Sprague Dawley* 230-250 g de peso, fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina y xilacina (i.p. 90 y 10 mg/kg, respectivamente) y posteriormente decapitadas para la obtención de los cerebros, a los cuales se les eliminó la piel, el cráneo y las meninges, de manera de obtener cerebros limpios, los que se mantuvieron en el líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) pH= 7,4 fresco y frío (composición en mM: NaCl 125; KCl 3; NaHCO₃ 26; NaH₂PO₄ 1,25; CaCl₂ 2; MgCl₂ 1; Glucosa 4), burbujeado constantemente con una mezcla de 5% CO₂ y 95% O₂. Los cerebros fueron dispuestos en un vibrátomo (Leica VT1200) y se cortaron rebanadas de 200-300 µm, las cuales se dispusieron en una cámara de superfusión, bañadas con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) en condiciones fisiológicas (37°C, pH 7.4 y burbujeo con 5% CO₂ y 95% O₂), para medir la actividad vasomotora de las arteriolas parenquimales en distintas condiciones.

4.- Inmunofluorescencia

Para la inmunofluorescencia en tejido, ratas machos *Sprague Dawley* 230-250 g de peso, fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina y xilacina (i.p. 90 y 10 mg/kg, respectivamente) y posteriormente perfundidas por el ventrículo izquierdo, haciendo una incisión en la aurícula derecha, con 200 mL de PBS 1X a 37°C, para luego continuar la perfusión por 200 mL de solución Bouin (composición: ácido pícrico saturado, formaldehído al 37% y ácido acético glacial 100%, en relación 15:5:1). A continuación, las ratas fueron decapitadas, para la obtención de los cerebros, a los cuales se les eliminó la piel, el cráneo y las meninges, de manera de obtener cerebros limpios, los que se dejaron por 24 horas en solución de fijación Bouin a temperatura ambiente. Posteriormente, se inició un protocolo de inclusión, poniendo el tejido en una solución de Alcohol 60%, Alcohol 80%, Alcohol I 95% y Alcohol II 95% por 30 minutos cada vez a temperatura ambiente; Alcohol I 100%, Alcohol II 100%, Xilol I, Xilol II por 1 hora cada vez a temperatura ambiente. Continuando con un protocolo de inclusión, poniendo el tejido en Xilol II por 15 minutos en estufa a 60°C, luego el tejido se traspasó a un recipiente con Paraplast Plus® (Leica Microsystems, código 39602004) I por 1 hora a 60°C, Paraplast II a temperatura ambiente por 24 horas. Luego, el tejido se dejó a 60°C hasta disolución del Paraplast II, para posteriormente traspasarlo a Paraplast III por 3 horas a 60°C, y armar el taco con Paraplast fresco, el cual se dejó solidificar a temperatura ambiente por 24 horas. El taco con el tejido se dispuso en la prensa del micrótopo, y se obtuvieron cortes de 5 y 10µm, los cuales se dispusieron en un baño termoregulado a 45°C y recogidos en portaobjetos silanizados, y se dejaron secar por 24 horas a 37°C.

Los cortes obtenidos fueron sometidos a un protocolo de hidratación en una solución de Xilol I, Xilol II, Alcohol I 100%, y Alcohol II 100%, por 10 minutos cada vez en agitación suave dentro de cubeta Hellendhal, luego Alcohol 95%, Alcohol 80%, Alcohol 60% por 5 minutos cada vez. Posteriormente, los cortes fueron bloqueados con una solución de albúmina de suero de bovino (BSA) al 3% en PBS 1X por 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave, para luego incubar con los anticuerpos primarios anti-Cx43 (BD Transduction LaboratoriesTM, código 610062), anti-Panx-1 (Sigma-Aldrich, código AV42783-50UG), anti-CALHM1 (Alomone, código ACC-101), anti-eNOS (BD Transduction LaboratoriesTM, código 610298), anti-nNOS (Cell Signaling Technology, código 4231S), anti-GFAP (Sigma-Aldrich, código G9269 y G2893), anti-Tubulina β III (Millipore, código MAB5564), anti-AQP4 (Sigma-Aldrich, código SAB5200112), anti-CD11B (Millipore, código CBL1512), anti-CNPase (Millipore, código MAB326R), anti-S-Nitroso-Cystein (SON-Cys, Sigma-Aldrich, código N5411) respectivamente, por 12 horas a 4°C en cámara húmeda. Luego, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con buffer inmunohistoquímica pH= 7,6 (IHQ, composición en mM: Na₂HPO₄ 11; KH₂PO₄ 3,5; NaCl 121; Tris base 41; NaN₃ 3,1), posteriormente se incubó con anticuerpos secundarios ALEXA Fluor® 568 (goat anti-rabbit, Invitrogen Molecular Probes, código A11011; goat anti-mouse Invitrogen Molecular Probes, código A11004) o ALEXA Fluor® 488 (goat anti-rabbit, Invitrogen Molecular Probes, código A11008; goat anti-mouse, Invitrogen Molecular Probes, código A10680), según correspondiera, por 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con buffer inmunohistoquímica y se agregaron 30µL de medio de montaje para fluorescencia Fluoromont-G (Electron Microscopy Sciences, código 17984-25). Las muestras fueron visualizadas en microscopio Olympus BX41, acoplado a una cámara

ProgRes C5 cool Jenoptik, y las imágenes fueron obtenidas con el programa ProgRes Capture Pro 2.7.7 Jenoptik.

Para la inmunofluorescencia de células, se utilizaron cultivos primarios de astrocitos obtenidos como se describió previamente, crecidos en cubreobjetos de 12 mm con una confluencia de aproximadamente 80%. Las células fueron lavadas con PBS 1X a 37°C, luego se fijaron con paraformaldehído 4% (PFA, preparado en PBS 1X) a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X y se permeabilizaron con una solución de PBS 1X/triton x-100 0,1% por 30 minutos a temperatura ambiente, siguiendo con un bloqueo con BSA 3% (en PBS 1X) por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células se incubaron con el anticuerpo correspondiente por 12 horas a 4°C en cámara húmeda, a continuación, se realizaron y se incubó con el anticuerpo secundario adecuado por 1 hora a temperatura ambiente en cámara oscura. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X 5 minutos cada vez, y las células se incubaron con 50 µL de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI Sigma Aldrich, código D9542-1MG) por 10 minutos a temperatura ambiente, continuando con dos series de lavados con PBS 1X, luego se agregaron 10 µL de medio de montaje Dako® (Dako Fluorescent Mounting Medium, código S3023) sobre portaobjetos y se dejaron en oscuridad por 1 hora, para posteriormente visualizarlas en microscopio Olympus BX41, acoplado a una cámara ProgRes C5 cool Jenoptik, y las imágenes fueron obtenidas con el programa ProgRes Capture Pro 2.7.7 Jenoptik.

Todas las imágenes fueron analizadas y editadas con ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

5.- Proximity Ligation Assay (PLA)

Los ensayos de ligación por proximidad, se realizaron en cortes de cerebro de rata y en cultivos primarios de astrocitos de cerebro de rata, los cuales se trataron como se describió previamente hasta la incubación de los anticuerpos primarios de las proteínas de interés. A partir de la incubación de los anticuerpos secundarios, se siguió el protocolo sugerido por el fabricante con los reactivos provistos en el kit de reacción Duolink® In Situ (Olink Bioscience, PLA probe anti-mouse PLUS, código 92001-0100; PLA probe anti-rabbit PLUS, código). Las muestras fueron visualizadas en microscopio confocal Nikon eclipse Ti, las imágenes fueron obtenidas con el programa NIS Elements nd2 (Nikon).

6.- Western blot

Para la determinación de los niveles de proteínas, se prepararon extractos crudos de cerebro de rata y cultivos primarios de astrocitos de cerebro de rata, en buffer de lisis (composición PBS 1X/triton X-100/cocktail inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich, P8340-1ML)), homogenizando mecánicamente en frío. Posteriormente, los homogenizados fueron centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Se rescataron los sobrenadantes, a los cuales se les cuantificó proteínas totales a través del método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, código 500-0006), se mezclaron con buffer Laemmli 4X (composición en mM: Tris base 10; EDTA 1; y dodecil sulfato de sodio (SDS) 2,5%; β -mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol una punta de espátula, glicerol 40%) y se denaturaron por 5 minutos en un baño de agua hirviendo. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización para western blot. 60 μ g de proteínas se cargaron y separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-

PAGE entre 10 y 12%), utilizando el marcador estándar Dual color (Bio-Rad, código 1610374), luego se transfirieron a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF, Thermo Scientific, código 88518), las cuales se bloquearon con leche descremada 5% (en PBS 1X) por 12 horas a 4°C, para posteriormente incubar con el anticuerpo primario por 1 hora a temperatura ambiente, diluido en el potenciador de señal HIKARI solución A (Nacalai Tesque, código 02270-81), posteriormente se realizaron 6 lavados de 10 minutos cada uno con buffer Tris-Tween salino 1X pH= 7,5 (TTBS, composición: Tris base 20 mM; Tween-20 0,3%; NaCl 138 mM), y luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (Thermo Scientific, Stabilized Goat Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugated, código 32460; Thermo Scientific, Stabilized Goat Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugated, código 32430), diluido en el potenciador de señal HIKARI solución B (Nacalai Tesque, código 02270-81), se realizaron 6 lavados de 10 minutos cada uno con buffer Tris-Tween salino 1X pH= 7,5, para posteriormente detectar las proteínas con el kit de quimioluminiscencia SuperSignal® West Femto (Thermo Fisher, código 34095).

7.- Biotin switch

Para estos ensayos, se utilizaron cultivos primarios de astrocitos de rata, los cuales fueron estimulados con glutamato 10 μ M (Sigma-Aldrich, código G1126-10G) o vehículo por 1 minuto a 37°C, luego de lo cual se prepararon extractos crudos en tampón HEN pH= 7,7 (composición en mM: HEPES 250, EDTA 0,1 y neucoprina 0,1, más cocktail de inhibidores de proteasas 1X), los cuales se centrifugaron a 1400 g por 10 minutos a 4°C. Se guardaron los sobrenadantes, a los que les cuantificó proteínas totales mediante el método de Bradford. Posteriormente, se tomaron volúmenes de cada muestra que contuviera 200 μ g de proteínas y se mezclaron con el triple de volumen del buffer de bloqueo pH= 7,7 (composición en mM:

Tris base 20, EDTA 1; Neocuproina 0,1, S-methyl methanethiosulfonate (MMTS) 42 y SDS al 5%), incubando en oscuridad por 1 hora a 50°C con agitación moderada, para bloquear los residuos no nitrosilados con los estímulos. A continuación, se agregaron 1,2 mL de Acetona fría grado p.a. (Merck, código 1.00014.2500) y las muestras se dejaron por 24 horas a -20°C para la precipitación de proteínas. Una vez transcurrido éste tiempo, las muestras se centrifugaron a 14.000 g por 20 minutos a 4°C, se eliminaron los sobrenadantes y los precipitados se resuspendieron en 100 µL de buffer de solubilización pH= 7,7 (composición en mM: HEPES 250; EDTA 1; Neucoporina 0,1 y SDS 1%), se agregaron 20 uL de ácido ascórbico 2,5 mM y se agitaron las muestras por 1 minuto usando vortex moderado, para la reducción de los residuos nitrosilados. Luego, se agregaron 20 uL de HPDP-Biotina 4 mM (Thermo Scientific, código 21341) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación intensa protegiendo las muestras de la luz directa, para su unión con los residuos reducidos por la acción del ácido ascórbico. Se agregaron 1,2 mL de acetona fría y se incubó por 1 hora a -20°C, para luego centrifugar a 14.000 g por 20 minutos a 4°C. Se eliminaron los sobrenadantes y los precipitados se resuspendieron con 100 µL de tampón de solubilización, a los cuales se les agregó 100 µL de cuentas Agarosa-Streptavidina (Thermo Scientific, código 20353) previamente lavadas con PBS 1X, para agitar intensamente por 1 hora a temperatura ambiente, para su unión con los residuos asociados a Biotina en la etapa anterior. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 5.300 g, se eliminaron los sobrenadantes y los precipitados se lavaron tres veces con buffer de lavado pH= 7,7 (composición en mM: HEPES 20, NaCl 600, EDTA 1), centrifugando a 14.000 g por 1 minuto a 4°C cada vez. Finalmente se eliminaron los sobrenadantes y los precipitados se resuspendieron con 30 µL de buffer Laemmli 4X y las muestras se pusieron en un baño con

agua hirviendo por 5 minutos. Las muestras se guardaron a -20°C hasta ser utilizadas para SDS-PAGE convencional.

8.- Inmunoprecipitación

Los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron en cultivos primarios de astrocitos de rata, los cuales fueron estimulados con glutamato $10\text{ }\mu\text{M}$ o vehículo por 1 minuto a temperatura ambiente. Se prepararon extractos crudos con buffer de lisis homogenizando mecánicamente en frío. Posteriormente, los homogenizados fueron centrifugados a 5.300 g por 5 minutos a 4°C . Se rescataron los sobrenadantes, a los cuales se les cuantificó proteínas totales a través del método de Bradford. Luego, se realizó una etapa de pre-aclaramiento para eliminar las uniones inespecíficas, incubando con Parsobin® (Calbiochem, código 507861) previamente lavadas con PBS 1X, en una relación de $30\text{ }\mu\text{L}$ por cada $100\text{ }\mu\text{g}$ de proteína, las muestras se incubaron por 1 hora a 4°C con agitación ocasional. A continuación, las muestras se centrifugaron a 5.300 g por 5 minutos a 4°C y se rescataron los sobrenadantes, los cuales se incubaron con $1\text{ }\mu\text{g}$ de anticuerpo primario por cada $100\text{ }\mu\text{g}$ de proteínas de la muestra, y se incubó por 2 horas a 4°C , se agregaron $30\text{ }\mu\text{L}$ de Parsobin y se incubó por 1 hora adicional. Se centrifugó a 5.300 g y se eliminó el sobrenadante, el precipitado se lavó en tres series con buffer de lisis y se centrifugó a 2.800 g por 5 minutos a 4°C . Finalmente, se resuspendió el sobrenadante en $35\text{ }\mu\text{L}$ de buffer Laemmli 4X, se hirvieron las muestras por 10 minutos y se centrifugaron 2.800 g por 10 minutos a 4°C . Las muestras se utilizaron para realizar western blot convencional.

9.- Captación de colorante

Los ensayos de captación de bromuro de etidio, se realizaron en cultivos primarios de astrocitos de rata a una confluencia aproximada del 80%, crecidos en cubreobjetos de 12 mm, en distintas condiciones experimentales, dentro de las células, el etidio se intercala con los ácidos nucleicos y la intensidad de la fluorescencia (longitud de onda de excitación: 530-550 nm; longitud de onda emisión: 590 nm) es utilizada para evaluar la actividad de los hemicanales de conexinas y canales de panexinas.

Las células se lavaron con buffer Tyrode 1X/MOPS (4-Morpholinepropanesulfonic acid) /glucosa (composición en mM: NaCl 118; KCl 5,4; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; MOPS 10; glucosa 11) pH= 7,4, se incubaron con bromuro de etidio a una concentración final de 5µM y se dejaron estabilizar por 10 minutos a 37°C. Los estímulos se hicieron con glutamato (10 µM), en condiciones control, o bloqueando los canales formados por Panx-1, calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1), hemicanales formados por Cx43 o receptores purinérgicos con ¹⁰Panx, ruthenium red (Rut Red), ^{37,43}Gap27 o “Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid tetrasodium salt” (PPADS), respectivamente. Luego, las células se visualizaron en un microscopio Olympus BX50W con filtro UND-25-2, acoplado a una cámara Retiga 1394 Q Imaging. Las imágenes fueron obtenidas con el programa IPLab 3.65 (Scanalytic, Inc) y analizadas con ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

10.- Detección de la señal de Ca²⁺ con Fluo-4

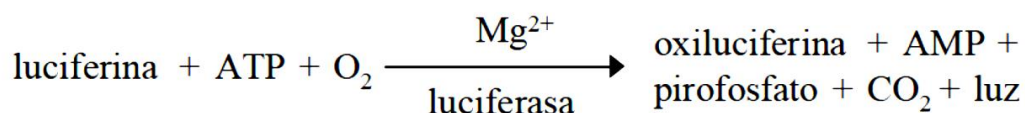
Los cambios en los niveles de calcio intracelular, fueron analizados en cultivos primarios de astrocitos de cerebro de rata a una confluencia aproximada del 80%, crecidos en cubreobjetos

de 12 mm, en distintas condiciones experimentales, utilizando el indicador de Ca^{2+} libre Fluo-4-AM (Life Technologies, código F23917). Dentro de las células, la unión de Ca^{2+} con el Fluo-4 incrementa la fluorescencia del indicador (longitud de onda de excitación: 470-490 nm; longitud de onda de emisión; 515 nm).

Las células se lavaron con tampón Tyrode 1X/MOPS/glucosa (composición en mM: composición en mM: NaCl 118; KCl 5,4; CaCl_2 2,5; KH_2PO_4 1,2; MgSO_4 1,2; MOPS 10; glucosa 11) pH= 7,4, se incubaron con Fluo-4-AM a una concentración final de 10 μM , por 1 hora a temperatura ambiente protegidas de la luz. Las células se lavaron tres veces con buffer Tyrode 1X/MOPS /Glucosa y se dejaron estabilizar a lo menos por 15 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se visualizaron en un microscopio Olympus BX50W con filtro UND-25-2 acoplado a una cámara Retiga 1394 Q Imaging. Las imágenes fueron obtenidas con el programa IPLab 3.65 (Scanalytic, Inc) y analizadas con ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

11.- Detección de ATP

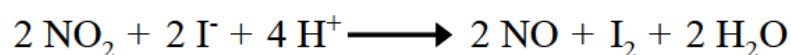
La liberación de ATP se evaluó en el superfusado de rebanadas de cerebro de rata y en el medio de cultivos primarios de cerebro de rata, en distintas condiciones experimentales, a través de ensayos de bioluminiscencia luciferina-luciferasa de un kit de medición de ATP (Life Technologies, código A22066), que se basa en la siguiente reacción:



En donde la producción de luz es directamente proporcional al ATP disponible para la reacción. Se siguieron las instrucciones del fabricante y las mediciones se realizaron en un luminómetro Turner TD-20e, interpolando en una curva de calibrado con concentraciones entre 0,01 y 10 η M de ATP a temperatura ambiente.

12.- Detección de NO

El NO fue detectado utilizando el sistema de medición inNO-T-II (Innovative Instruments Inc., USA), que usa un electrodo selectivo a NO (AmiNO-700, Innovative Instruments Inc., USA), el cual se sumerge en una solución de reacción (composición: H_2SO_4 0,1 M; KI 2 mg/mL), en la cual los nitritos de la muestra se reducen a NO según la siguiente reacción:



La corriente detectada por el sensor, fue monitoreada y cuantificada, usando el software inNOII, en muestras derivadas de la superfusión de rebanadas de cerebro de rata a temperatura ambiente en distintas condiciones experimentales.

13.- Transfección de cultivos primarios

Cultivos primarios de astrocitos de cerebro de rata a una confluencia aproximada del 80%, fueron transfectados con siRNA contra CALHM1 (Qiagen, código 1027417), a una concentración 30 η M del interferente por 48 horas, utilizando el kit de transfección HiPerFect

(Qiagen, código 301704) en una relación de 3 μ L de HiPerFect por cada 37,5 η g de siRNA.

Como control de transfección, se utilizó el control negativo (Qiagen, código 1027280).

Las células transfectadas se utilizaron para mediciones de calcio, captaciones de colorante, mediciones de ATP y western blot.

14.- Expresión de canales de CALHM1 en ovocitos de *Xenopus Laevis*

Los cDNA para el CALMH1 fueron (Origene USA, # Q8IU99) fueron sub clonados en el vector de expresión pGEM-HA vector (Promega-USA) en *Escherichia Coli*. Posteriormente, se aisló el RNA de las bacterias y se inyectó en ovocitos de *Xenopus Leavis*, con el fin de expresaran el CALMH1 en la membrana de estas células.

15.- Electrofisiología, dos electrodos (dual voltage-clamp)

Los registros electrofisiológicos de ovocitos de *Xenopus Leavis* fueron obtenidos mediante la técnica de dos electrodos “voltage clamp”, como ha sido descrito previamente (Tong *et al.*, 2015), utilizando la siguiente solución (mM): 118 NaCl, 2 KCl, 1.8 Ca^{2+} , and 5 HEPES, pH 7.4. Las corrientes de los ovocitos de *Xenopus Leavis*, se registraron después de 3 días de inyección del cRNA de CALHM1. Todos los huevos fueron inyectados además con el antisen (siRNA) de la conexina 38 (1 mg/ml), ya que los ovocitos de *Xenopus Leavis* la expresan constitutivamente. Además, los ovocitos fueron inyectados con 0.25 η moles de BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) para bloquear las corrientes de cloruro activadas por calcio (López *et al.*, 2016). Los registros fueron obtenidos usando el equipo Oocyte Clamp (OC-725C; Warner Instruments) y fueron tomados cada 2 kHz, con

un filtro a 0.2 kHz. Los microelectrodos fueron llenados con 3M KCl y la resistencia de estos fue 0.1 y 2 M Ω .

16.- Análisis estadísticos

Los resultados son presentados como la media $\pm$ error estándar. Las comparaciones entre dos grupos experimentales se realizaron mediante el test de t-student (pareado o no pareado). Las comparaciones múltiples entre grupos se analizaron mediante ANOVA de una o dos vías y el test post hoc de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

1 Participación del NO en el acoplamiento neurovascular

Para evaluar la participación de NO producido por los astrocitos en el acoplamiento neurovascular, en primer lugar, se determinó la presencia de las isoformas endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS) de la enzima óxido nítrico sintasa, mediante western blot en extractos de cerebros de tres ratas y extractos de tres cultivos primarios independientes de astrocitos de corteza de cerebro de rata, lo cual se muestra en la Figura 5. Este análisis confirmó la presencia de las isoformas endotelial y neuronal en ambas muestras, pero, por otro lado, no se observó señal para iNOS.

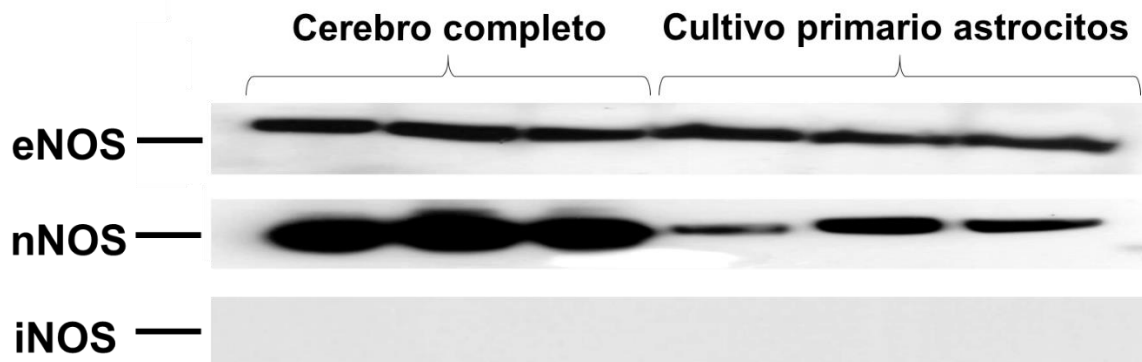


FIGURA 5: *Expresión de NOS en cerebro y astrocitos de corteza cerebral de rata.* La cantidad relativa de las enzimas óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS) fueron evaluados mediante western blot, en extractos crudos de cerebros completos y cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata. Se muestran tres extractos independientes de cada fuente.

Con la finalidad de definir la distribución en las isoformas de NOS en los astrocitos, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en cortes de cerebro de rata y en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata. La inmunodetección de la isoforma endotelial y neuronal no sólo se limitó a las células endoteliales de las arteriolas parenquimales, tal como se ha descrito previamente (Bachetti et al, 2004), sino también se encontró en los procesos astrocíticos que rodean dichas arteriolas (Figura 6). Consistente con estos resultados, la expresión de estas isoformas también se observó en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata. Tanto en los cortes de corteza de cerebro de rata como en los cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, no se detectó una clara señal de la iNOS.

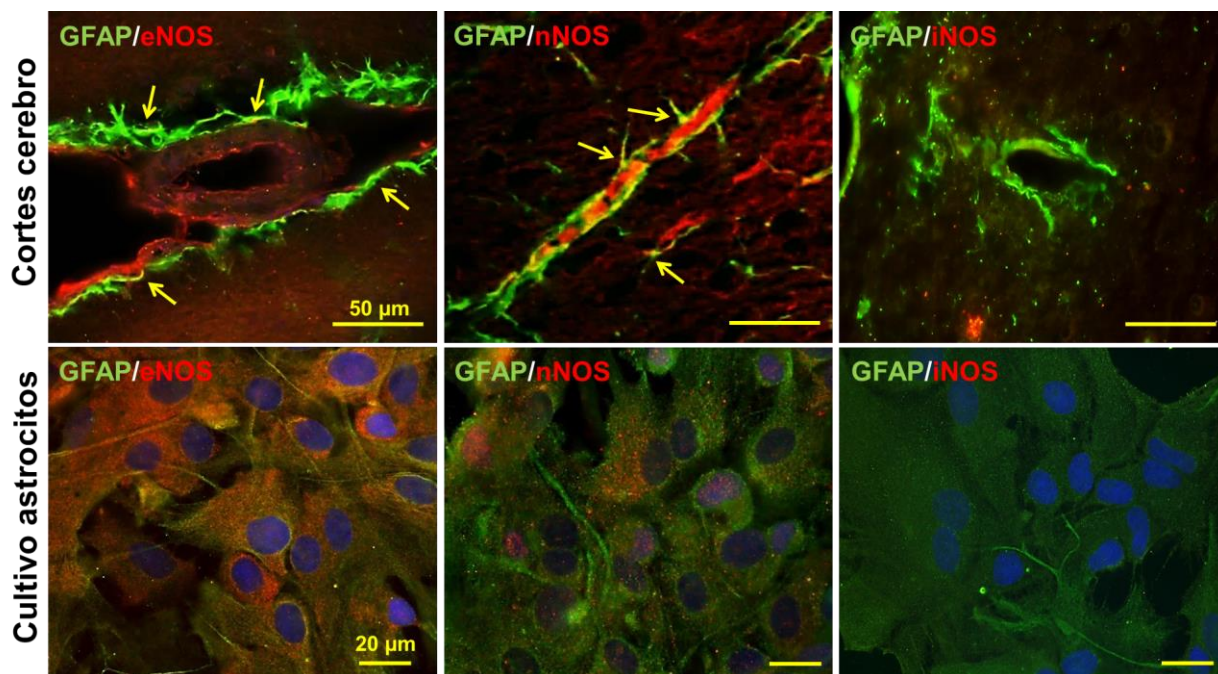


FIGURA 6: *Localización de NOS en astrocitos de cerebro de rata.* Inmunofluorescencia de la isoforma endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS) en la corteza de cerebro de rata (paneles superiores) y en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata (paneles inferiores). Las imágenes representativas fueron obtenidas por medio de microscopía de epifluorescencia en equipo Olympus BX51. Las flechas indican la colocalización más evidente.

Una vez corroborada la expresión y localización de las NOS en astrocitos se procedió a determinar si la estimulación con glutamato producía variaciones en la producción de NO. De esta manera, se midió la producción de NO en preparaciones intactas de rebanadas de corteza de cerebro de rata estimuladas con glutamato en condiciones control o en presencia de 100 μ M L-NA. Además, se trató la preparación con 1 μ M tetrodotoxina (TTX) para inhibir la actividad neuronal. En estas condiciones, se encontró que la estimulación con glutamato indujo un aumento de la producción de NO, el cual, como esperado, fue sensible al bloqueo con L-NA, confirmando el origen enzimático del NO detectado (Figura 7).

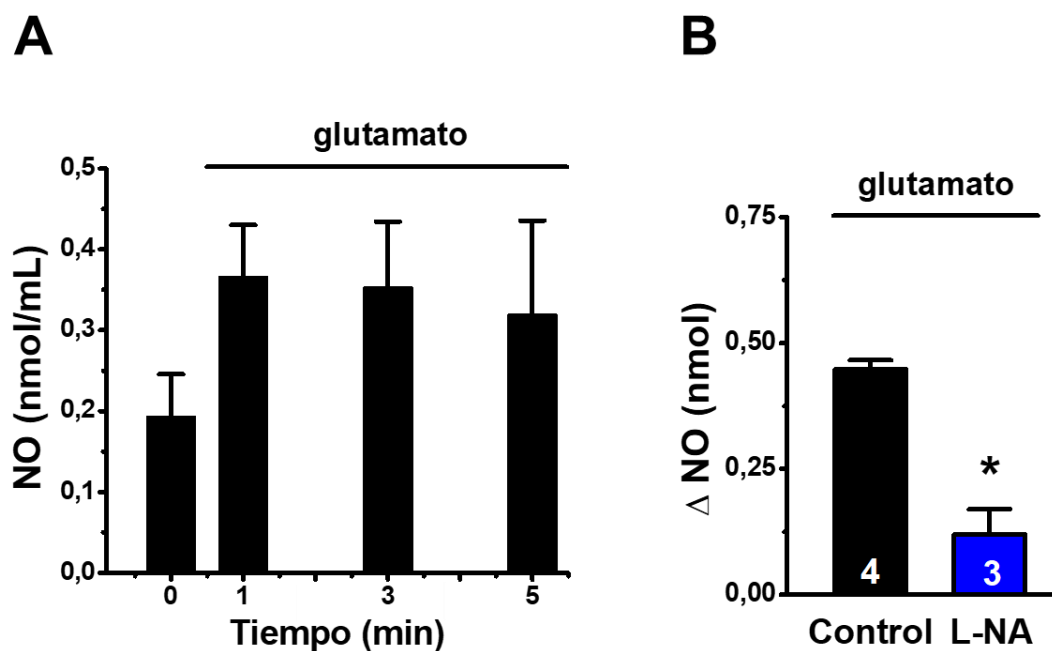


FIGURA 7: La estimulación con glutamato aumenta la producción de NO en rebanadas de cerebro de rata. (A) Curso temporal de la producción de NO en superfusado de rebanadas de cerebro de rata, estimuladas con glutamato (10 μ M) en condiciones control. (B) Análisis del cambio neto del NO producido en rebanadas de cerebro de rata estimuladas con glutamato en condiciones controles y en presencia de L-NA (100 μ M). Estadística: Test t no pareado, * = $p < 0,005$ L-NA vs Control.

Posteriormente, se quiso determinar si la producción de NO inducida por glutamato estaba asociada a cambios de diámetro de arteriolas parenquimales. De esta manera, se registró los cambios de diámetro de arteriolas intactas de cerebro de rata, lo cual se realizó usando rebanadas de 200-300 μm de grosor, mantenidas en condiciones fisiológicas de pH y temperatura. Bajo éstas condiciones, la estimulación con glutamato (10 μM) produjo un incremento en el diámetro de las arteriolas parenquimales, lo cual, notablemente, también fue inhibido por el bloqueo de la producción de NO con L-NA (Figura 8).

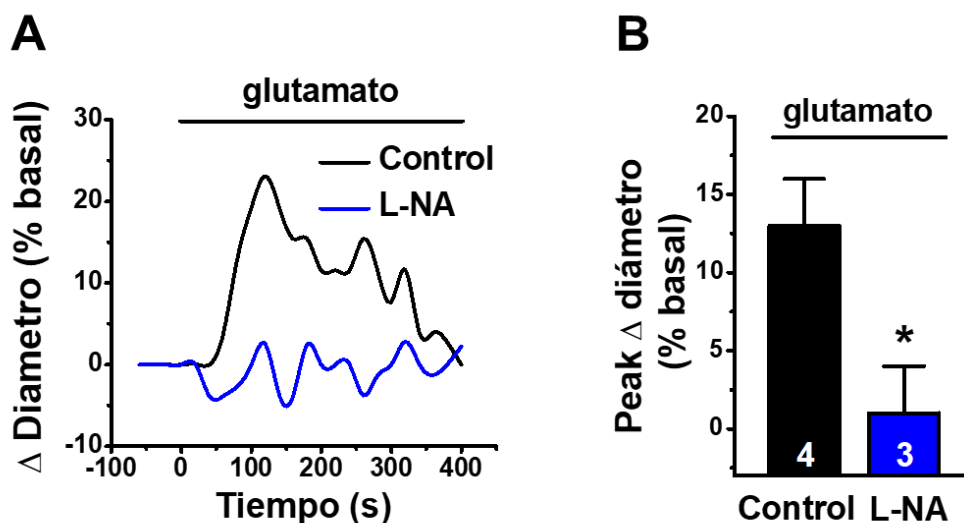


FIGURA 8: La actividad vasomotora de arteriolas parenquimales de corteza de cerebro de rata inducida por glutamato depende de la producción de NO. (A) Curso temporal representativo de la actividad vasomotora de arteriolas parenquimales de rebanadas de cerebro de rata de 200-300 μm , inducida por glutamato (10 μM) en condiciones control o en presencia de L-NA (100 μM). (B) Análisis del peak del cambio de diámetro de arteriolas parenquimales de cerebro de rata. Estadística: Test t no pareado, * = $p < 0,005$ L-NA vs Control.

Para determinar si el aumento en la producción de NO y en la actividad vasomotora estaba asociada a cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular de los astrocitos, se realizaron ensayos en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, en donde se evaluaron los niveles de Ca^{2+} utilizando el indicador de Ca^{2+} Fluo-4. La estimulación con glutamato (10 μM) y la directa activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) con el agonista trans-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic acid (t-ACPD, 150 μM) indujo un aumento del Ca^{2+} intracelular, como se aprecia en los cursos temporales (Figura 9 A y B). El análisis del aumento máximo de Ca^{2+} (peak de Ca^{2+}) muestra que el bloqueo de la producción de NO con L-NA inhibió completamente la respuesta activada tanto por glutamato como t-ACPD (Figura 9 C y D).

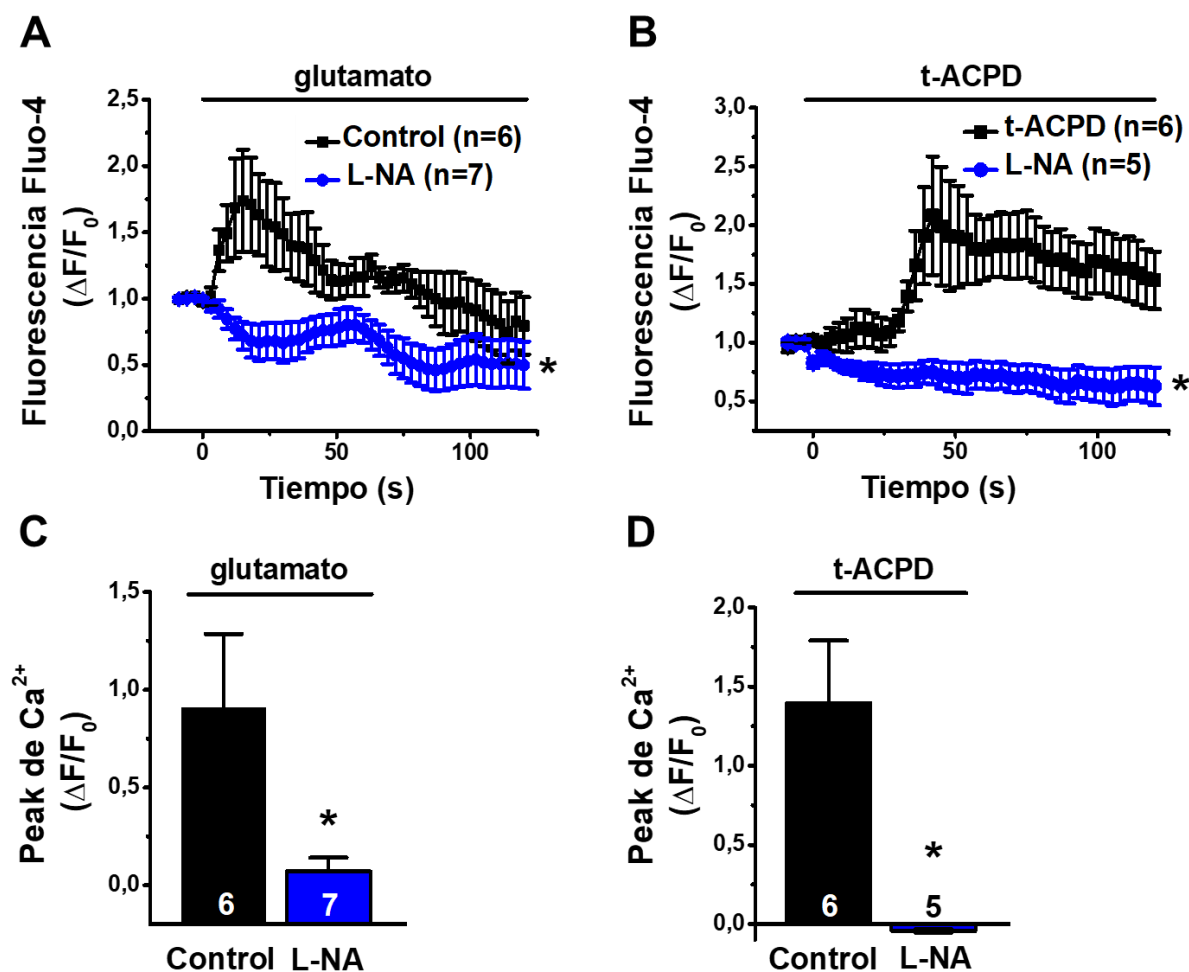


FIGURA 9: La activación de *mGluR* induce aumentos de Ca^{2+} libres dependientes de la producción de NO en astrocitos de corteza de cerebro de rata. Cursos temporales de los cambios en los niveles de calcio en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, estimulados con glutamato (10 μ M) (A) o un agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato: t-ACPD (150 μ M) (B) en condiciones control o en presencia de L-NA (100 μ M). Análisis de los peaks de calcio en cultivos estimulados con glutamato (C) o t-ACPD (D) en condiciones control o en presencia de L-NA. Los datos expresados como los cambios en la fluorescencia de Fluo-4, fueron normalizados por la señal de fluorescencia basal previo al estímulo correspondiente. Estadística: ANOVA dos vías, * = $p < 0,005$ L-NA vs Control (A y B); Test t no pareado, * = $p < 0,05$ (C); * = $p < 0,0005$ (D) L-NA vs Control.

2 Participación de los hemicanales formados por Cx43 y los canales formados por Panx-1 en la respuesta iniciada por los mGluR

La participación de canales formados por Cx43 o Panx-1 en el acoplamiento neurovascular se evaluó inicialmente en rebanadas de cerebro de rata utilizando la técnica de captación de etidio. Las rebanadas de cerebro fueron estimuladas con el agonista de los mGluR, t-ACPD (150 μ M), en condiciones control o en presencia de L-NA y posteriormente se realizaron cortes para analizar la fluorescencia de etidio. Como se puede apreciar en la Figura 10, la activación de mGluRs con t-ACPD indujo un aumento en la captación de etidio asociada a la marca de GFAP, sugiriendo que la captación de etidio se produjo principalmente en astrocitos. Al igual que lo observado en el análisis del acoplamiento neurovascular, la inhibición de la producción de NO con L-NA bloqueó completamente esta respuesta.

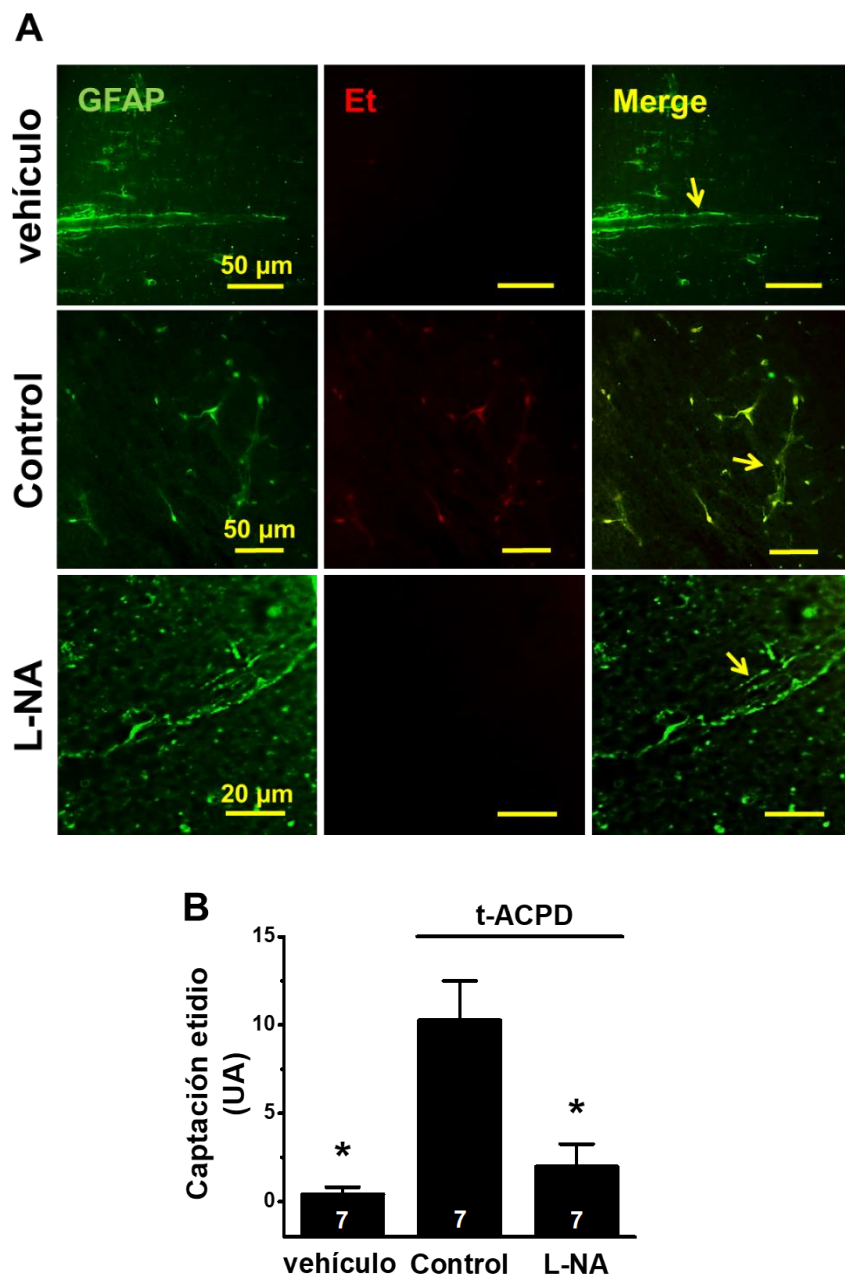


FIGURA 10: *La activación de mGluR induce la apertura de canales en astrocitos de corteza de cerebro de rata.* (A) Imágenes representativas de la captación de etidio (5 μ M) en rebanadas de cerebro de rata, estimuladas con vehículo, t-ACPD (150 μ M) (Control) o t-ACPD (150 μ M) en presencia de L-NA (100 μ M) (L-NA). Las rebanadas posteriormente fueron procesadas para obtener cortes de 5 μ m para inmunofluorescencia del marcador de astrocitos GFAP y etidio. (B) Cuantificación de la captación de etidio de las mismas rebanadas, las imágenes fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia Olympus BX51 y analizadas por ImageJ, correspondientes a 7 campos en cada condición de tres experimentos independientes. Estadística: ANOVA una vía *post hoc* Bonferroni, * = $p < 0,0005$, vehículo y L-NA vs Control.

Debido a que la Cx43 ha sido descrita como la conexina más abundantemente expresada en astrocitos y Panx-1 también es expresada en estas células, se propuso corroborar la expresión de éstas proteínas en los cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata mediante western blot. Tal como se observa en la Figura 11, se detectó la expresión de Cx43 y Panx-1 en extractos de cerebros completos y cultivos primarios.

Para determinar la localización de Cx43 y Panx-1 en astrocitos y su posible relación espacial con las arteriolas parenquimales de la corteza, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en cortes de cerebro de rata, enfatizando el análisis en la vecindad de las arteriolas parenquimales de la corteza, con lo cual se observó que tanto Cx43 como Panx-1 se localizan en astrocitos que proyectan procesos alrededor de las arteriolas parenquimales (Figura 12).

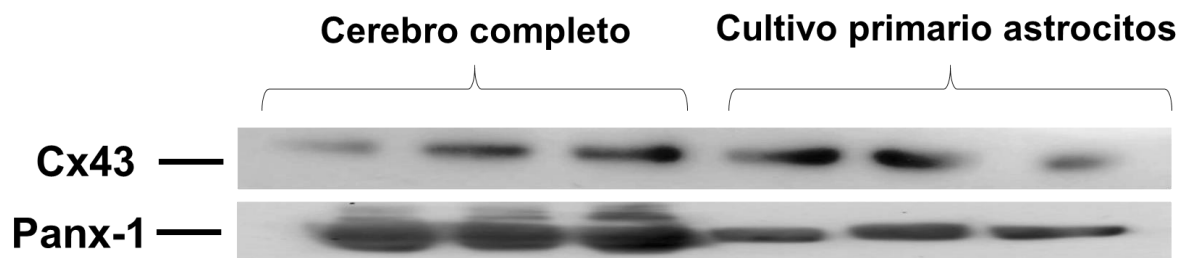


FIGURA 11: *Expresión de Cx43 y Panx-1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.* Western blot de extractos de cerebros completos de rata y cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, para determinación de la cantidad relativa de Cx43 y Panx-1. Se muestran tres extractos independientes de cada fuente.

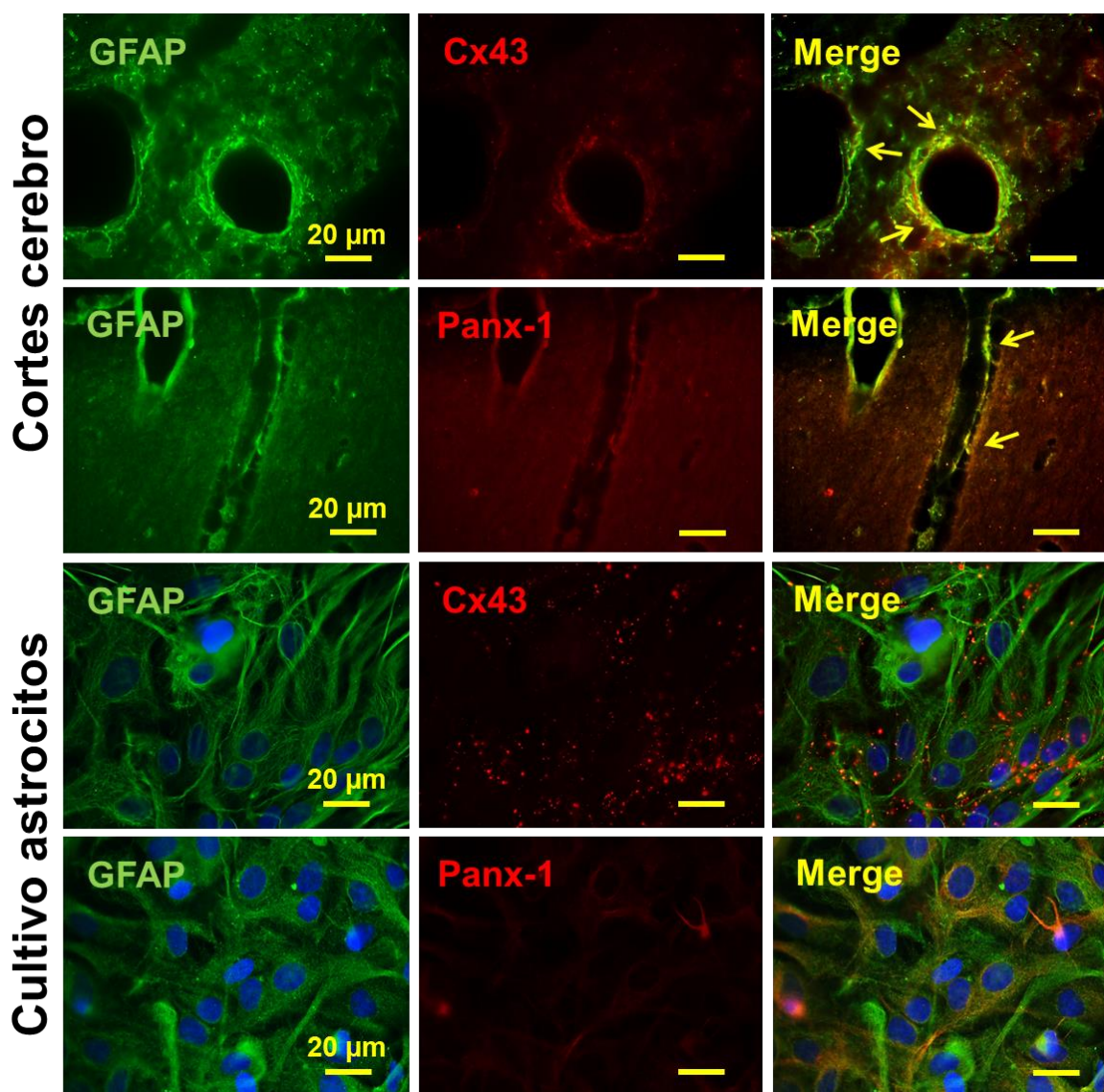


FIGURA 12: Localización de Cx43 y Panx-1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata. Imágenes representativas de inmunofluorescencias en cortes de cerebro de rata, para Cx43 y Panx-1, utilizando GFAP como marcador de astrocitos. Las imágenes representativas fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia Olympus BX51 y analizadas por ImageJ. Las flechas indican la colocalización más evidente.

Una vez comprobada la expresión y localización de Cx43 y Panx-1 en astrocitos de la corteza de cerero de rata, se procedió a determinar si la actividad de los hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 se incrementaba luego de la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato, lo cual se evaluó por medio del análisis de captación de etidio y se utilizaron los péptidos ^{37,43}Gap27 (100 uM) y ¹⁰Panx (100 uM) para bloquear hemicanales formados por Cx43 o canales formados por Panx-1, respectivamente. En la Figura 13 se aprecia que la estimulación con glutamato (10 µM) indujo un aumento de la captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos, el cual fue inhibido por el bloqueo de los hemicanales formados por Cx43 o canales formados por Panx-1.

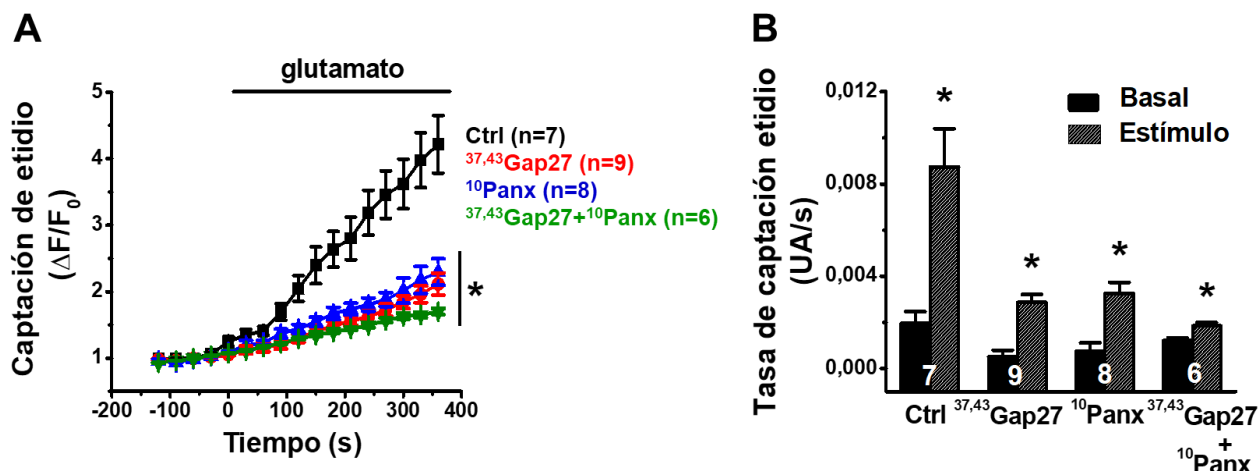


FIGURA 13: La actividad de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 es inducida por glutamato en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A) Cursos temporales de la captación de etidio (5 μ M) en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, estimulados con glutamato (10 μ M) en condiciones controles (Ctrl), o en presencia de ^{37,43}Gap27 (100 μ M), ¹⁰Panx (100 μ M) o una mezcla de ambos péptidos. (B) Análisis de los datos, expresados como las pendientes de las curvas de captación (Tasa de captación) en condiciones basales (previo al estímulo) y en el estímulo. Estadística: ANOVA dos vías, post hoc Bonferroni; * = $p < 0,0005$ ^{37,43}Gap27, ¹⁰Panx y ^{37,43}Gap27+¹⁰Panx vs Control (A); Test t pareado, * = $p < 0,05$ Estímulo vs Basal (B).

Con la finalidad de determinar si el NO modula la apertura de los hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1, se realizaron ensayos de captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos en presencia de L-NA (100 μ M), que bloquea todas las isoformas de NOS, y también de N ω -propil-arginina (N ω -propil-Arg), que bloquea específicamente la producción de NO vía nNOS. Notablemente, el tratamiento con L-NA abolió aumento en la captación de etidio inducido por glutamato o t-ACPD, pero, por otro lado, el bloqueo específico de la nNOS con N ω -propil-Arg, no tuvo efecto sobre la respuesta activada por glutamato (Figura 14).

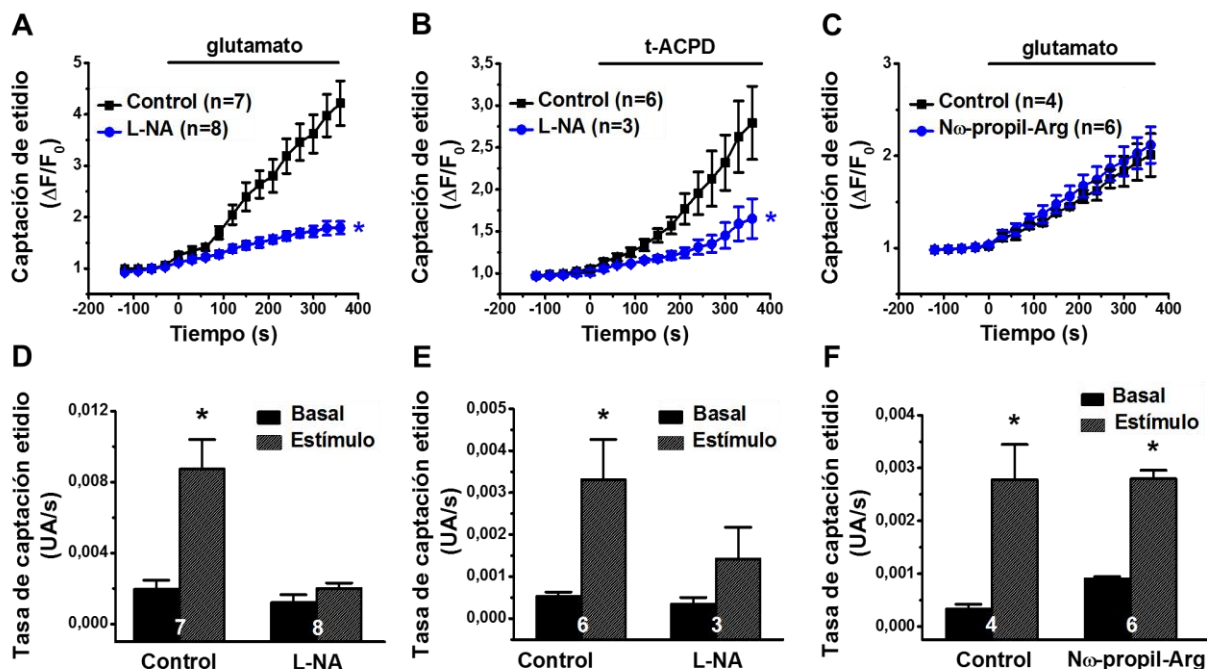


FIGURA 14: La actividad de canales inducida por la activación de mGluR depende de la producción de NO en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A, B, C) Cursos temporales de la captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, estimulados con glutamato o t-ACPD en condiciones control, o en presencia de L-NA o N ω -propil-Arg. (D, E, F) Análisis de los datos, expresados como las pendientes de las curvas de captación (Tasa de captación) en condiciones basales (previo al estímulo) y durante el estímulo. Estadística: ANOVA dos vías, * = $p < 0,0001$ L-NA ó N ω -propil-Arg vs Control (A, B y C); Test t pareado, * = $p < 0,05$ Estímulo vs Basal.

Como los hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 podrían participar en la señalización de Ca^{2+} , se procedió a determinar si la apertura de estos canales estaba involucrada en el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular observado en respuesta a glutamato. Tal como se aprecia en la Figura 15, el bloqueo de los hemicanales formados por Cx43 con $^{37,43}\text{Gap27}$ y de los canales formados por Panx-1 con $^{10}\text{Panx}$ causó una drástica reducción en el aumento de Ca^{2+} inducido por $10\text{ }\mu\text{M}$ glutamato en los cultivos primarios de astrocitos.

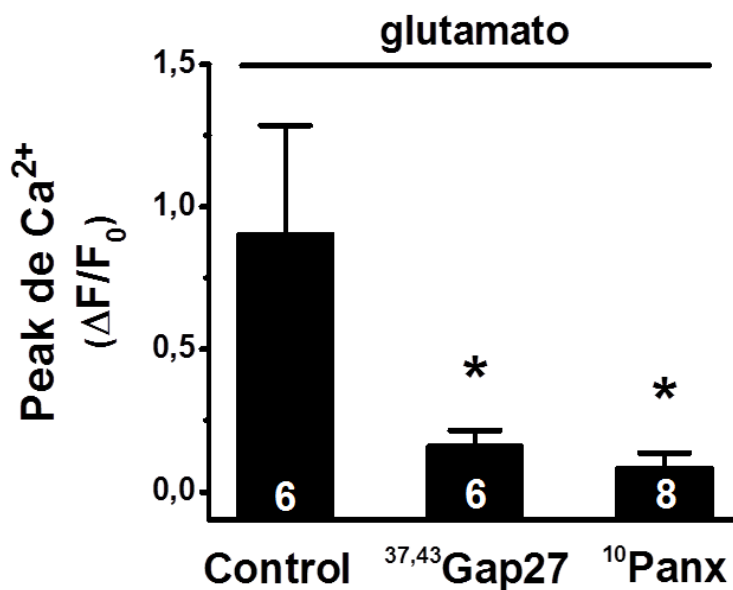


FIGURA 15: El aumento de Ca^{2+} inducido por glutamato depende de la actividad de hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1 en astrocito de corteza de cerebro de rata. Análisis de los peaks de Ca^{2+} en cultivos estimulados con glutamato en condiciones control o en presencia de $^{37,43}\text{Gap27}$ (100 μM) o $^{10}\text{Panx}$ (100 μM), para bloquear los hemicanales formados por Cx43 o canales formados por Panx-1, respectivamente. Los datos expresados como los cambios en la fluorescencia de Fluo-4, fueron normalizados por la señal de fluorescencia basal previo al estímulo correspondiente. Estadística: ANOVA una vía *post hoc* Bonferroni, * = $p < 0,0001$, $^{37,43}\text{Gap27}$ o $^{10}\text{Panx}$ vs Control.

Como la señalización de Ca^{2+} asociada a la apertura de los hemicanales formados por conexinas y los canales formados por Panx-1 depende de un aumento en la producción de NO, se realizaron “ensayos de ligación por proximidad (PLA)” para evaluar si existía una asociación espacial entre la eNOS con Cx43 o con Panx-1, tanto en cortes de cerebro de rata como en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata. En estos experimentos, aunque no se detectó una relación espacial consistente entre eNOS y Cx43, si se observó una clara señal positiva para la asociación de eNOS con Panx-1 (Figura 16).

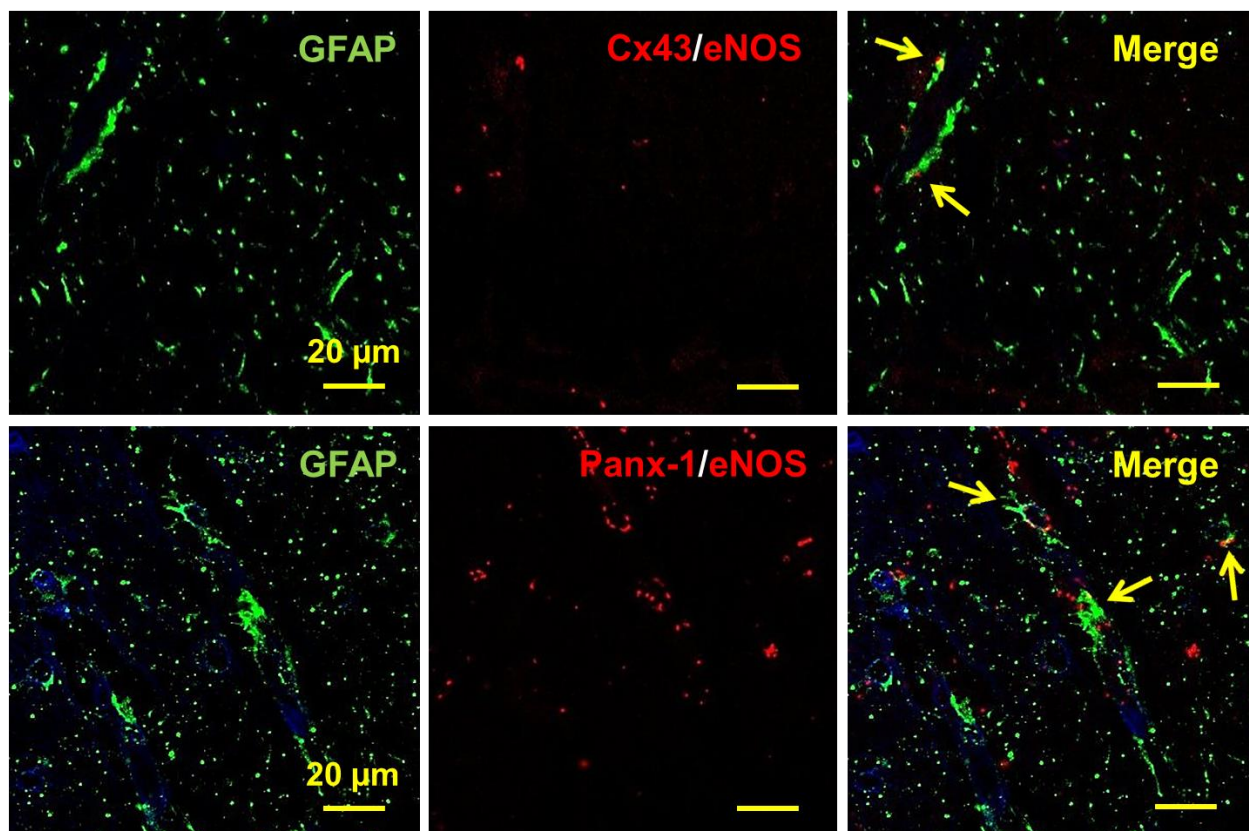
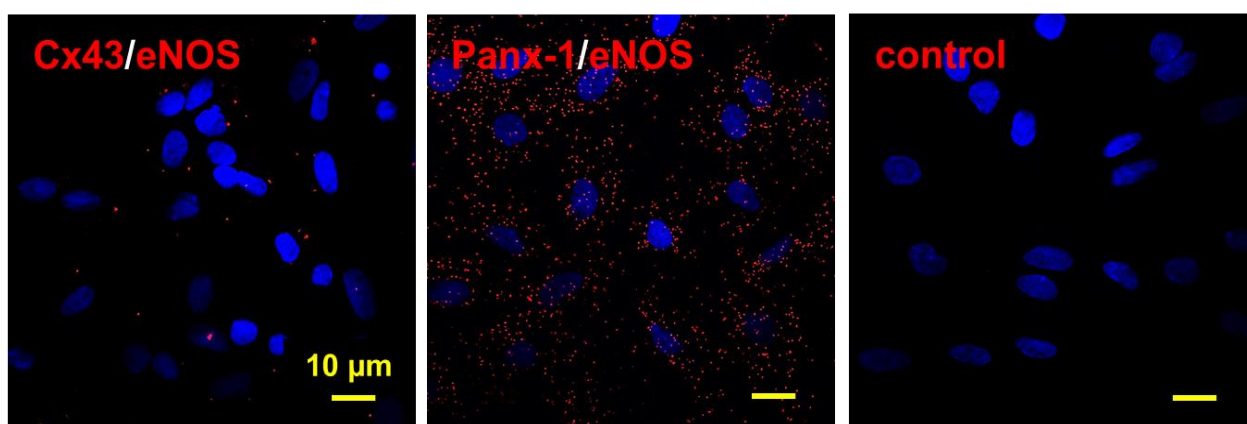
A**B**

FIGURA 16: Asociación espacial entre Cx43/eNOS y Panx-1/eNOS en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A) Asociación espacial entre Cx43/eNOS y Panx-1/eNOS en cortes de cerebro de rata, la señal de asociación entra ambas proteínas coincide con el marcador de astrocitos GFAP (flechas). (B) Asociación espacial entre Cx43/eNOS y Panx-1/eNOS en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata. La señal fluorescente en rojo indica proximidad menor a 20 ηm entre ambas proteínas.

3 Participación de la señalización purinérgica en la respuesta asociada al acoplamiento neurovascular

Los hemicanales formados por conexinas y los canales formados por Panx-1 pueden participar en la señalización de Ca^{2+} , en forma directa, permitiendo la entrada de Ca^{2+} a través de ellos, pero también, en forma indirecta, a través de la liberación de ATP. Sin embargo, la liberación de ATP también podría contribuir a la activación de estos canales. Por lo tanto, se propuso evaluar la participación de los receptores purinérgicos en la activación de los hemicanales y canales formados por Panx-1 en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata. Sorprendentemente, el aumento en la captación de etidio inducido por glutamato fue completamente inhibido por el bloqueo de los receptores purinérgicos con 100 μM de PPADS (Figura 17).

Consistente con el efecto inhibitorio del bloqueo de los receptores purinérgicos sobre la captación de etidio, este tratamiento también inhibió el aumento de Ca^{2+} generado por glutamato (Figura 18).

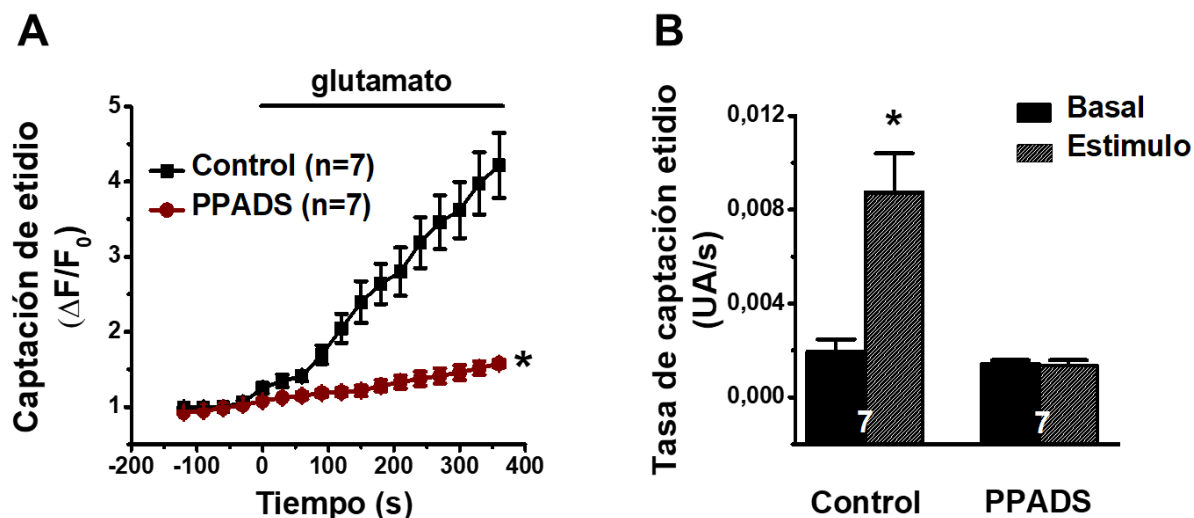


FIGURA 17: La activación de canales inducida por glutamato depende de la actividad de receptores purinérgicos en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A) Cursos temporales de la captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, estimulados con glutamato (10 μ M) en condiciones control, o en presencia de PPADS (100 μ M). (B) Tasa de captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata en condiciones basales (previo al estímulo) y durante el estímulo con glutamato en condiciones control o en presencia de PPADS. Estadística: ANOVA dos vías, * = $p < 0,0001$ PPADS vs Control (A); Test t pareado, * = $p < 0,005$ Estímulo vs Basal (B).

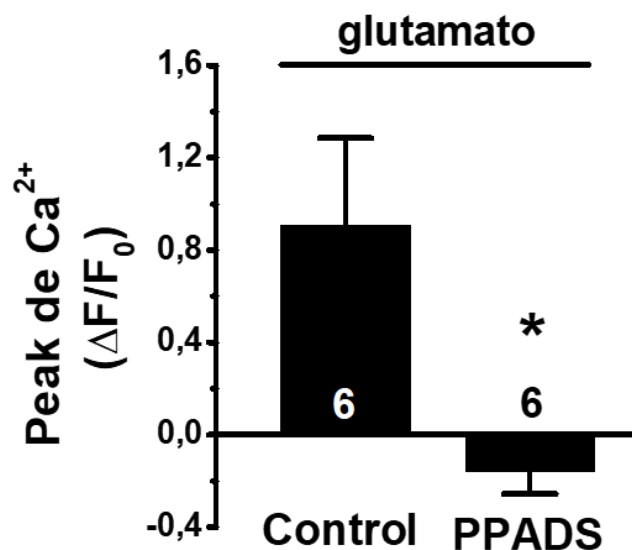


FIGURA 18: El aumento de Ca^{2+} inducido por glutamato depende de la actividad de receptores purinérgicos en astrocitos de corteza de cerebro de rata. Peaks de Ca^{2+} , expresados como el cambio en la fluorescencia del indicador de Ca^{2+} (Fluo-4), en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata estimulados con glutamato en condiciones control, o en presencia de PPADS. Estadística: Test t no pareado, * = $p < 0,05$ PPADS vs Control.

Dado que el bloqueo de los receptores purinérgicos en los astrocitos estimulados con glutamato inhibió tanto la captación de etidio como el aumento en la señal de Ca^{2+} intracelular, se postuló que la liberación de ATP debía ocurrir de manera previa a la activación de los hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1. Por lo tanto, se propuso cuantificar la liberación de ATP en cultivos primarios de astrocitos de corteza de rata.

Para determinar si la activación de mGluR inducía la liberación de ATP en cultivos primarios de astrocitos de corteza de rata, se realizaron mediciones de ATP a través de ensayos de luminiscencia en distintas condiciones experimentales. Tanto la estimulación de los cultivos primarios de astrocitos con glutamato (10 μM) o t-ACPD (150 μM) indujo un aumento en la liberación de ATP, la cual fue completamente inhibida por el bloqueo en la producción de NO con L-NA (100 μM). Interesantemente, la liberación de ATP no fue afectada ni por el bloqueo de los hemicanales formados por Cx43 o canales formados por Panx-1, con $^{37,43}\text{Gap27}$ o $^{10}\text{Panx}$, respectivamente (Figura 19).

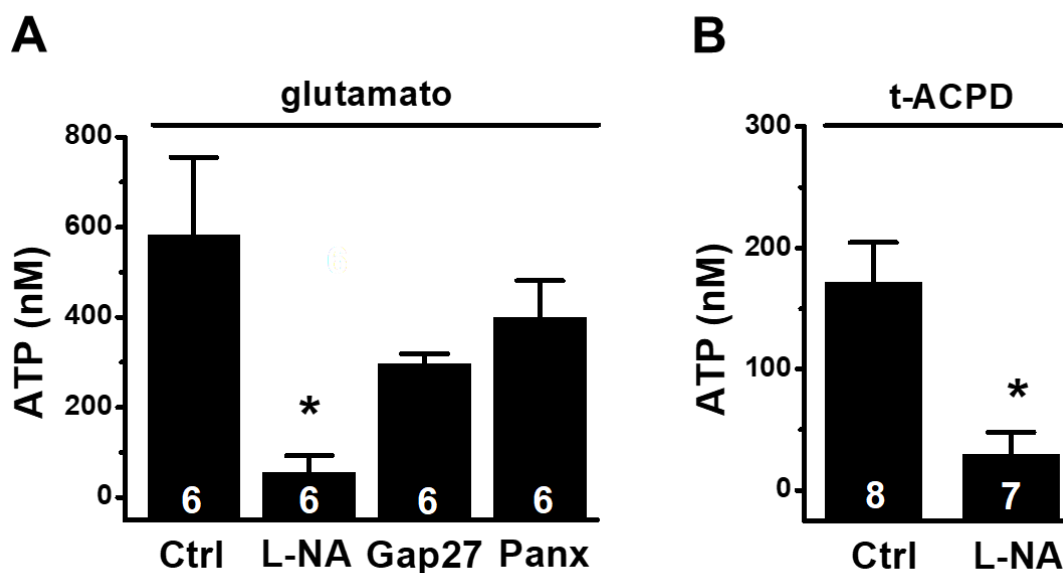


FIGURA 19: La activación de mGluR induce la liberación de ATP en astrocitos de corteza de cerebro de rata. La estimulación de mGluR con glutamato (10 μ m) (A) o t-ACPD (150 μ m) (B), indujo un aumento en la liberación de ATP en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata. Estadística ANOVA una vía *post hoc* Bonferroni, * = $p < 0,05$ L-NA vs Control (Ctrl) (A); Test t no pareado, * = $p < 0,01$ L-NA vs Control (Ctrl) (B).

4 Participación de CALHM1 en la señalización astrocítica que media el acoplamiento neurovascular

Como los resultados indican que, al parecer, una vía independiente de hemicanales formados por Cx43 o canales formados por Panx-1 contribuye a la liberación de ATP, se evaluó la posible participación del canal Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) en este proceso. De ésta manera, en primer lugar, se analizó la cantidad relativa y la distribución de CALHM1 en la corteza cerebro de rata. Como se muestra en la Figura 20, se encontró que CALHM1 se expresa en los astrocitos de la corteza cerebral, lo cual se confirmó en los cultivos primarios de astrocitos. Un aspecto interesante, es que en los cortes de cerebro la señal para CALHM1 fue además evidente en los pies de los astrocitos que se encontraban en íntima relación con las arteriolas parenquimales.

Para determinar si el ATP era liberado a través de CALHM1, se usó Rojo Rutenio (Rut Red), el cual bloquea canales CALHM1, pero no hemicanales formados por Cx43 o canales de Panx-1. Al contrario de lo observado con el bloqueo de Cx43 y Panx-1, el tratamiento con 20 μ M Rut Red abolió el aumento en la liberación de ATP inducido por glutamato (Figura 21).

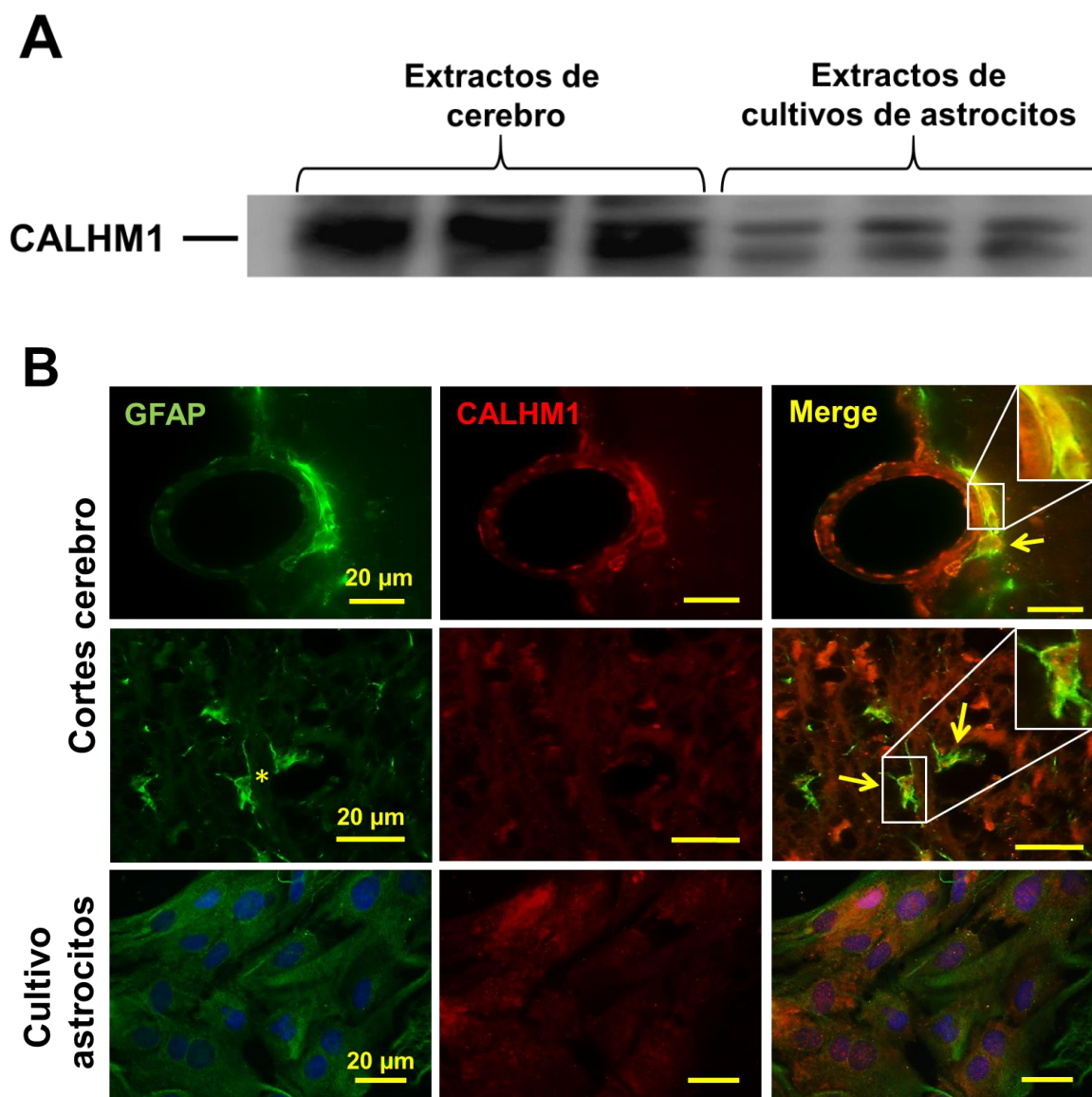


FIGURA 20: El CALHM1 se expresa en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A) Western blot de extractos crudos de cerebros completos de rata y cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, para determinación de la cantidad relativa de CALHM1. Se muestran tres extractos independientes de cada fuente. (B) Imágenes representativas de inmunofluorescencias en cortes de cerebro de rata, para CALHM1. GFAP fue utilizado como marcador de astrocitos. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia Olympus BX51 y analizadas por ImageJ. Las flechas indican la colocalización más evidente.

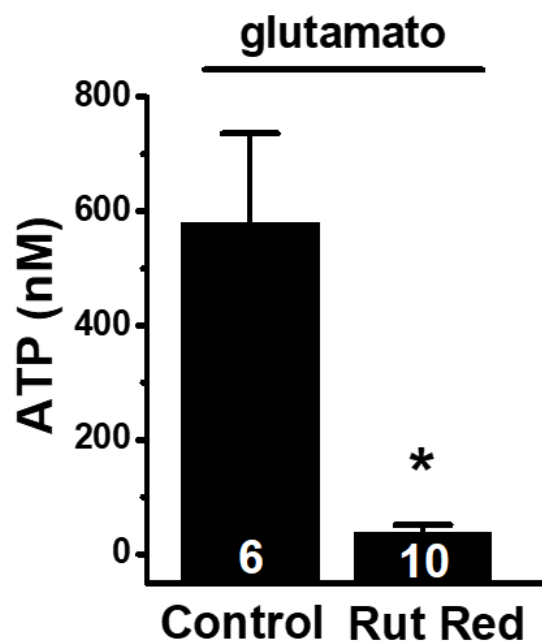


FIGURA 21: La liberación de ATP inducida por glutamato depende de la activación de *CALHM1* en astrocitos de corteza de cerebro de rata. Liberación de ATP en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata estimulados con glutamato en condiciones control, o en presencia de Rojo Rutenio (20 μ), Rut Red). Estadística: Test t no pareado, * = $p < 0.005$ Rut Red vs Control.

Consistente con el resultado anterior, captación de etidio, se encontró que Rut Red también bloqueó completamente el aumento en la captación de etidio (Figura 22) y en la $[Ca^{2+}]_i$ observado en respuesta a glutamato (Figura 23).

Dado que Rut Red podría tener algunos efectos inespecíficos; por lo tanto, para confirmar los resultados obtenidos mediante la manipulación farmacológica de CALHM1, se procedió a inhibir la expresión de esta proteína usando un siRNA específico (si CALHM1), lo cual redujo aproximadamente tres veces la cantidad relativa de CALHM1, sin afectar la cantidad relativa de Cx43 o Panx-1 (Figura 24).

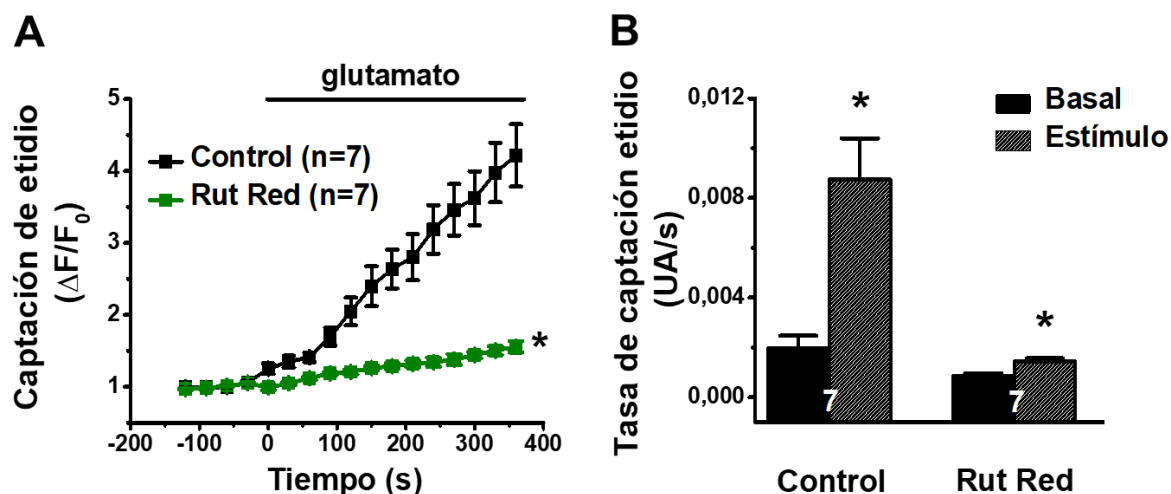


FIGURA 22: La actividad de canales inducida por glutamato depende de la activación de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A) Cursos temporales de la captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, estimulados con glutamato en condiciones control, o en presencia de Rut Red. (B) Tasas de captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, expresadas como las pendientes de las curvas de captación en condiciones basales (previo al estímulo) y durante el estímulo con glutamato (10 μ M) en condiciones control o en presencia de Rut Red (20 μ M). Estadística: ANOVA dos vías, * = $p < 0,0001$ Rut Red vs Control (A); Test t pareado, * = $p < 0,005$ Estímulo vs Basal.

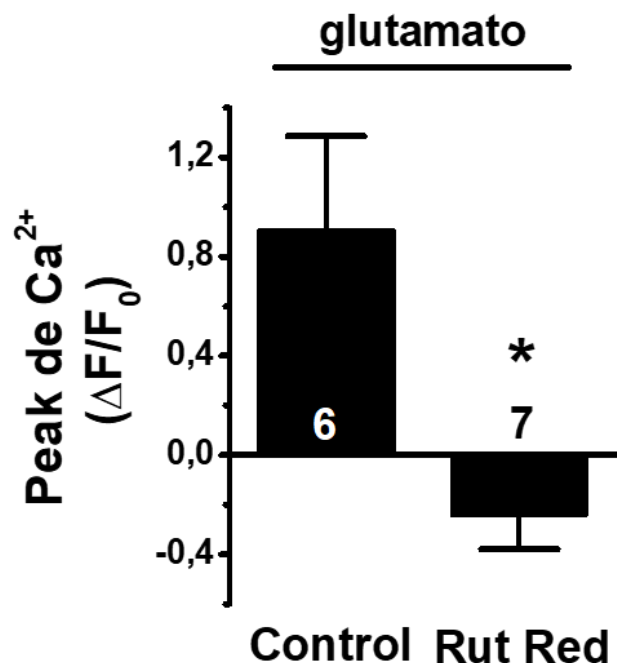


FIGURA 23: El aumento de Ca^{2+} inducido por glutamato depende de la activación de *CALHM1* en astrocitos de corteza de cerebro de rata. Peak de calcio, expresados como el cambio en la fluorescencia del indicador de Ca^{2+} Fluo-4, en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata estimulados con glutamato (10 μM) en condiciones control, o en presencia de Rut Red (20 μM). Estadística: Test t no pareado, * = $p < 0,005$ Rut Red vs Control.

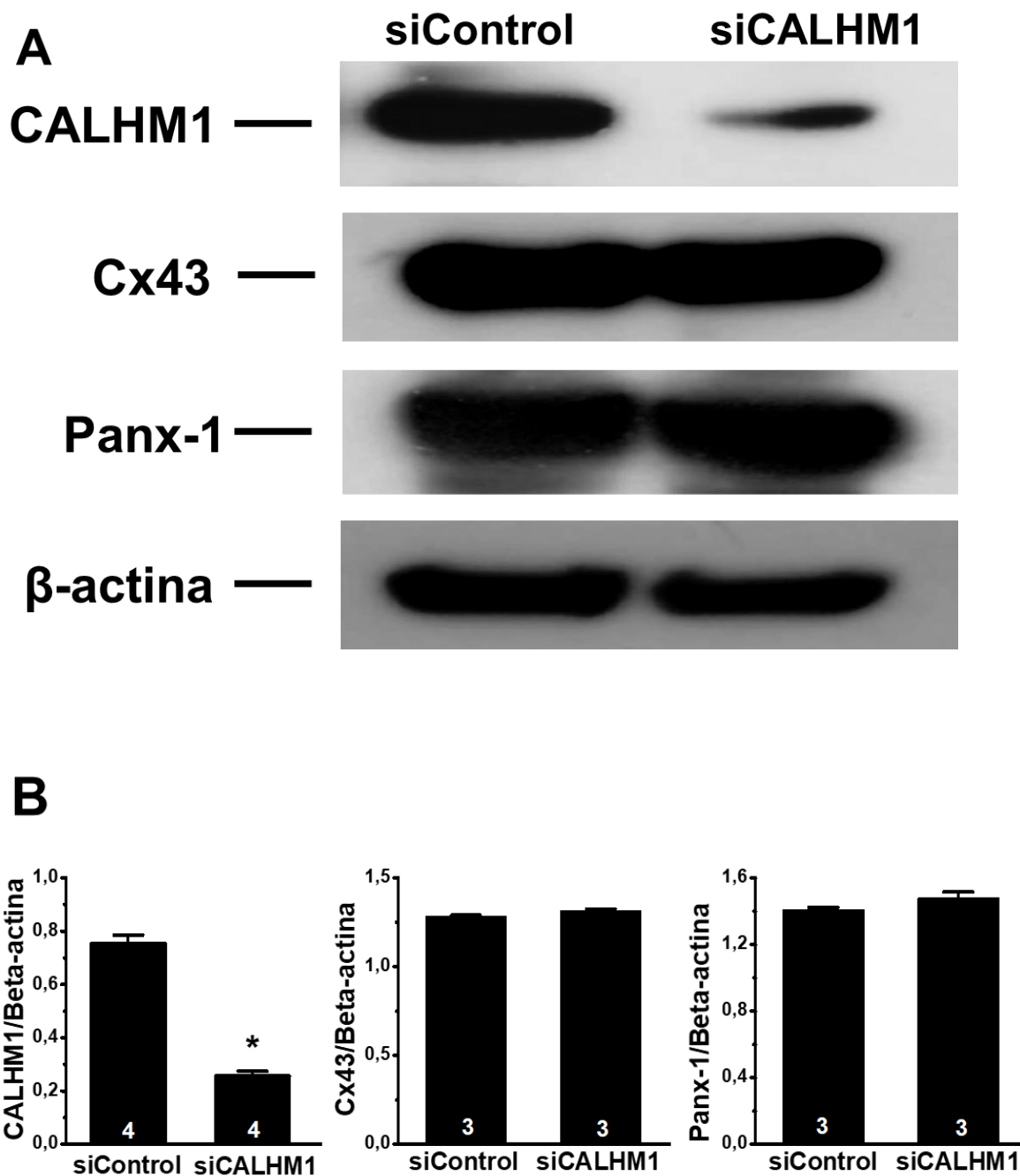


FIGURA 24: La disminución de la cantidad relativa de CALHM1 no afecta la cantidad relativa de Cx43 o Panx-1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A) Western blot representativos de la disminución de la cantidad relativa de CALHM1 en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, transfectados con un siRNA control (siControl) o con un siRNA interferente para CALHM1 (siCALHM1). La cantidad relativa de Cx43 y Panx-1 no fueron afectadas. (B) Cuantificación de la cantidad relativa de CALHM1, Cx43 y Panx-1, normalizados por la cantidad de β -Actina como control de carga. Estadística: Test t no pareado, * = $p < 0,0005$ siCALHM1 vs siControl.

De esta manera, se procedió a la determinación de la liberación de ATP en los cultivos en los que se disminuyó la expresión de CALHM1 a través del siRNA y se encontró que el tratamiento con el si CALHM1 produjo una drástica reducción en la liberación de ATP observada en las células tratadas con el interferente control (Figura 25).

Consistente con este resultado, la disminución en la expresión de CALHM1 inducida por el RNA interferente (siCALHM1) bloqueó completamente la captación de etidio (Figura 26) y el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 27) inducido por glutamato.

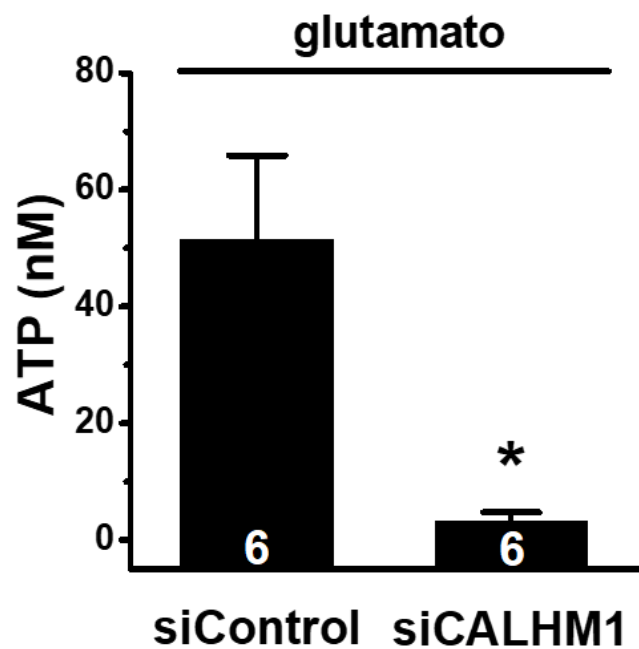


FIGURA 25: La liberación de ATP inducida por glutamato depende de la expresión de *CALHM1* en astrocitos de corteza de cerebro de rata. Liberación de ATP en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata transfectados con un siRNA control (siControl) o siRNA contra *CALHM1* (siCALHM1). Estadística: Test t no pareado, $* = p < 0,001$, siCALHM1 vs siControl.

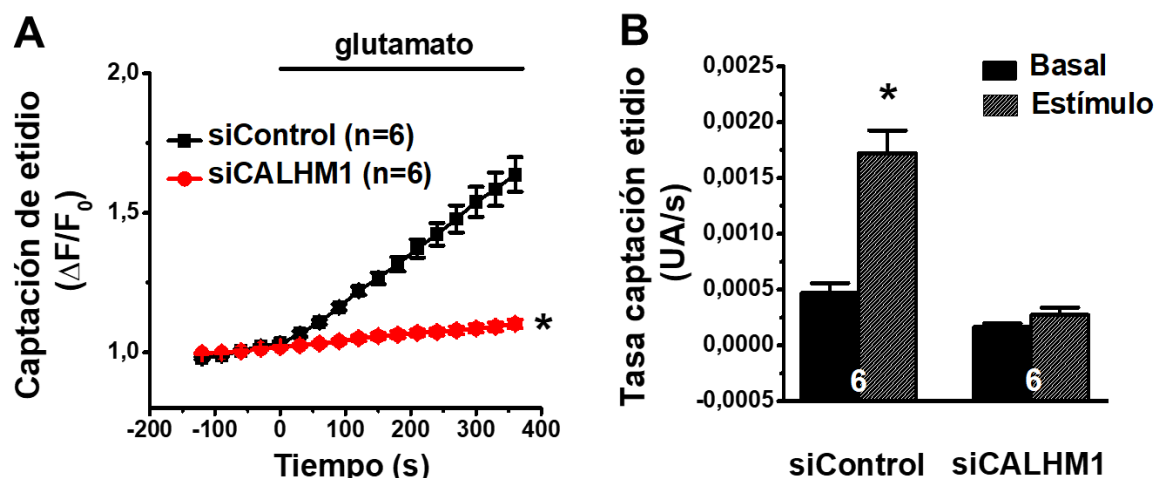


FIGURA 26: La actividad de canales inducida por glutamato depende de la expresión de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A) Cursos temporales de la captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, estimulados con glutamato en condiciones control con un RNA interferente control (siControl) o con un interferente para CALHM1 (siCALHM1). (B) Tasas de captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, expresadas como las pendientes de las curvas de captación en condiciones basales (previo al estímulo) y durante el estímulo con glutamato (10 μ M). Estadística: ANOVA dos vías, * = $p < 0,0001$ siCALHM1 vs siControl (A); Test t pareado, * = $p < 0,005$ Estímulo vs Basal (B).

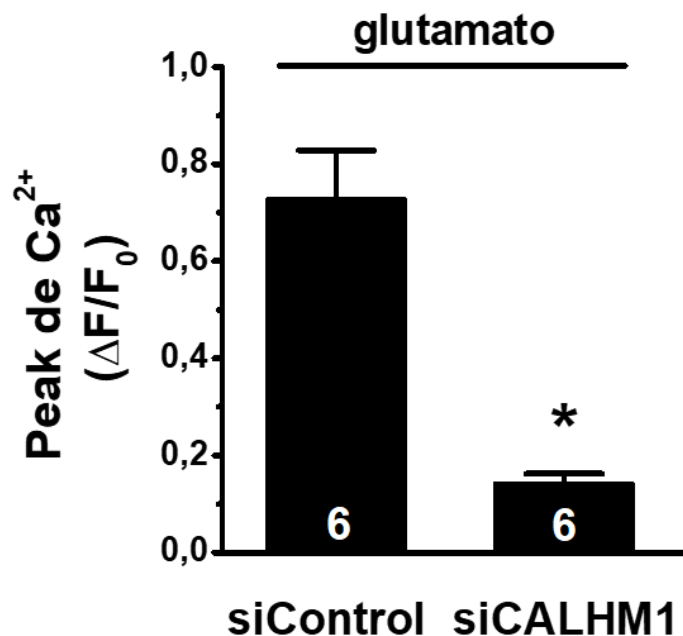


FIGURA 27: El aumento de Ca^{2+} inducido por glutamato depende de la expresión de *CALHM1* en astrocitos de corteza de cerebro de rata. Peak de Ca^{2+} , expresado como el cambio en la fluorescencia del indicador de Ca^{2+} (Fluo-4), en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata estimulados con glutamato (10 μM) en presencia de siControl, o en presencia de siCALHM1. Estadística: Test t no pareado, * = $p < 0,005$ siCALHM1 vs siControl.

Como el bloqueo de CALHM1 con Rut Red o la inhibición de su expresión en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata inhibieron el aumento en la captación de etidio y en la $[Ca^{2+}]_i$ en una manera similar a la observada en presencia de L-NA, se procedió a evaluar si la activación de CALHM1 estaba relacionada con la señalización de la eNOS en los astrocitos. En este contexto, se observó por medio del ensayo de PLA que la eNOS se encuentra espacialmente asociada a CALHM1 en cortes de cerebro de rata (Figura 28). El alto grado de coincidencia entre la señal del PLA con el marcador de astrocitos GFAP sugiere que la asociación entre eNOS y CALHM1 se podría localizar en astrocitos, lo cual se confirmó realizando este ensayo en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, donde se observó una clara señal fluorescente producto de la reacción del PLA por la proximidad (< 20 nm) de ambas proteínas (Figura 28).

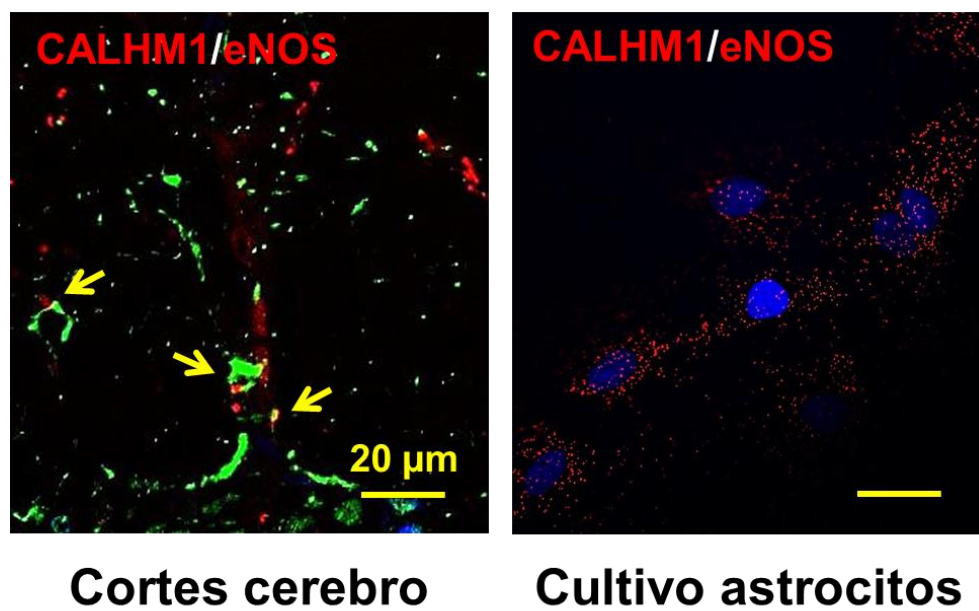


FIGURA 28: Asociación espacial entre *CALHM1/eNOS* en astrocitos de corteza de cerebro de rata. Ensayos de asociación por proximidad (Duolink® PLA) entre *CALHM1* y *eNOS* en cortes (5 µm) de cerebro de rata (panel izquierdo) y en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata (panel derecho). La señal fluorescente positiva para PLA se observa en rojo. En cortes se utilizó GFAP como marcador de astrocitos, las flechas indican las regiones en donde la asociación entre *CALHM1/eNOS* coincide con la señal para el GFAP.

La proximidad entre CALHM1 y eNOS podría facilitar la activación del canal CALHM1 a través de su S-nitrosilación mediada por NO, por lo que se evaluó por inmunofluorescencia el grado de S-nitrosilación total, usando un anticuerpo dirigido contra residuos S-nitrosilados (S-NO), en cultivos primarios de astrocitos al activar los receptores metabotrópicos de glutamato, con glutamato y t-ACPD. La señal de fluorescencia del anticuerpo anti-S-NO aumentó, en relación al tratamiento con el vehículo, en aquellos cultivos en donde se activaron los receptores metabotrópicos de glutamato y esta señal fue significativamente menor en aquellos cultivos en los que se bloqueó la producción de NO con L-NA, como puede observarse en la Figura 29.

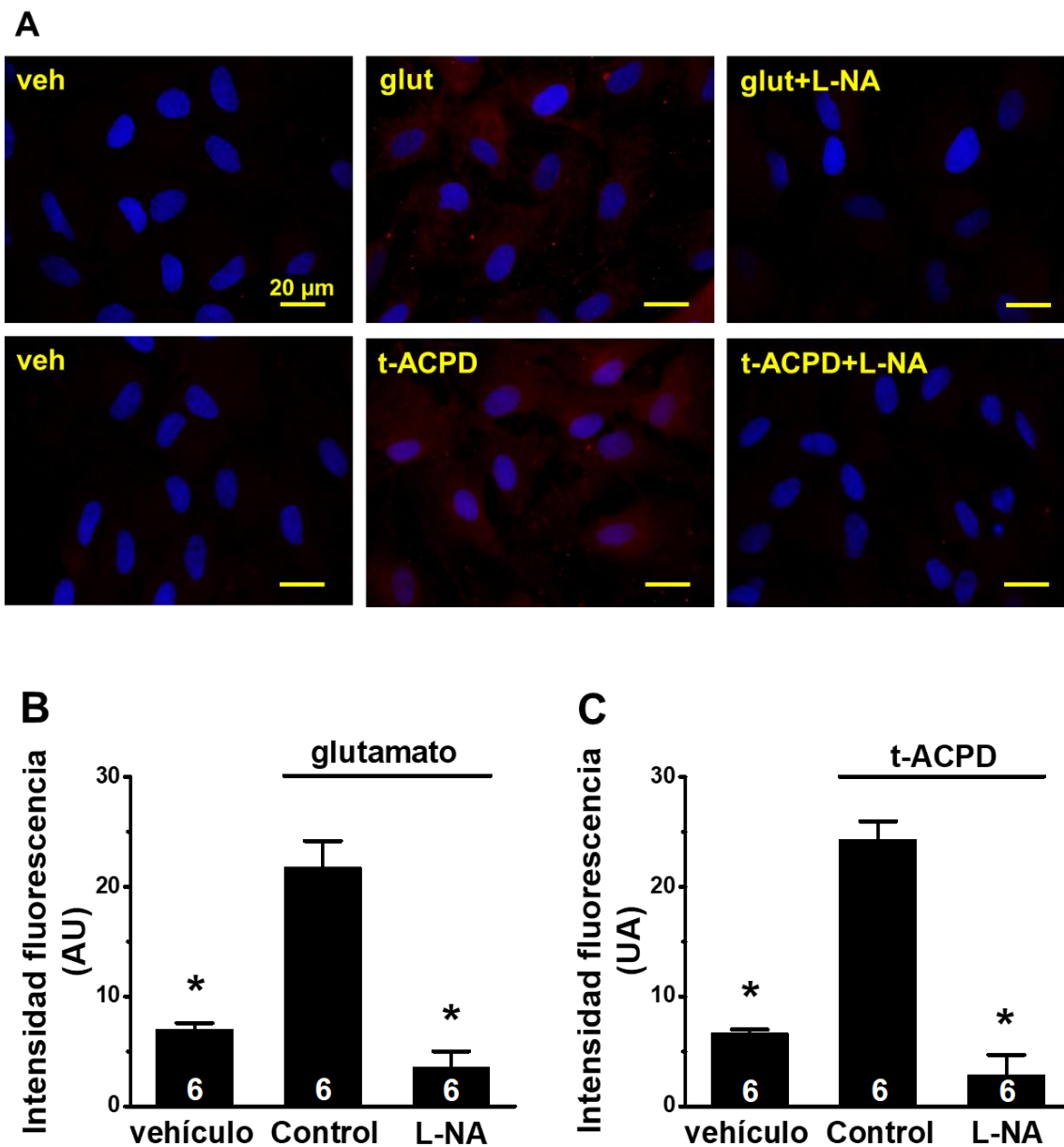


FIGURA 29: La señal de S-nitrosilación total aumenta luego de la activación de mGluR en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A) Imágenes representativas de la fluorescencia de la señal de S-nitrosilación (S-NO) en astrocitos estimulados con vehículo (veh), glutamato (10 μ M) (glut) o t-ACPD (150 μ M) en condiciones control o en presencia de L-NA (100 μ M). Cuantificación de la fluorescencia de S-NO en cultivos estimulados con glutamato (B) o t-ACPD (C). Estadística: ANOVA una vía, *post hoc* Bonferroni, * = $p < 0,0001$ vehículo o L-NA vs Control (B y C).

Consistente con el resultado anterior, se evaluó también el grado de S-nitrosilación de CALHM1, a través de ensayos de biotin-switch, lo que mostró que CALHM1 presentó un nivel basal de S-nitrosilación, el cual se incrementó al estimular los cultivos con 10 μ M glutamato o 3 μ M S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) y, como esperado, el tratamiento con L-NA inhibió el aumento de la señal de S-nitrosilación observado en respuesta a glutamato (Figura 30).

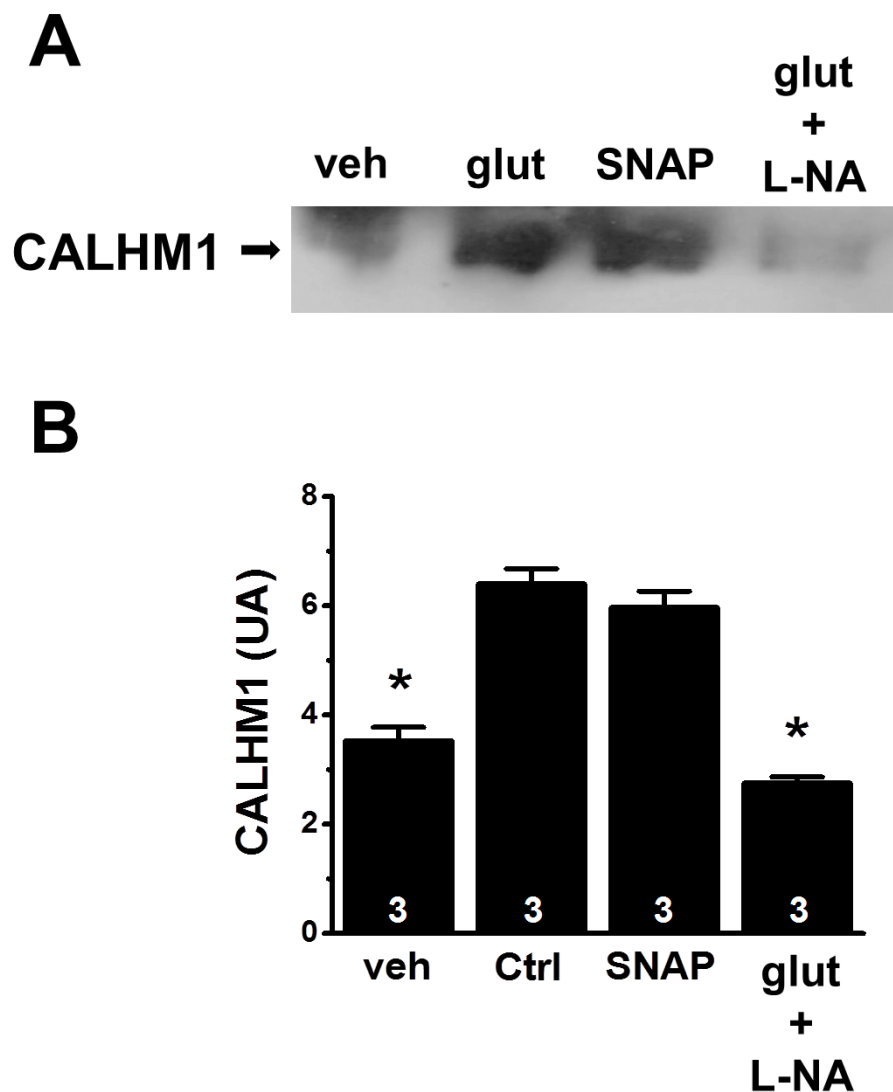


FIGURA 30: La estimulación con glutamato aumenta el nivel de S-nitrosilación de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A) Western blot representativo del ensayo de biotin switch en cultivo primario de astrocitos estimulados con vehículo (vehic), glutamato (glut), SNAP o glutamato en presencia de L-NA (glut+L-NA). (B) Análisis densitométrico de tres ensayos independientes de biotin switch en las distintas condiciones experimentales, utilizando ImageJ. Estadística: ANOVA una vía *post hoc* Bonferroni, * = $p < 0,0001$, vehículo (vehic) y L-NA vs glutamato (glut).

Para confirmar estos resultados, en cultivos primarios de astrocitos de cerebro de rata, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de CALHM1, para posteriormente revelar con un anticuerpo dirigido contra residuos S-nitrosilados (S-NO). Además, de manera paralela, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de residuos S-nitrosilados, donde se reveló para CALHM1, Cx43 y Panx-1. En ambos casos, se encontró que glutamato indujo un claro aumento en la señal para S-nitrosilación de CALHM1; es decir, de S-NO en el inmunoprecipitado de CALHM1 y de CALHM1 en el inmunoprecipitado de S-NO, pero la estimulación con glutamato no evidenció la presencia de Cx43 o Panx-1 en las muestras en que se inmunoprecipitó las proteínas que contenían residuos S-NO (Figura 31).

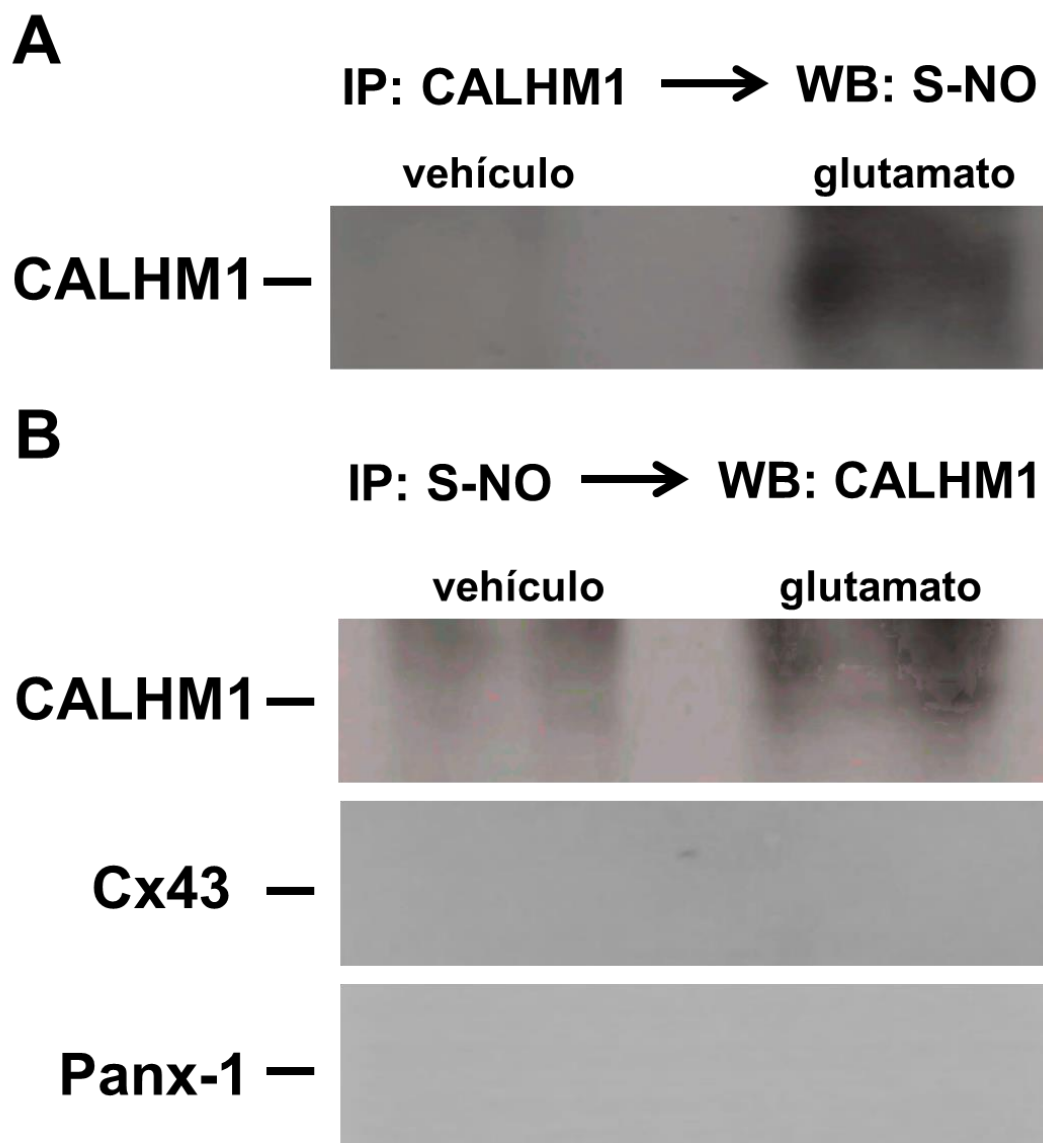


FIGURA 31: El CALHM1 inmunoprecipita con un anticuerpo anti S-NO en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A) Western blot representativo de la inmunoprecipitación de CALHM1 revelado con un anticuerpo anti-nitrosilación (S-NO) en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata estimulados con vehículo o glutamato. (B) Western blot representativo de la inmunoprecipitación de un anticuerpo anti-nitrosilación revelado para CALHM1. En estos ensayos no se detectó Cx43 o Panx-1.

Para comprobar la dependencia de la producción de NO en la actividad de CALHM1 en los astrocitos, se realizaron ensayos de captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata que fueron estimulados con SNAP (3 μ M), el cual indujo un aumento en la captación de colorante, que fue sensible al bloqueo de CALHM1 con 20 μ M Rut Red (Figura 32).

Consistente con el resultado anterior, SNAP también produjo un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, que fue inhibido por el bloqueo de CALHM1 con Rut Red (Figura 33).

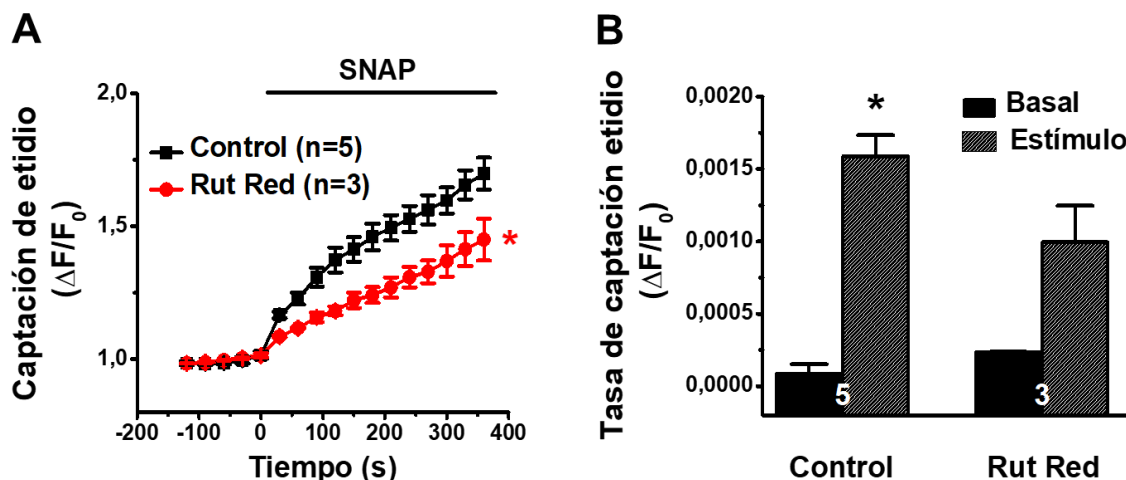


FIGURA 32: La actividad de CALHM1 depende de la presencia de NO en astrocitos de corteza de cerebro de rata. (A) Curso temporal de la captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata estimulados con SNAP (3 μ M) en condiciones control o en presencia de Rut Red. (B) Tasas de captación de etidio en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata, expresadas como las pendientes de las curvas de captación en condiciones basales (previo al estímulo) y durante el estímulo con SNAP. Estadística: ANOVA dos vías, * = $p < 0,0005$ Rut Red vs Control (A); Test t pareado * = $p < 0,005$ Estímulo vs Basal (B).

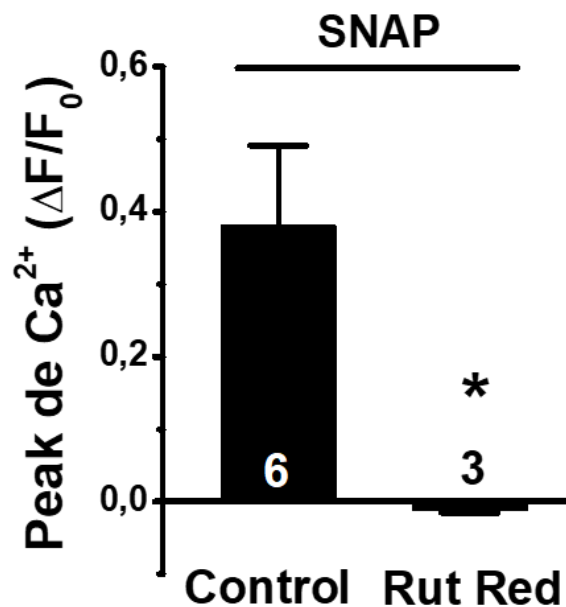


FIGURA 33: *El aumento de Ca^{2+} inducido por NO depende de la actividad de CALHM1 en astrocitos de corteza de cerebro de rata.* Peaks de Ca^{2+} , expresados como el cambio en la fluorescencia del indicador de calcio Fluo-4, en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro de rata estimulados con SNAP (3 μM) en condiciones control, o en presencia de Rut Red (20 μM). Estadística: Test t no pareado, * = $p < 0,05$ Rut Red vs Control.

Para comprobar los resultados anteriores, se realizaron ensayos en ovocitos de rana, inyectados con RNA de CALHM1, y se registraron las corrientes de membrana activadas por 10 μ M SNAP. Como se aprecia en la Figura 34, la estimulación con SNAP incrementó la corriente de salida en condiciones control, así como también las corrientes de cola, lo cual fue inhibido por el bloqueo de CALHM1 con 20 μ M Rut Red.

La activación de CALHM1 se asoció con la S-nitrosilación del este canal, ya que, en ovocitos inyectados con RNA de CALHM1, la estimulación con los donadores de NO, SNAP y DEANO (2-(N,N-diethylamino)-diazene-2-oxide) causó un aumento en el grado de S-nitrosilación de la proteína (Figura 35), el cual fue detectado mediante el ensayo de biotinylation.

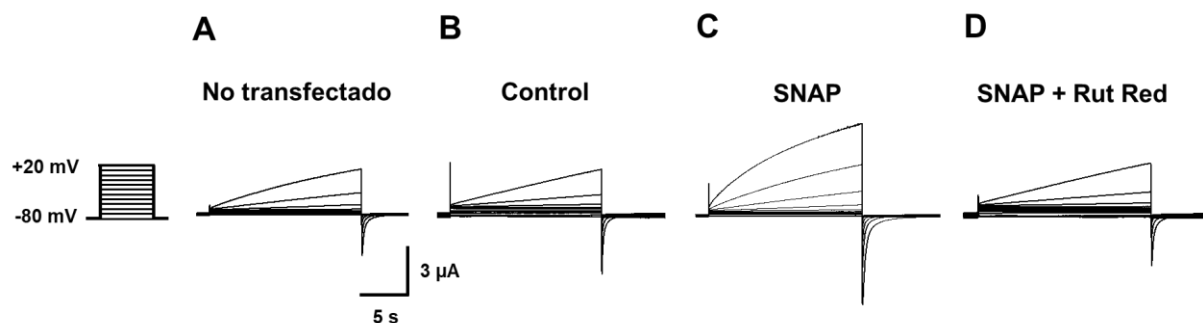


FIGURA 34: *La activación de CALHM1 depende de la presencia de NO en ovocitos.* Medición de corrientes registradas mediante “dual voltage clamp” en respuesta a pulsos repetitivos despolarizantes desde -80 a +20 mV en ovocitos de *Xenopus laevis* no transfectados (A), transfectados con RNA de CALHM1 en (B) condiciones control, (C) estimulados con SNAP (10 μ M) o (D) estimulados con SNAP en presencia de Rut Red (20 μ M).

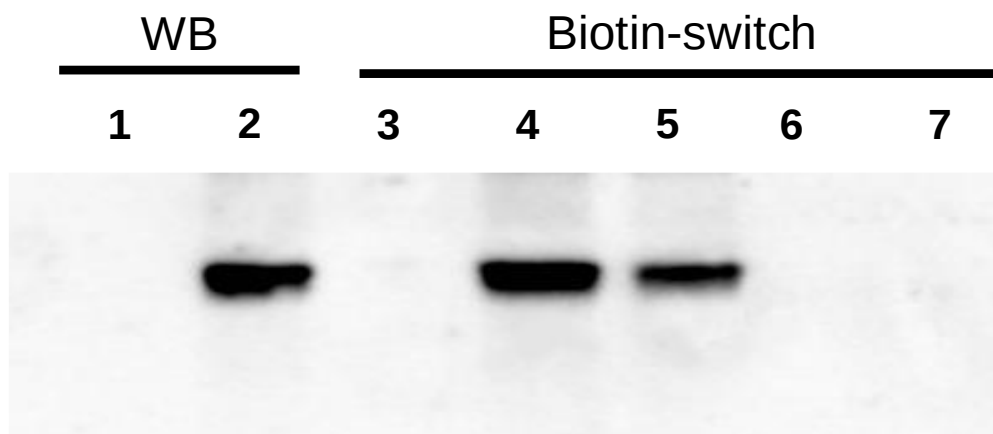


FIGURA 35: *El CALHM1 es S-nitrosilado en ovocitos estimulados con donadores de NO.* Western blot para CALHM1 en extractos de (1) ovocitos no inyectados; (2) ovocitos inyectados con CALHM1. Biotin switch en extractos de ovocitos (3) inyectados con RNA de CALHM1; (4) inyectados con RNA de CALHM1 estimulados con SNAP; (5) inyectados con RNA de CALHM1 estimulados con DEANO; (6) inyectados con RNA de CALHM1 estimulados con SNAP sin ácido ascórbico; (7) inyectados con RNA de CALHM1 estimulados con DEANO sin ácido ascórbico.

DISCUSIÓN

La estrecha relación entre el aumento de la actividad neuronal y el aumento del flujo sanguíneo cerebral, fue descrita hace más de un siglo en los estudios de Roy & Sherrington, quienes demostraron que las estructuras neurales pueden generar cambios en el flujo sanguíneo cerebral. Sin embargo, en la actualidad, no se encuentra totalmente dilucidado el mecanismo asociado a este proceso, el cual se conoce como acoplamiento neurovascular. La descripción de la unidad neurovascular, como una estructura funcional a principios de la década del 2000, ha sido foco de estudio en cuanto a la interacción entre neuronas, astrocitos y células de la vasculatura. Así, las distintas líneas de estudio de la unidad neurovascular, han permitido definir con bastante sustento que los astrocitos tienen una activa participación en el acoplamiento neurovascular, cumpliendo un rol que no está limitado sólo a sensor la actividad neuronal, sino que también participan dinámicamente en la transmisión de las señales neuronales hacia los vasos sanguíneos, lo que genera cambios en la actividad vasomotora, constituyendo de esta manera un puente de comunicación entre estos componentes (Anderson and Nedegaard, 2003; Zonta *et al.*, 2003; Lovick *et al.*, 2005; Schipke y Kettenmann, 2004; Hardon y Carmignoto, 2006; Koehler *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Girouard *et al.*, 2010; Petzold y Murthy, 2011; Kowianski *et al.*, 2013; Stobart *et al.*, 2013; MacVicar y Newman, 2015).

A pesar de los numerosos estudios que le otorgan a los astrocitos una función clave en el acoplamiento neurovascular, todavía no está claro el mecanismo molecular que participa en la generación, coordinación y transmisión de las señales vasomotoras. Sin embargo, existe consenso en que la señalización de Ca^{2+} en los astrocitos es un evento necesario para que se lleve a cabo la comunicación neurona-células vasculares (Guthrie *et al.*, 1999; Höfer *et al.*,

2002; Anderson y Nedergaard, 2003; Filosa *et al.*, 2004; Metea y Newman, 2006; Girouard *et al.*, 2010; Navarrete *et al.*, 2013; Otsu *et al.*, 2015; Bazargani y Attwell, 2016).

En relación a la participación del Ca^{2+} en el acoplamiento neurovascular, es interesante destacar que se ha descrito que los astrocitos expresan eNOS y nNOS en condiciones fisiológicas (Gabbott y Bacon, 1996; Barna *et al.*, 1996; Iwase *et al.*, 2000; Luth *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2007; Kugler y Drenckhahn, 1996; Šimic *et al.*, 2000; Catania *et al.*, 2001), las cuales al ser enzimas dependientes de Ca^{2+} (Fleming *et al.*, 1997; Alderton *et al.*, 2001) podrían activarse por la señalización astrocítica gatillada durante el acoplamiento neurovascular. Sin embargo, la función de estas enzimas en los astrocitos no ha sido reconocida y tampoco se ha caracterizado la producción de NO en este tipo de células.

Los resultados de esta tesis confirman que las isoformas endotelial y neuronal de la NOS se expresan en los astrocitos corticales del cerebro de rata (Figura 7). La asociación de la señal para eNOS y nNOS con el marcador de astrocitos GFAP en la vecindad de las arteriolas parenquimales sugiere que la producción de NO podría estar involucrada en la señalización astrocítica activada durante el acoplamiento neurovascular (Figura 8). En este contexto, glutamato indujo un aumento en la producción de NO y, además, la actividad vasomotora iniciada por glutamato en arteriolas de rebanadas cerebrales intactas fue bloqueada por L-NA, lo cual, en conjunto, sugiere un rol activo del NO producido por los astrocitos en la vasodilatación de arteriolas parenquimales durante el aumento de la actividad neuronal (Figuras 9 y 10). Además, la dependencia de NO observada en la señalización de Ca^{2+} gatillada en los astrocitos a través de la activación de mGluR (Figura 11), es consistente con reportes que indican que el aumento de Ca^{2+} en los astrocitos depende de la disponibilidad de NO (Li *et al.*, 2003).

Por otra parte, la evaluación de la actividad de hemicanales formados por Cx43 o canales formados por Panx-1 en los astrocitos, a través de ensayos de captación de colorante, indicó que la activación específica de mGluR genera la apertura de estos canales en los astrocitos, lo que cual además fue dependiente de la producción de NO (Figura 12). Este resultado está en concordancia con un estudio que indica que la actividad de hemicanales formados por conexinas pueden ser regulada por NO (Figueroa *et al.*, 2013). Además, en un reporte previo, se observó que la aplicación de un donador de NO en cultivos primarios de astrocitos se asoció con la apertura de hemicanales formados por Cx43 (Retamal *et al.*, 2006), el tipo de conexina mayormente expresada en astrocitos (Höfer *et al.*, 2002; Stout *et al.*, 2002; Filosa *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2008; Thompson y MacVicar, 2008; Xu *et al.*, 2008) y que se ha descrito como la conexina más relevante desde el punto de vista de la propagación de las ondas de Ca^{2+} en los astrocitos (Naus *et al.*, 1997; Scemes, *et al.*, 2006). Por otro lado, el NO también puede modular la actividad de los canales formados por Panx-1, proteína que también se expresa en astrocitos (Huang *et al.*, 2007; Giaume *et al.*, 2013). Sin embargo, en este punto existe controversia en la literatura, ya que algunos estudios indican que la presencia de NO aumenta la probabilidad de apertura de los canales formados por Panx-1, mientras que otros han mostrado una disminución de su actividad en presencia de NO (Zhang *et al.*, 2008; Lohman *et al.*, 2012). El aumento inducido por la activación de mGluR en la actividad de los hemicanales formados por Cx43 y canales formados por Panx-1, se correlacionó con un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 14), sugiriendo que estos canales participan en la señalización de Ca^{2+} en los astrocitos durante el acoplamiento neurovascular. La expresión de Cx43 y Panx-1 en astrocitos fue confirmada en los cultivos primarios (Figura 13 y 14), y los canales formados por estas proteínas presentaron un aumento en su actividad frente a la estimulación con glutamato (Figura 15), lo cual fue dependiente de la producción

de NO; específicamente, por la isoforma eNOS (Figura 16). Consistente con esto, el bloqueo del aumento de Ca^{2+} inducido por glutamato que se observó al inhibir los hemicanales formados por Cx43 y los canales formados por Panx-1, sugiere que estos canales tendrían un rol relevante, no descrito previamente, en la señalización de Ca^{2+} activada durante el acoplamiento neurovascular (Figura 17). De este modo, se pensó que el NO podría modular la actividad de estos canales por S-nitrosilación de estas proteínas. No obstante, se ha descrito que para que una proteína constituya un blanco de S-nitrosilación *in vivo*, se requiere una localización cercana a la fuente de producción de NO, dado que las modificaciones por S-nitrosilación constituyen un mecanismo de señalización de rango corto; es decir, poseen un rango de acción relativamente limitado en torno a la fuente de producción de NO, ya se produce en presencia de altas concentraciones de esta molécula de señalización. Por lo tanto, esta modificación post-traducciona está frecuentemente relacionada a la localización subcelular de la NOS (Martínez-Ruiz *et al.*, 2013). Sin embargo, los ensayos de ligación por proximidad (PLA), no mostraron una señal de asociación espacial relevante entre Cx43/eNOS y Panx-1/eNOS en cortes de cerebro y sólo en cultivos primarios de astrocitos se observó una señal positiva para la asociación entre Panx-1/eNOS (Figura 18), lo cual no necesariamente se podría asociar con la activación de los canales formados por Panx-1, ya que, como mencionado anteriormente, el efecto de la S-nitrosilación de estos canales es controversial.

Por otra parte, consistente con la participación de los receptores purinérgicos en el acoplamiento neurovascular (Pelligrino *et al.*, 2011; Wells *et al.*, 2015), el bloqueo con PPADS 100 μM , concentración a la cual se bloquean tanto los receptores purinérgicos metabotrópicos como ionotrópicos, abolió tanto la captación de colorante como el aumento de Ca^{2+} inducidos por glutamato, lo que sugiere que la activación de los receptores

purinérgicos es un evento temprano en este mecanismo (Figura 19 y 20). Por lo tanto, la liberación de ATP, otro evento muy relevante en la generación y coordinación de las ondas de Ca^{2+} en los astrocitos y, por consiguiente, en el acoplamiento neurovascular (Guthrie *et al.*, 1999; Xu y Pelligrino, 2007; Butt, 2011; Vetri *et al.*, 2011), debería ocurrir muy inicialmente luego de la activación de mGluR. En este contexto, la evaluación de la liberación de ATP en cultivos primarios de astrocitos dependió de la activación de mGluR, además de la producción de NO (Figura 21). Estos resultados sugieren que la vía de liberación de ATP, al ser dependiente de NO, podría requerir de una modificación por S-nitrosilación, como se ha descrito para la activación de los canales formados por Cx43 en astrocitos (Retamal *et al.*, 2006), o bien de la activación de los canales formados por Panx-1 (Zhang *et al.*, 2008). Cabe destacar que existen diversos estudios que sugieren que la liberación de ATP desde los astrocitos ocurre a través de hemicanales formados por Cx43 o canales formados por Panx-1 (Cotrina *et al.*, 1998; Locovei *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2008; Iwabushi *et al.*, 2011; Orellana *et al.*, 2011; Sudicani *et al.*, 2012); sin embargo, no está clara la vía de liberación de ATP en el acoplamiento neurovascular. Sorprendentemente, la liberación de ATP no fue sensible al bloqueo de los hemicanales formados por Cx43, como tampoco al bloqueo de los canales formados por Panx-1, lo que sugiere que en estas condiciones la liberación de ATP, dependiente de la producción de NO, es mediada por otra vía u otro mecanismo. En este escenario, la búsqueda de una vía alternativa que medie la liberación de ATP, nos llevó evaluar la posible participación de los canales formados por el canal Calcium Homeostasis Modulator I (CALHM1). El gen de CALHM1 fue identificado en estudios de búsqueda de genes humanos expresados en hipocampo que estuvieran relacionados con la enfermedad de Alzheimer (Bertram *et al.*, 2000). Sin embargo, existen antecedente que indican que los canales formados por CALHM1 son permeables a ATP (Taruno *et al.*, 2013a, Taruno *et al.*,

2013b; Ma *et al.*, 2016). Los canales formados por CALHM1, comparten características estructurales similares a los hemicanales formados por conexinas y canales formados por panexinas, aunque no pertenecen a la misma familia de proteínas (Siebert *et al.*, 2013). No obstante, todos los estudios asociados a CALHM1 señalan que esta proteína se expresa predominantemente en neuronas (Dreses-Werringloer *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2012; Taruno *et al.*, 2013a; Taruno *et al.*, 2013b; Ma *et al.*, 2016; Siebert *et al.*, 2016), no existiendo antecedentes previos que indiquen su expresión en astrocitos.

Los ensayos de detección de CALHM1, indicaron que este canal se expresa en astrocitos (Figura 22), y en concordancia con la posibilidad que estos canales constituyan la vía de liberación de ATP, la inhibición de CALHM1 con Rut Red bloqueó totalmente la liberación de ATP inducida por glutamato (Figura 23). Se debe notar que Rut Red no tiene efecto sobre los hemicanales formados por Cx43 o canales formados por Panx-1 (Siebert *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2016). Sumado a estos resultados, el bloqueo de CALHM1 con Rut Red también inhibió la captación de etidio (Figura 24) y el aumento de Ca^{2+} (Figura 25) inducidos por glutamato. El bloqueo de la expresión de CALHM1 con un siRNA específico, que no tuvo efectos en la expresión de Cx43 o Panx-1 (Figura 26 A y B), arrojó resultados similares a los obtenidos por el bloqueo farmacológico del canal con Rut Red (Figura 23), esto es, que la liberación de ATP fue abolida en los cultivos tratados con el interferente para CALHM1, sugiriendo que efectivamente CALHM1 podría constituir una vía de liberación de ATP en los astrocitos (Figura 27); y que tanto su apertura (Figura 28) y el aumento de Ca^{2+} (Figura 29) observado en los astrocitos, estarían asociados con la activación de mGluR en este mecanismo. Consistente con la participación del NO en la activación de la liberación de ATP, la evaluación de la asociación espacial de CALHM1 y eNOS por PLA indicó que estas proteínas están asociadas (Figura 30), lo cual podría dar cuenta de una dependencia por la

producción de NO de la señalización de CALHM1, es decir que su actividad podría estar sujeta a modificaciones por S-nitrosilación. En este contexto, la activación de mGluR se asoció a un aumento de la señal de S-nitrosilación general de proteínas en cultivos primarios de astrocitos, evaluada por la señal del anticuerpo diseñado contra S-NO, lo cual fue dependiente de la producción de NO (Figura 31), apoyando la idea de que CALHM1 podría constituir una proteína blanco de S-nitrosilación. Consistente con este resultado, el análisis predictivo de sitios de S-nitrosilación para de la secuencia de CALHM1 de rata, entrega 6 residuos de cisteína intracelulares potenciales para la modificación por S-nitrosilación (análisis de la secuencia en <http://www.uniprot.org/uniprot/D4AE44> y el predictor GPS-SNO 1.0). Coherente con este análisis, la técnica de Biotin Switch mostró que la estimulación con glutamato indujo un aumento de la señal de S-nitrosilación específica de CALHM1, la cual fue sensible al bloqueo de la producción de NO. Además, un resultado similar se obtuvo estimulando con el donador de NO (SNAP) (Figura 32). Estos resultados además fueron corroborados con los ensayos de inmunoprecipitación de CALHM1 con residuos S-NO y de proteínas S-nitrosiladas con CALHM1, los cuales también mostraron que, en estas condiciones experimentales, no se detectó marca asociada a S-nitrosilación para Cx43 o Panx-1 en respuesta a la estimulación con glutamato (Figura 33).

En la misma línea, la estimulación con el donador de NO (SNAP 3 μM), no sólo incrementó la tasa de captación (Figura 34), sino también indujo un aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intracelular (Figura 35), eventos que fueron inhibidos por el bloqueo de CALHM1 con Rut Red o por el tratamiento con el interferente para esta proteína (Figuras 28 y 29).

La expresión heteróloga de CALHM1 en ovocitos de rana mostró que los aumentos de las corrientes de entrada inducidas por SNAP fueron sensibles al bloqueo de CALHM1 con Rut Red (Figura 36), lo cual fue consistente con el aumento en los niveles de S-nitrosilación de

CALHM1, observado por medio de ensayos de Biotin Switch, en respuesta a la estimulación con los donadores de NO, SNAP y DEANO (Figura 37).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis, sugieren fuertemente que la activación de los mGluR en los astrocitos gatilla la activación de la producción de NO, específicamente, a partir de la eNOS, lo cual conduciría a la apertura de CALHM1 por S-nitrosilación y la consiguiente liberación de ATP a través de estos canales, lo cual, participaría en la señalización de Ca^{2+} a través de la activación de los receptores purinérgicos, permitiendo así la propagación de la señalización de Ca^{2+} que se ha descrito que ocurre el acoplamiento neurovascular. Los receptores purinérgicos contribuirían directamente a la señalización de Ca^{2+} en los astrocitos luego de su activación, y de manera indirecta, favorecerían la apertura de los hemicanales formados por Cx43 y los canales formados por Panx-1. Estos canales contribuirían a la señalización de Ca^{2+} ; sin embargo, no constituirían de manera relevante la vía inicial del aumento de Ca^{2+} en los astrocitos. En este contexto, el mecanismo propuesto basado en los resultados de esta tesis, se muestra en la Figura 36.

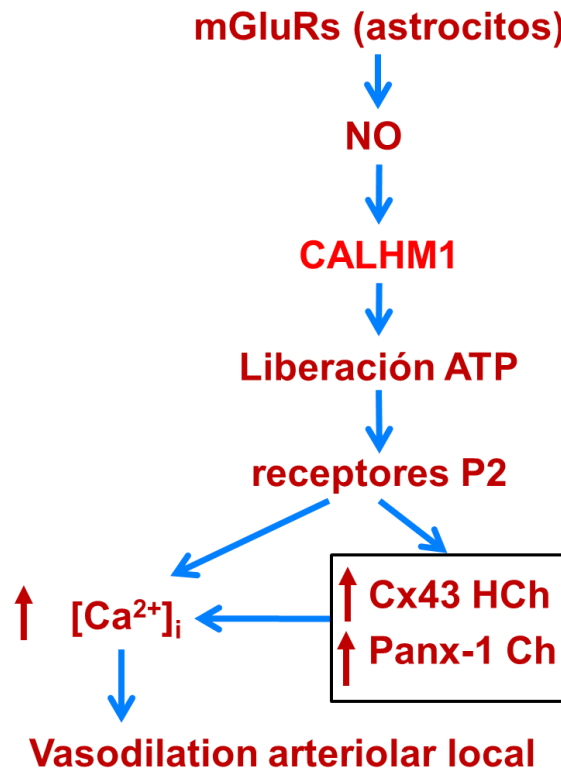


FIGURA 36: *Mecanismo propuesto*. El aumento de la actividad vasomotora iniciada por la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato, sería iniciado por la activación de CALHM1 a través de S-nitrosilación, gatillando la liberación de ATP y la subsecuente activación de los receptores purinérgicos en los astrocitos, coordinando la señalización de calcio.

Como proyecciones de esta tesis, se piensa que sería interesante determinar qué señales vasodilatadoras son las que se activan en este mecanismo orquestado por CALHM1. Además de poder definir la identidad de los receptores purinérgicos que participan en este proceso. También, sería interesante poder determinar si existe asociación espacial entre nNOS y Cx43 o Panx-1, ya que es posible que la activación de dicha isoforma de la NOS pueda generar la activación de los hemicanales formados por Cx43 y/o canales formados por Panx-1.

Cabe destacar, que la expresión de CALHM1 en astrocitos y su participación en el acoplamiento neurovascular determinados en esta tesis, abren una nueva línea de investigación, ya que CALHM1 podría constituir un foco de estudio en modelos patológicos donde la unidad neurovascular se encuentre alterada, y de esta manera constituir un blanco terapéutico para el tratamiento de alteraciones cerebro vasculares.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott, N.J., Ronnback, L. y Hansonn, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neur.* 7, 41-53.

Alderton, W.K., Cooper, C.E. y Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593–615.

Allt, G. y Lawrenson J.G. (1997). Is the pial microvessel a good model for blood-brain barrier studies?. *Brain Res. Rev.* 24, 67-76.

Alvarez-Maubecin, V., Garcia-Hernandez, F., Williams, J.T. y Van Bockstaele, E.J. (2000). Functional coupling between neurons and glia. *J. Neurosci.* 20 (11), 4091–4098.

Anderson, C.M. y Nedergaard, M. (2003). Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *TRENDS in Neurosciences.* 26 (7), 340-344.

Araque, A., Martin, E.D., Perea, G., Arellano, J.I. y Buño, W. (2002). Synaptically released acetylcholine evokes Ca^{2+} elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 22, 2443-2450.

Bachetti, T., Comini, L., Curello, S., Bastianon, D., Palmieri, M., Bresciani, G., Callea, F. y Ferrari, R. (2004). Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37, 939–945.

Bao, L., Locovei, S. y Dahl, G. (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.* 572 (1-3), 65-68.

Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., Shagin, D., Nazarenko, S., Geraymovych, E., Litvin, O., Tiunova, A., Born, T.L., Usman, N., Staroverov, D., Lukyanov, S. y Panchin, Y. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics.* 83, 706–716.

Barbe, M.T., Monyer, H. y Bruzzone, R. (2006). Cell-Cell Communication Beyond Connexins: The Pannexin Channels. *Physiol.* 21, 103–114.

Barna, M., Komatsu, T. y Reiss, C.S. (1996). Activation of Type III Nitric Oxide Synthase in Astrocytes Following a Neurotropic Viral Infection. *Virology.* 223, 331-343.

Basu, R., Bose, A., Thomas, D., Sarma, J.D. (2017). Microtubule assisted altered trafficking of Astrocytic Gap Junction Protein Connexin 43 is associated with depletion of Connexin 47 during Mouse Hepatitis Virus infection. *J. Biol. Chem.* 292 (36), 14747-14763.

Bazargani, N. y Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat. Neurosci.* 19, 182–189.

Bertram, L., Blacker, D., Mullin, K., Keeney, D., Jones, J., Basu, S., Yhu, S., McInnis, M.G., Go, R.C., Vekrellis, K., Selkoe, D.J., Saunders, A.J. y Tanzi, R.E. (2000). Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science*. 290 (5500), 2302-2303.

Bhardwaj, A., Northington, F.J., Carhuapoma, J.R., Falck, J.R., Harder, D.R., Traystman, R.J. y Koehler, R.C. (2000). P-450 epoxigenase and NO synthase inhibitors reduce cerebral blood flow response to N-methyl-d-aspartate. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H1616-H1624.

Bignami, A., Asher, R. y Perides, G. (1991) Brain extracellular matrix and nerve regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 296, 197-206.

Billaud, M., Johnstone, S.R., Heberlein, K.R., Straub, A.C. e Isakson, B.E. (2013). Effect of oxidative stress on connexins in the vasculature, 157-194 en *Connexin cell communication channels: roles in the immune system and immunopathology*. Oviedo-Orta, E., Kwak, B. R. and Evans, W. H. CRC Press.

Bowser, D.N. y Khakh, B.S. (2004). ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks. *J. Neurosci.* 24, 8606-8620.

Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 682-685.

Bruzzone, R., Hormuzdi, S.G., Barbe, M.T., Herb, A. y Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 13644–13649.

Burra, S. y Jiang, J.X. (2011). Regulation of cellular function by connexin hemichannels. *Inter. J. Biochem. Mol. Biol.* 2 (2), 119–128.

Butt, A.M. (2011). ATP: a ubiquitous gliotransmitter integrating neuron-glia networks. *Semin Cell Dev Biol.* 22 (2), 205-213.

Catania, M. V., Aronica, E., Yankaya, B. y Troost, D. (2001). Increased Expression of Neuronal Nitric Oxide Synthase Spliced Variants in Reactive Astrocytes of Amyotrophic Lateral Sclerosis Human Spinal Cord. *J. Neurosci.* 21 RC148, 1-5.

Cheng, J. C., Chang, H.M., Fang, L., Sun, Y.P. y Leung, P.C. (2015). TGF- β 1 Up-Regulates Connexin43 Expression: A Potential Mechanism for Human Trophoblast Cell Differentiation. *J. Cell. Physiol.* 230 (7), 1558-1566.

Chever, O., Lee, C.Y. y Rouach, N. (2014). Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* (34), 11228-11232.

Chiu, Y.H., Ravichandran, K.S. y Bayliss, D.A. (2014). Intrinsic properties and regulation of Pannexin 1 channel. *Channels.* 8 (2), 103–109.

Cipolla, M.J. (2010). *The Cerebral Circulation*. 1st Edition. Morgan & Claypool Life Sciences. pp. 1-5.

Condorelli, D.F., Mudó G., Trovato-Salinaro, A., Mirone, M.B., Amato, G. y N. Belluardo. (2002). Connexin-30 mRNA Is Up-Regulated in Astrocytes and Expressed in Apoptotic Neuronal Cells of Rat Brain Following Kainate-Induced Seizures. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 94–113.

Contreras, J.E., Sánchez, H.A., Véliz, L.P., Bukauskas, F.F., Bennett, M.V. y Sáez, J.C. (2004). Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. *Brain Res. Rev.* 47, 290-303.

Cotrina, M.L., Lin, J.H., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C.C. y Nedergaard, M. (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (26), 15735-15740.

Cui, H., Liu, Y., Qin, L., Wang, L. y Huang, Y. (2016). Increased membrane localization of pannexin1 in human corneal synaptosomes causes enhanced stimulated ATP release in chronic diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore).* 95 (49), e5084.

Daff, S. (2010). NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide.* 23, 1–11.

De Bock, M., Wang, N., Decrock, E., Bol, M., Gadicherla, A.K., Culot, M. Cecchelli, R. Bultynck, G. y Leybaert, L. (2013). Endothelial calcium dynamics, connexin channels and blood brain barrier function. *Prog. Neurobiol.* 108, 1-20.

De Leon, J.R., Buttrick, P.M. y Fishman, G.I. (1994). Functional Analysis of the Connexin43 Gene Promoter in Vivo and in Vitro. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26 (3), 379-389.

del Zoppo, G.J. y Mabuchi, T. (2003). Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J. Cereb. Blood F. Metab.* 23(8), 879-894.

Dermietzel, R., Hertzberg, E.L., Kessler, J.A. y Spray, D.C. (1991). Gap Junctions between Cultured Astrocytes: Immunocytochemical, Molecular, and Electrophysiological Analysis. *J. Neurosci.* 11(5), 1421-1 432.

Derouiche, A. y Frotscher, M. (1991). Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contain glutamine synthase: evidence for transmitter degradation. *Brain Res.* 552, 346-350.

Dreses-Werringloer, U., Lambert, J.C., Vingtdeux, V., Zhao, H., Vais, H., Siebert, A., Jain, A., Koppel, J., Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Pasquier, F., Galimberti, D., Scarpini, E., Mann, D., Lendon, C., Campion, D., Amouyel, P., Davies, P., Fosskett, J. K., Campagne, F. y Marambaud, P. (2008). A Polymorphism in CALHM1 Influences Ca²⁺ Homeostasis, Ab Levels, and Alzheimer's Disease Risk. *Cell.* 133, 1149–1161.

Duffy, S. y MacVicar, B.A. (1995). Adrenergic calcium signaling in astrocyte network within the hippocampal slice. *J. Neurosci.* 15, 5535-5550.

Edvinsson, L.M. y Mackenzie, E.T. (2002). General and Comparative Anatomy of the Cerebral Circulation en “Cerebral Blood Flow and Metabolism”, Editado por Ingvar, D. 2nd Edition. New York: Lippincott Williams and Wilkins, pp: 3-29.

Faraci, F.M. y Brian, J.E. Jr. (1996). Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke.* 25 (3), 692-703.

Figueroa, X.F., Lillo, M.A., Gaete, P.S., Riquelme, M.A. y Sáez, J.C. (2013). Diffusion of nitric oxide across cell membranes of the vascular wall requires specific connexin-based channels. *Neuropharmacology.* 75, 471-478.

Filosa, J.A., Bonev, A.D. y Nelson, M.T. (2004). Calcium Dynamics in Cortical Astrocytes and Arterioles During Neurovascular Coupling. *Circ Res.* 95, e73-e81.

Filosa, J.A., Bonev, A.D., Straub, S.V., Meredith, A.L., Wilkerson, M.K., Aldrich, W. y Nelson, M.T. (2006). Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat. Neurosc.* 9, 1397-1404.

Filosa, J.A. y Blanco, V.M. (2007). Neurovascular coupling in the mammalian brain. *Experimental Physiology.* 92 (4), 641-646.

Fishman, G.I., Eddy, R.L., Shows, T.B., Rosenthal, L. y Leinwand, L.A. (1991). The human connexin gene family of gap junction proteins: Distinct chromosomal locations but similar structures. *Genomics.* 10 (1), 250–256.

Fleming, I., Bauersachs, J. y Busse, R. (1997). Calcium-Dependent and Calcium-Independent Activation of the Endothelial NO Synthase. *J. Vasc. Res.* 34 (3), 165-174.

Förstermann, U. y Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–837.

Gabbott, P.L.A. y Bacon, S.J. (1996). Localisation of NADPH diaphorase activity and NOS immunoreactivity in astroglia in normal adult rat brain. *Brain Res.* 714, 135-144.

Giaume, G., Fromaget, C., El Aoumari, A., Cordier, J., Clowinski, J. y Gras, D. (1991). Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron.* 6 (1), 133-143.

Giaume, C. y McCarthy, K.D. (1996). Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends in Neurosciences.* 19 (8), 319-325.

Giaume, C. y Theis, M. (2010). Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated canal singlial cells of the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 63, 160–176.

Giaume, C., Orellana, J.A., Abudara, V. y Sáez, J.C. (2012). Connexin-based channels in astrocytes: how to study their properties. *Met. Mol. Biol.* 814, 283-303.

Giaume, C., Leybaert, L. Naus, C.C. y Sáez, J.C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front. Pharmacol.* 4:88.

Girouard, H., Bonev, A.D., Hannah, R.M., Meredith, A., Aldrich, R.W. y Nelson, M.T. (2010). Astrocytic endfoot Ca^{2+} and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 3811–3816.

Gordon, G.R., Choi, H.B., Rungta, R.L., Ellis-Davies, G.C. y MacVicar, B.A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature.* 456,745–749.

Gosejacob, D., Dublin, P., Bedner, P., Huttman, K., Zhang, J., Tress, O., Willecke, K., Pfrieger, F., Steinhauser, C. y Theis, M. (2011). Role of astroglial connexin30 in hippocampal gap junction coupling. *Glia.* 59, 511–519.

Gould, N., Doulias, P.T., Tenopoulou, M., Raju, K. y Ischiropoulos, H. (2013). Regulation of Protein Function and Signaling by Reversible Cysteine S-Nitrosylation. *J. Biol. Chem.* 288 (37), 26473–26479.

Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C. y Kater, S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci.* 19, 520–528.

Haydon, P.G. y Carmignoto, G. (2006). Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling. *Physiol. Rev.* 86, 1009-1031.

Höfer, T., Venance, L. y Giaume, C. (2002). Control and plasticity of intercelular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. *J. Neurosci.* 22, 4850-4859.

Huang, Y., Grinspan, J.B., Abrams, C.K. y Scherer, S.S. (2007). Pannexin1 is Expressed by Neurons and Glia but Does Not Form Functional Gap Junctions. *Glia.* 55, 46–56.

Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 347-360.

Iadecola, C. y Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* 10 (11), 1369-1376.

Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D.C. y Scemes, E. (2009). Pannexin 1: The Molecular Substrate of Astrocyte “Hemichannels”. *J. Neurosci.* (29) 21, 7092-7097.

Irikura, K., Huang, P.L., Ma, J., Lee, W.S., Dalkara, T., Fishman, M.C., Dawson, T.M., Snyder, S.H. y Moskowitz, M.A. (1995). Cerebrovascular alterations in mice lacking neuronal nitric oxide synthase gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6823-6827.

Ishibashi, T., Dakin, K., Stevens, B., Lee, P., Kozlov, S., Stewart, C. y Fields, R. (2006). Astrocytes Promote Myelination in Response to Electrical Impulses. *Neuron* 49 (6), 823–832.

Iwabuchi, S. y Kawahara, K. (2011). Functional significance of the negative-feedback regulation of ATP release via pannexin-1 hemichannels under stress in astrocytes. *Neurochem. Inter.* 58, 376-384.

Iwase, K., Miyanaka, K., Shimizu, A., Nagasaki, A., Gotoh, T., Mori, M. y Takiguchi, M. (2000). Induction of endothelial nitric-oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment. *J. Biol. Chem.* 275, 11929–11933.

Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J. y Bonvento, G. (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter. A confocal microscopy study. *Glia.* 23, 1-10.

Kang, J. Jiang, L., Goldman, S.A. y Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* 1, 683-692.

Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J. y Nedergaard, M. (2008) Connexin 43 Hemichannels Are Permeable to ATP. *J. Neurosci.* 28 (18), 4702-4711.

Kanwar, J.R., Kanwar, R.K., Burrow, H. y Baratchi, S. (2009). Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr. Med. Chem.* 16, 2373–2394.

Kawabata, S., Tsutsumi, R., Kohara, A., Yamaguchi, T., Nakanishi, S. y Okada, M. (1996). Control of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors. *Nature.* 383, 89-92.

Kiatura, H., Uozumi, N., Tohmi, M. Yamazaki, M., Sakimura, K. y Kudoh, M. (2007). Roles of nitric oxide as a vasodilator in neurovascular coupling of mouse somatosensory cortex. *Neurosci. Res.* 59, 160-171.

Kimelberg, H.K. y Norenberg M.D. (1989) Astrocytes. *Sci. Am.* 260, 66-72.

Kirchhoff, F., Dringen, R. y Giaume, C. (2001). Pathways of neuron–astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 251 (4), 159–169.

Koehler, R.C., Gebremedhin, D. y Harder, D.R. (2006). Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol.* 100: 307–317.

Kowianski, P., Lietzau, G., Steliga, A., Waskow, M. y Morys, J. (2013). The astrocytic contribution to neurovascular coupling—still more questions than answers?. *Neurosci. Res.* 75, 171–183.

Kugler, P. y Drenckhahn, D. (1996). Astrocytes and Bergmann Glia as an Important Site of Nitric Oxide Synthase I. *Glia*. 16, 165-173.

Kulik, A. Haentzsch, A., Luckermann, M., Reichelt, W. y Ballanyi, K. (1999) Neuron-glia signaling via $\alpha 1$ adrenoceptor-mediated Ca^{2+} release in Bergmann glial cells in situ. *J. Neurosci.* 19, 8401-8408.

Laird, D.W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* 394 (3), 527-543.

Lampe, P.D. y Lau A.F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36 (7), 1171–1186.

Lecrux, C. y Hamel, E. (2011) The neurovascular unit in brain function and disease. *Acta Physiol.* 203, 47-59.

Leffler, C.W., Parfenova, H., Fedinec, A.L. Basuroy, S. y Tcheranova, D. (2006). Contributions of astrocytes and CO to pial arteriolar dilation to glutamate in newborn pigs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H2897-2904.

Leybaert, L., Paemeleire, K., Strahonja, A. y Sanderson, M.J. (1998). Inositol-triphosphate-dependent intercellular calcium signalling in and between astrocytes and endothelial cells. *Glia* 24, 398–407.

Li, H. y Poulos, T.L. (2005). Structure–function studies on nitric oxide synthases. *J. Inorg. Biochem.* 99, 293–305.

Li, N., Su, J.Y. y Haydon, P.G. (2003). A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *J. Neurosci.* 23 (32), 10302-10310.

Li, W., Hertzberg, E.L. y Spray D.C. (2005). Regulation of connexin43-protein binding in astrocytes in response to chemical ischemia/hipoxia. *J. Biol. Chem.* 280 (9), 7941-7948.

Lin, L.H., Taktakishvili, O. y Talman, WT. (2007). Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii. *Brain Res.* 26 (1171), 42–51.

Lindauer, U., Megow, D., Matsuda, H. y Dirnagl, U. (1999). Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am. J. Physiol.* 277 (2 Pt 2), H799-811.

Litvin, O., Tiunova, A., Connell-Alberts, Y., Panchin, Y. y Baranova, A. (2006). What is hidden in the pannexin treasure trove: the sneak peek and the guesswork. *J. Cell. Mol. Med.* 10, 613–634.

Lo, C. W. (1996). The role of gap junction membrane channels in development. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28 (4), 379–385.

Locovei, S., Wang, J. y Dahl, G. (2006). Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Letters.* 580, 239–244.

Lohman, A.W., Weaver, J.L., Billaud, M., Sandilos, J.K., Griffiths, R., Straub, A.C., Penuela, S., Leitinger, N., Laird, D.W., Bayliss, D.A. e Isakson, B.E. (2012). S-nitrosylation inhibits pannexin 1 channel function. *J. Biol. Chem.* 287, 39602–39612.

López, W., Ramachandran, J., Alsamarah, A., Luo, Y., Harris, A.L. y Contreras, J.E. (2016). Mechanism of gating by calcium in connexin hemichannels. *PNAS.* 113 (49), E7986–E7995.

Lourenço, C.F., Ledo, A., Barbosa, R.M. y Laranjinha, J. (2017). Neurovascular uncoupling in the triple transgenic model of Alzheimer's disease: Impaired cerebral blood flow response to neuronal-derived nitric oxide signaling. *Experimental Neurology.* 291, 36–43.

Lovick, T.A., Brown, L.A. y Key, B.J. (2005). Neuronal activity-related coupling in cortical arterioles: involvement of astrocyte-derived factors. *Exp. Physiol.* 90, 131–140.

Luth, H.J., Holzer, M., Gartner, U., Staufenbiel, M. y Arendt, T. (2001). Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res.* 913, 57–67.

Lutz, S.E., Zhao, Y., Gulinello, M., Lee, S.C., Raine, C.S. y Brosnan, C.F. (2009). Deletion of Astrocyte Connexins 43 and 30 Leads to a Dysmyelinating Phenotype and Hippocampal CA1 Vacuolation. *J. Neurosci.* 29 (24), 7743–7752.

Ma, J., Ayata, C., Huang, P.L., Fishman, M.C. y Moskowitz, M.A. (1996). Regional cerebral blood flow response to vibrissal stimulation in mice lacking type I NOS gene expression. *Am. J. Physiol.* 270 (3 Pt 2), H1085–1090.

Ma, Z., Siebert, A.P., Cheung, K.H., Lee, R.J., Johnson, B., Cohenb, A.S., Vingtdeux, V., Marambaud, P. y Foscett, J.K. (2012). Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) is the pore-forming subunit of an ion channel that mediates extracellular Ca^{2+} regulation of neuronal excitability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, E1963–E1971.

Ma, Z., Tanis, J.E., Taruno, A. y Foscett, J.K. (2016). Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels. *Eur. J. Physiol.* 468, 395–403.

MacVicar, B.A y Newman, E.A. (2005). Astrocyte Regulation of Blood Flow in the Brain. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 7 (5), 1-15.

Martínez-Ruiz, A., Araújo, I.M., Izquierdo-Álvarez, A., Hernansanz-Agustín, Lamas, S. y Serrador, J.M. (2013). Specificity in S-Nitrosylation: A Short-Range Mechanism for NO Signaling?. *Antioxid. Redox Signal.* 19 (11), 1220–1235.

Meldrum, B.S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nut.* 130, 1007S-15S.

Metea, M. y Newman, E.A. (2006). Calcium Signaling in Specialized Glial Cells. *Glia.* 54, 650-655.

Moncada, S., Higgs, A. y Furchgott, R. (1997). International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol. Rev.* 49 (2), 137-42.

Nagy, J.I., Patel, D., Ochalski, P.A. y Stelmack, G.L. (1999). Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 88, 447–468.

Nagy, J.I. y Rash, J.E. (2000). Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res. Rev.* 32, 29–44.

Nakase, T., Söhl, G., Theis, M., Willecke, K. y Naus, C.C. (2004). Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. *Am. J. Pathol.* 164, 2067–2075.

Nakahata, K., Kinoshita, H., Hama-Tomioka, K., Ishida, Y., Matsuda, N., Hatakeyama, N., Haba, M., Kondo, T. y Hatano, Y. (2008). Cholinesterase Inhibitor Donepezil Dilates Cerebral Parenchymal Arterioles via the Activation of Neuronal. *Anesthesiology.* 109, 124–129.

Naus, C.C., Bechberger, J.F., Zhang, Y., Venance, L., Yamasaki, H., Juneja, S.C., Kidder, G.M. y Giaume, C. (1997). Altered gap junctional communication, intercellular signaling, and growth in cultured astrocytes deficient in connexin43. *J. Neurosci. Res.* 49, 528–540

Navarrete, M., Perea, G., Maglio, L. Pastor, J., García de Sola, R. y Araque, A. (2013). Astrocyte Calcium Signal and Gliotransmission in Human Brain Tissue. *Cereb. Cortex.* 23 (5), 1240-1246.

Orellana, J.A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J.X., Bennett, M.V., Naus, C.C., Giaume, C. y Sáez, J.C. (2011). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J. Neurochem.* 118 (5), 826-840.

Orellana, J.A., Martínez, A.D. y Retamal, M.A. (2013). Gap junction channels and hemichannels in the CNS: Regulation by signaling molecules. *Neuropharmacology*. 75, 567-582.

Otsu, Y., Couchman, K., Lyons, D.G., Collot, M., Agarwal, A., Mallet, J.M., Pfrieger, F.W., Bergles, D.E. y Chrapak, S. (2015). Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nat. Neurosci.* 18 (2), 210-218.

Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N. y Lukyanov, S. (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr. Biol.* 10, R473–R474.

Paspalas, C.D. y Papadopoulos, G.C. (1998) Ultrastructural evidence for combined action of noradrenaline and vasoactive intestinal polypeptide upon neurons, astrocytes, and blood vessels of the rat cerebral cortex. *Brain Res. Bull.* 45, 247-259.

Pelligrino, D.A., Vetri, F. y Xu, H.L. (2011). Purinergic mechanisms in gliovascular coupling. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 22 (2), 229–236.

Penuela, S., Gehi, R. y Laird, D.W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim. Biophys. Acta.* 1828, 15-22.

Penuela, S., Simek, J. y Thompson, R.J. (2014). Regulation of pannexin channels by post-translational modifications. *FEBS Letter.* 588 (8), 1411-1415.

Perea, G. y Araque, A. (2005). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci.* 25, 2192-2203.

Peters, A., Josephson, K. y Vincent, S.L. (1991). Effects of aging on the neuroglial cells and pericytes within area 17 of the rhesus monkey cerebral cortex. *Anat. Rec.* 229, 384-398.

Petzold, G.C. y Murthy, V.N. (2011). Role of astrocytes in neurovascular coupling *Neuron* 71 (5), 782-797.

Pogoda, K., Kameritsch, P., Retamal, M.A. y Vega, J.L. (2016). Regulation of gap junction channels and hemichannels by phosphorylation and redox changes: a revision. *BMC. Cell. Biol.* 24 (17), 138-150.

Porter, J.T. y McCarthy, K.D. (1995a) Adenosine receptors modulate $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal astrocytes in situ. *J. Neurochem.* 65, 1515-1523.

Porter, J.T. y McCarthy, K.D. (1995b). GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in $[Ca^{2+}]_i$. *Glia.* 13, 101-112.

Porter, J.T. y McCarthy, K.D. (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* 16, 5073-5081.

Rapoport, R.M., Draznin, M.B. y Murad, F. (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*. 306, 174–176.

Retamal, M.A, Cortés, S.J., Reuss, L., Bennett, M.V.L. y Sáez, J.C. (2006). S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: Induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *PNAS*. 103 (12), 4475–4480.

Ricci, G., Volpi, L., Pasquali, L., Petrozzi, L. y Siciliano G. (2009) Astrocyte–neuron interactions in neurological disorders. *J. Biol Phys.* 35, 317–336.

Rouach, N., Glowinski, J. y Giaume, C. (2000). Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J. Cell. Biol.* 149, 1513–1526.

Rouach, N., Avignone, E., Mème, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F. y Giaume, C. (2002). Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol. Cell*. 94, 457–475.

Roy, C.S. y Sherrington, C.S. (1890). On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J. Physiol.* 11, 85-108.

Sáez, J.C., Berthoud, V.M., Brañes, M.C., Martínez, A.D. y Beyer, E.C. (2003). Plasma Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. *Physiol. Rev.* 83, 1359-1400.

Sáez, T.E., Pehar, M., Vargas, M., Barbeito, L. y Maccioni, R.B. (2004). Astrocytic Nitric Oxide Triggers Tau Hyperphosphorylation in Hippocampal Neuron. *In vivo*. 18, 275-280.

Saha, R.N. y Pahan, K. (2006). Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochem. Int.* 49, 154–163.

Scemes, E. y Giaume, C. (2006). Astrocyte Calcium Waves: What They Are and What They Do. *Glia*. 54 (7), 716–725.

Scemes, E. y Spray, D.C. (2012). Extracellular K⁺ and Astrocyte Signaling via Connexin and Pannexin Channels. *Neurochem. Res.* 37 (11), 2310–2316.

Schipke, C.G. y Kettenmann H. (2004). Astrocyte Responses to Neuronal Activity. *Glia*. 47, 226–232.

Shelton, M.K. y McCarthy, K.D. (2000) Hippocampal astrocytes exhibit Ca²⁺-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *J. Neurochem.* 74, 555-563.

Siebert, A.P., Ma, Z., Grevet, J.D., Demuro, A., Parker, I. y Foskett, J.K. (2013) Structural and Functional Similarities of Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) Ion Channel with Connexins, Pannexins, and Innexins. *J. Biochem.* 288 (9), 6140-6153.

Šimic, G., Lucassen, P. J., Krsnik, Z., Krušlin, B., Kostovic, I., Winblad, B. y Bogdanovic, N. (2000). nNOS Expression in Reactive Astrocytes Correlates with Increased Cell Death Related DNA Damage in the Hippocampus and Entorhinal Cortex in Alzheimer's Disease. *Exp. Neurol.* 165, 12–26.

Sofroniew, M.V. y Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropath.* 119, 7-35.

Söhl, G. y Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* 62, 228-232.

Solan, J.L. y Lampe, P.D. (2009). Connexin 43 phosphorylation – structural changes and biological effects. *Biochem. J.* 419 (2), 261–272.

Spray, D.C., Ye, Z.C. y Ransom, B.R. (2006). Functional connexin “hemichannels”: a critical appraisal. *Glia.* 54, 758–773.

Stehberg J., Moraga-Amaro R., Salazar C., Becerra A., Echeverría C., Orellana J.A., Bultynck, G., Ponsaerts, R., Leybaert, L., Simon, F., Sáez, J.C. y Retamal M.A. (2012). Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *FASEB J.* 26 (9), 3649-3657.

Stobart, J.L., Lu, L., Anderson, H.D.I., Mori, H. y Anderson, C.M. (2013). Astrocyte-induced cortical vasodilation is mediated by D-serine and endothelial nitric oxide synthase. *PNAS.* 110 (8), 3149-3154.

Stout, C.E., Constatin, J.L., Naus, C.C.G. y Charles, A.C. (2002). Intercellular Calcium Signaling in Astrocytes via ATP Release through Connexin Hemichannels. *J. Biol. Chem.* 277 (12), 10482-10488.

Straub, A.C., Billaud, M., Johnstone, S.R., Best, A.K., Yemen, S., Dwyer, S.T., Looft-Wilson, R., Lysiak, J.J., Gaston, B., Palmer, L. e Isakson, B.E. (2011). Compartmentalized Connexin 43 S-Nitrosylation/ Denitrosylation Regulates Heterocellular Communication in the Vessel Wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 399-407.

Stuehr, D. (1999). Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411, 217-230.

Suadicani, S.O., Flores, C.E., Urban-Maldonado, M., Beelitz, M. y Scemes, E. (2004). Gap junction channels coordinate the propagation of intercellular Ca²⁺ signals generated by P2Y receptor activation. *Glia.* 48, 217-229.

Suadicani, S.O., Iglesias R., Wang J., Dahl G., Spray D.C., Scemes E. (2012). ATP Signaling Is Deficiente in Cultured Pannexin1-Null Mouse Astrocytes. *Glia.* 60: 1106-1116.

Taruno, A., Vingtdeux, V., Ohmoto, M., Ma, Z., Dvoryanchikov, G., Li, A., Adrien, L., Zhao, H., Leung, S., Abernethy, M., Koppel, J., Davies, P., Civan, M.M., Chaudhari, N., Matsumoto, I., Hellekant, G., Tordoff, M.G., Marambaud, P. y Foskett, J.K. (2013a). CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature*. 495 (7440), 223-226.

Taruno, A., Matsumoto, I., Ma, Z., Marambaud, P. y Foskett, J.K. (2013b). How do taste cells lacking synapses mediate neurotransmission? CALHM1, a voltage-gated ATP channel. *BioEssays*. 35 (12), 1111-1118.

Taylor, K.A., Wright, J.R. y Mahaut-Smith, M.P. (2015). Regulation of Pannexin-1 channel activity. *Biochem. Soc. Trans.* 43 (3), 502-507.

Theis, M., Jauch, R., Zhuo, L., Speidel, D., Wallraff, A., Döring, B., Frisch, C., Söhl, G., Teubner, B., Euwens, C., Huston, J., Steinhäuser, C., Messing, A., Heinemann, U. y Willecke, K. (2003). Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J. Neurosci.* 23, 766 –776.

Theis, M. y Giaume, C. (2012). Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res.* 1487, 88-98.

Thompson, R.J. y MacVicar, B.A. (2008). Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels* (2) 2, 81-86.

Tong, X., Lopez, W., Ramachandran, J., Ayad, W. A., Liu, Y., Lopez-Rodriguez, A., Harris, A.L. y Contreras, J. E. (2015). Glutathione release through connexin hemichannels: Implications for chemical modification of pores permeable to large molecules. *The Journal of General Physiology* 146 (3), 245-254.

Vesce, S., Bezzi, P. y Volterra A. (1999a). The active role of astrocytes in synaptic transmission. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 991-1000.

Vesce, S., Bezzi, P. y Volterra, A. (1999b). The highly integrated dialogue between neurons and astrocytes in brain function. *Sci. Prog.* 82 (Pt 3), 251-270.

Vetri, F., Xu, H., Mao, L., Paisansathan, C. y Pelligrino, D.A. (2011). ATP hydrolysis pathways and their contributions to pial arteriolar dilation in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H1369–H1377.

Volterra, A. y Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (8), 626-640.

Wallraff, A., Köhling, R., Heinemann, U., Theis, M., Willecke, K. y Steinhäuser, C. (2006) The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 5438 –5447.

Wang, Y. y Marsden, P.A. (1995). Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 4 (1), 12-22.

Wei, H., Deng, F., Chen, Y., Qin, Y., Hao, Y. y Guo, X. (2014). Ultrafine carbon black induces glutamate and ATP release by activating connexin and pannexin hemichannels in cultured astrocytes. *Toxicology.* 323, 32-41.

Wells, J.A., Christie, I.N., Hosford, P.S., Huckstepp, R.T., Angelova, P.R., Vihko, P. Cork, S.C., Abramov, A.Y., Teschemacher, A.G., Kasparov, S., Lythgoe, M.F. y Gourine, A.V. (2015). A critical role for purinergic signalling in the mechanisms underlying generation of BOLD fMRI responses. *J. Neurosci.* 35 (13), 5284-5292.

Xu, H.L., Koenig, H.M., Ye, S., Feinstein, D.L. y Pelligrino, D.A. (2004). Influence of the glial limitans on pial arteriolar relaxation in the rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 287, H331-H339.

Xu, H.L., Ye, S: Baughman, V.L., Feinstein, D.L. y Pelligrino, D.A. (2005). The role of the glia limitans in ADP-induced pial arteriolar relaxation in intact and ovariectomized female rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H382-H388.

Xu, H.L. y Pelligrino, D.A. (2007). ATP release and hydrolysis contribute to rat pial arteriolar dilatation elicited by neuronal activation. *Exp. Physiol.* 92 (4), 647-651.

Xu, H.L., Mao, L., Ye, S., Paisansathan, C., Vetri, F. y Pelligrino, D.A. (2008). Astrocytes are a key conduit for upstream signaling of vasodilation during cerebral cortical neuronal activation in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H622-H632.

Xue, Q., Liu, Y., Qi, H., Ma, Q., Xu, L., Chen, W., Chen, G. y Xu, X. (2013). A novel Brain Neurovascular Unit Model with Neurons, Astrocytes and Microvascular Endothelial Cells of Rat. *Int. J. Biol. Sci.* 9 (2), 174-189.

Yen, M.R. y Saier Jr, M.H. (2007). Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 94, 5-14.

Zhang, L., Deng, T., Sun, Y., Liu, K., Yang, Y. y Zheng, X. (2008). Role for nitric oxide in permeability of hippocampal neuronal hemichannels during oxygen glucose deprivation. *J. Neurosci. Res.* 86 (10), 2281-2291.

Zheng, Y., Pan, Y., Harris, S., Billings, S., Coca, D., Berwick, J., Jones, M., Kennerley, A., Johnston, D., Martin, C., Devonshire, I.M. y Mayhew, J. (2010). A dynamic model of neurovascular coupling: Implications for blood vessel dilation and constriction. *NeuroImage.* 52, 1135-1147.

Zlokovic, B.V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev.* 12, 723-738.

Zonta, M. y Carmignoto, G. (2002). Calcium oscillations encoding neuron-to-astrocyte communication. *J. Physiol.* 96 (3–4), 193–198.

Zonta M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.A., Pozzan, T. y Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* 6, 43-50.

APÉNDICE (PAPERS DE LA TESIS)



Control of the neurovascular coupling by nitric oxide-dependent regulation of astrocytic Ca^{2+} signaling

Manuel F. Muñoz, Mariela Puebla and Xavier F. Figueroa *

Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Fisiología, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

Edited by:

Luc Leybaert, Ghent University, Belgium

Reviewed by:

Erlend Arnulf Nagelhus, University of Oslo, Norway

Ping Liu, University of Connecticut Health Center, USA

*Correspondence:

Xavier F. Figueroa, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Fisiología, Pontificia Universidad Católica de Chile, Portugal 49, Santiago 8331010, Chile
e-mail: xfigueroa@bio.puc.cl

Neuronal activity must be tightly coordinated with blood flow to keep proper brain function, which is achieved by a mechanism known as neurovascular coupling. Then, an increase in synaptic activity leads to a dilation of local parenchymal arterioles that matches the enhanced metabolic demand. Neurovascular coupling is orchestrated by astrocytes. These glial cells are located between neurons and the microvasculature, with the astrocytic endfeet ensheathing the vessels, which allows fine intercellular communication. The neurotransmitters released during neuronal activity reach astrocytic receptors and trigger a Ca^{2+} signaling that propagates to the endfeet, activating the release of vasoactive factors and arteriolar dilation. The astrocyte Ca^{2+} signaling is coordinated by gap junction channels and hemichannels formed by connexins (Cx43 and Cx30) and channels formed by pannexins (Panx-1). The neuronal activity-initiated Ca^{2+} waves are propagated among neighboring astrocytes directly via gap junctions or through ATP release via connexin hemichannels or pannexin channels. In addition, Ca^{2+} entry via connexin hemichannels or pannexin channels may participate in the regulation of the astrocyte signaling-mediated neurovascular coupling. Interestingly, nitric oxide (NO) can activate connexin hemichannel by S-nitrosylation and the Ca^{2+} -dependent NO-synthesizing enzymes endothelial NO synthase (eNOS) and neuronal NOS (nNOS) are expressed in astrocytes. Therefore, the astrocytic Ca^{2+} signaling triggered in neurovascular coupling may activate NO production, which, in turn, may lead to Ca^{2+} influx through hemichannel activation. Furthermore, NO release from the hemichannels located at astrocytic endfeet may contribute to the vasodilation of parenchymal arterioles. In this review, we discuss the mechanisms involved in the regulation of the astrocytic Ca^{2+} signaling that mediates neurovascular coupling, with a special emphasis in the possible participation of NO in this process.

Keywords: cerebral arterioles, cerebral blood flow, connexins, pannexins, gap junctions, endothelial nitric oxide synthase, neuronal nitric oxide synthase, TRPV4 channels

INTRODUCTION

Information processing by the neuronal network in the central nervous system (CNS) is a very complex task that relies on dynamic interactions between neurons and glial cells, but also on functional association among brain cells and cerebral microcirculation, which is intended to be reflected by the concept “neurovascular unit” (Koehler et al., 2006; Abbott et al., 2010; Muoio et al., 2014). The coordination of neuronal and vascular function is essential to maintain cerebral activity because the nervous tissue has a very high metabolic rate that depends on the appropriate blood supply (Rolfe and Brown, 1997). Then, changes in neuronal activity must be paralleled by proportional and timely variations in blood flow to thereby match the metabolic demand. This is achieved by a communication mechanism that links neuronal and vascular function, which is known as neurovascular coupling (Iadecola, 2004; Hawkins and Davis, 2005; Leybaert, 2005; Koehler et al., 2006). In this context, an increment in synaptic activity rapidly leads to vasodilation of

local parenchymal arterioles and, consequently, to an increase in blood-borne energy substrate that satisfies the enhanced metabolic demand (Anderson and Nedergaard, 2003; Iadecola, 2004; Leybaert, 2005).

Although neurovascular coupling may be simply explained by the release of vasoactive signals from neurons, this signaling process is much more complex and astrocytes have emerged as central players in the communication of the changes in synaptic activity to local parenchymal arterioles (Anderson and Nedergaard, 2003; Koehler et al., 2006; Filosa and Iddings, 2013). Astrocytes are multifunctional cells that play a critical role in the maintenance of cerebral homeostasis and are in a strategic position to mediate and coordinate neurovascular coupling, since they are located between neurons and the microvasculature (Anderson and Nedergaard, 2003; Zonta et al., 2003a; Koehler et al., 2006; Filosa and Iddings, 2013; **Figure 1**). In this context, astrocytes project processes that surround neuronal synapses and express functional receptors for several neurotransmitters,

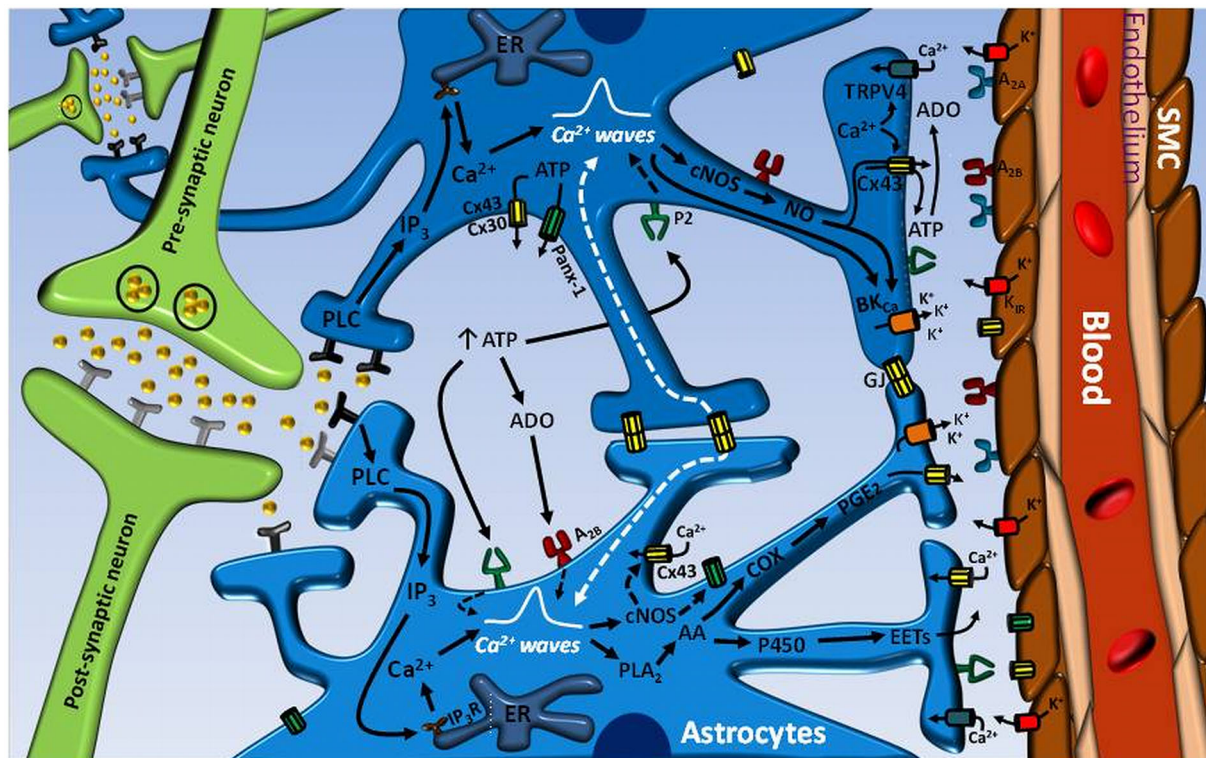


FIGURE 1 | Astrocyte-mediated signaling mechanisms involved in the control of neurovascular coupling. Neurotransmitters released during an increase in neuronal activity can exit the synaptic cleft and activate receptors on astrocyte processes. The stimulation of astrocyte receptors initiates an inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP_3) receptor (IP_3R)-mediated Ca^{2+} signal that is propagated through the astrocytic processes into the endfeet and activates the phospholipase A_2 (PLA_2)–arachidonic acid (AA) pathway and large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (BK_{Ca}). In turn, the activation PLA_2 –AA pathway leads to cytochrome P450 epoxygenase (P450)-mediated epoxyeicosatrienoic acids (EETs) production and cyclooxygenase (COX)-dependent prostaglandin E_2 (PGE_2) formation. Consequently, EETs and PGE_2 release and BK_{Ca} channel opening evoke the vasodilation of parenchymal arterioles. The astrocyte-mediated vasodilator signal may be coordinated by the propagation of an inter-astrocyte Ca^{2+} signal via ATP release-mediated purinergic receptor (P_2) stimulation or directly by gap

junction communication (GJ). ATP may be released by either Cx30- or Cx43-based hemichannels or pannexin-1 (Panx-1)-formed channels. The hydrolysis of ATP to adenosine (ADO) by ecto-ATPases may also contribute to enhance and coordinate the Ca^{2+} signal through A_{2B} receptor activation on astrocytes. ADO formation from Cx43 hemichannel-driven ATP release at the endfeet may participate in the vasodilator response by the stimulation of A_{2A} receptors on vascular smooth muscle cells (SMC) of parenchymal arterioles. The astrocytic Ca^{2+} signal may also activates nitric oxide (NO) production by both Ca^{2+} -dependent constitutive NO synthases (cNOS), eNOS and nNOS, which may play an important role in the regulation of neurovascular coupling by the activation of Cx43 hemichannels and BK_{Ca} channels. It is noteworthy that Cx43 hemichannel opening may contribute to the Ca^{2+} signal by providing a pathway for Ca^{2+} influx and, in addition, may participate in the astrocytic vasodilator mechanisms by allowing the efficient release of PGE_2 and NO.

which provides to these cells with a fine mechanism to sense neuronal activity (Porter and McCarthy, 1997; Zonta et al., 2003a; Koehler et al., 2006; Takano et al., 2006). Additionally, the astrocytic endfeet of the same astrocytes are found in an intimate, tight spatial organization with parenchymal vessels, where the endfeet reach to close proximity of the microvasculature and encase the vessel wall (Figure 1), which allows a fine and efficient communication between astrocytes and vascular cells (Anderson and Nedergaard, 2003; Iadecola, 2004; Koehler et al., 2006). This cellular spatial organization determines the basic signaling substrate for regulation of neurovascular coupling in which stimulation of receptors located at astrocyte processes by neurotransmitters released during an increase in neuronal activity initiates a Ca^{2+} signal that propagates through the astrocytic processes into the endfeet (Zonta et al., 2003a; Filosa et al., 2004; Koehler et al., 2006; Straub et al., 2006; Straub and

Nelson, 2007). The generation of an astrocytic endfoot Ca^{2+} signal leads to the release of vasoactive factors that, in turn, evoke the arteriolar dilation required to produce an increase in local blood flow proportional to the increment in synaptic activity (Zonta et al., 2003a; Koehler et al., 2006; Takano et al., 2006; Straub and Nelson, 2007). Consistent with the astrocytic Ca^{2+} signaling-dependent control of arteriolar vasomotor tone, the increase in astrocytic endfoot cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) precedes vasodilation of cerebral arterioles (Straub et al., 2006; Straub and Nelson, 2007; Filosa and Iddings, 2013).

Several Ca^{2+} -dependent vasodilator mechanisms have been proposed to be activated at the astrocytic endfeet facing the arteriolar vessel wall. The most recognized vasodilator signals released from astrocytic endfeet are epoxyeicosatrienoic acid (EETs) and prostaglandin E_2 (PGE_2), which are synthesized

by the cytochrome P450 epoxygenase and by a cyclooxygenase enzyme-dependent pathway, respectively (**Figure 1**), from the initial Ca^{2+} -dependent arachidonic acid formation (Anderson and Nedergaard, 2003; Zonta et al., 2003a,b; Koehler et al., 2006; Straub and Nelson, 2007). Nevertheless, it must be noted that the release of arachidonic acid by astrocytes has been shown to lead to vasoconstriction through the production of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in the arteriolar smooth muscle cells (Mulligan and MacVicar, 2004; Metea and Newman, 2006). This apparent controversy in the vascular response triggered by astrocytic Ca^{2+} signals (vasodilation vs. vasoconstriction) has been addressed in further studies. Girouard et al. (2010) show in mouse cortical brain slices that changes in the concentration of K^+ ions in the space found between astrocytic endfoot and vessel wall may control the arteriolar vasomotor tone in a bimodal manner (i.e., generating vasodilation or vasoconstriction). Astrocytic endfeet express Ca^{2+} -activated K^+ channels of large conductance (BK_{Ca}) and vascular smooth muscle cells of the parenchymal arterioles express inward rectifier K^+ channels (K_{ir}) (Price et al., 2002; Filosa et al., 2006; Girouard et al., 2010). Then, the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generated in the endfeet during the neurovascular coupling triggers the opening of BK_{Ca} , which leads to the release of K^+ ion into the perivascular space, producing an increase in the local extracellular K^+ concentration proportional to the magnitude of the Ca^{2+} signal that triggers the BK_{Ca} activation. Thereby, an increase in the perivascular K^+ concentration smaller than 20 mM activates the K_{ir} channels located in the smooth muscle cell membrane facing the endfeet (Filosa et al., 2006; Girouard et al., 2010; **Figure 1**), leading to smooth muscle hyperpolarization, and consequently, vasodilation (Girouard et al., 2010). However, higher increases in extracellular K^+ concentration (>20 mM) eliminates the electrochemical gradient of K^+ and produces smooth muscle cell depolarization and vasoconstriction (Girouard et al., 2010). In addition, the direction of the vasomotor response initiated by the astrocytic endfoot Ca^{2+} signal has also been proposed to depend on the metabolic state of the tissue, which was evaluated by changing the oxygen tension in the superfusion solution of the experimental preparation. In this context, when hippocampal–neocortical slices were superfused with an artificial cerebrospinal fluid equilibrated with 95% O_2 , the response associated to the increase in astrocytic Ca^{2+} was vasoconstriction, but, in contrast, a vasodilation was activated in the presence of 20% O_2 (Gordon et al., 2008; Attwell et al., 2010).

ASTROCYTIC Ca^{2+} SIGNALING IN NEUROVASCULAR COUPLING

The activation of Ca^{2+} oscillations is a central signaling mechanism for astrocyte function and for transducing neuronal activity into vasodilation of parenchymal arterioles (Zonta et al., 2003a; Filosa et al., 2004; Straub et al., 2006; Straub and Nelson, 2007; Filosa and Iddings, 2013). The most relevant neuronal signal that triggers an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in neurovascular coupling is the activation of metabotropic glutamate receptors located on astrocyte projections associated with glutamatergic synapses (Zonta et al., 2003a; Straub and Nelson, 2007; Filosa and Iddings, 2013). However, it should be noted that other

neurotransmitters such as ACh, ATP and GABA or the release of neuropeptides such as somatostatin and vasoactive intestinal peptide from interneurons can also evoke the initiation of a Ca^{2+} signal in astrocytes (Stout et al., 2002; Li et al., 2003; Koehler et al., 2006; Straub et al., 2006). The synaptic activity-dependent activation of an astrocytic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is propagated as a Ca^{2+} wave along the perisynaptic astrocytic processes through the astrocyte to finally reach the perivascular endfeet (Zonta et al., 2003a; Filosa et al., 2004; Straub et al., 2006). The, apparently, most important and well-described mechanism involved in this Ca^{2+} signal is the activation of a phospholipase C (PLC)-dependent pathway, with the consequent generation of inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP_3) from membrane phospholipids, and then, the stimulation of Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER) via IP_3 receptors (IP_3R ; Parri and Crunelli, 2003; Straub et al., 2006; Straub and Nelson, 2007; Filosa and Iddings, 2013; **Figure 1**). However, PLC signaling also leads to diacylglycerol formation and protein kinase C (PKC) activation, which may also be involved in the modulation of Ca^{2+} oscillations as a negative feedback mechanism, since inhibition of PKC results in spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases in slices of ventrobasal thalamus in resting conditions (Parri and Crunelli, 2003). Although Ca^{2+} release via ryanodine receptors was shown to contribute to the generation of astrocytic Ca^{2+} signals in cultured astrocytes (Golovina and Blaustein, 1997, 2000), the inhibition or activation of these receptors using ryanodine or caffeine, respectively, did not affect the characteristics of endfoot Ca^{2+} signals observed in native astrocytes in cortical slices (Straub et al., 2006).

Consistent with the participation of IP_3R in the propagation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases into the astrocytic endfeet, spatially restricted photorelease of IP_3 from caged IP_3 within endfeet initiates a Ca^{2+} signal with similar characteristics to those observed in response to neuronal activation by electric field stimulation (Straub et al., 2006). Furthermore, the astrocytic endfoot $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase observed in both cases, IP_3 uncaging and neuronal activation, was markedly blunted after the intracellular Ca^{2+} stores were depleted using cyclopiazonic acid (CPA), a blocker of the sarcoplasmic/ER Ca^{2+} ATPase (SERCA; Straub et al., 2006). Interestingly, Ca^{2+} signals initiated by photorelease of IP_3 did not spread back to the cell body, but, as expected, this increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was associated with the initiation of a vasodilator response in the adjacent arteriole, suggesting that each endfoot works as a vasodilator unit in which the regenerative Ca^{2+} signaling machinery is spatially organized to direct the propagation of the Ca^{2+} oscillations in function of the activation of the Ca^{2+} -dependent vasoactive signaling (Straub et al., 2006; Straub and Nelson, 2007). In addition, the intensity of the IP_3R -generated Ca^{2+} signals associated to neuronal activation were heterogeneous throughout of the processes and endfeet, with spatially restricted regions of elevated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Straub et al., 2006), which indicate that the generation of Ca^{2+} signals is a dynamic process with specialized points of amplification along the perivascular projections that may be associated with the activation of vasodilator signaling pathways during neurovascular coupling. Although these data confirm that IP_3Rs play a central role in the generation and propagation

of Ca^{2+} oscillations, it is important to note; however, that inhibition of IP_3Rs with xestospongin only attenuates the Ca^{2+} signals generated in response to neuronal activation by electrical field stimulation in brain slices (Straub et al., 2006), and then, an additional mechanism may be involved in the response.

In addition to IP_3R , astrocytic endfeet also express plasma membrane cation channels of the transient receptor potential vanilloid (TRPV) family (Nilius and Voets, 2005; Pedersen et al., 2005), specifically, the TRPV4 subtype (Benfenati et al., 2007) and Dunn et al. (2013) recently showed that stimulation of these channels with the agonist GSK1016790A increases the amplitude and frequency of spontaneous Ca^{2+} oscillations observed in cortical astrocytic endfeet of mouse coronal brain slices, which was associated with vasodilation of parenchymal arterioles. As expected, this response was absent in the presence of the TRPV4 antagonist HC-067047 or in TRPV4 knockout mice (Dunn et al., 2013). As IP_3R in the ER membranes are activated by Ca^{2+} , it is thought that propagation of Ca^{2+} waves is supported by a mechanism of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release via IP_3Rs in the ER membranes (Li et al., 2003; Parri and Crunelli, 2003; Straub et al., 2006), which seems to be enhanced through Ca^{2+} entry via TRPV4 channels (Dunn et al., 2013). Consistent with this notion, treatment with CPA reduced the amplitude, frequency and propagation distance of the GSK1016790A-induced endfoot Ca^{2+} oscillations observed in brain slices. The participation of IP_3Rs in the effect of CPA was confirmed using xestospongin (Dunn et al., 2013). In addition, inhibition of TRPV4 channels with HC-067047 resulted in a reduction of the rise in endfoot $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the dilation of the associated parenchymal arteriole evoked by electrical field stimulation of brain slices from wild type animals, but not from TRPV4 knockout mice (Dunn et al., 2013). Interestingly, these results were confirmed in the intact animal through the evaluation of the cerebral hemodynamic response *in vivo* by measuring cerebral blood flow in the mouse somatosensory cortex using laser Doppler flowmetry in a cranial window. Although TRPV4 inhibition did not alter resting cerebral vascular function in this model, the evaluation of neurovascular coupling resulted in a reduction in the increase in cerebral blood flow observed in response to contralateral whisker stimulation (Dunn et al., 2013). These results indicate that TRPV4 channels are involved in the fine regulation of neurovascular coupling likely by interacting with the IP_3R -mediated Ca^{2+} signals in the astrocyte endfeet.

CONNEXINS AND PANNEIXINS IN NEUROVASCULAR COUPLING

An individual astrocyte connects multiple neuronal synapses with surrounding vessels and, conversely, an increase in neuronal activity is sensed by many astrocytes. Then, a single astrocyte must integrate the information of several neurons, but, in turn, the astrocyte-mediated neurovascular signaling must be coordinated between all astrocytes involved in the response to efficiently translate enhanced synaptic activity into higher blood flow to the whole brain region in which increased the metabolism (Araque et al., 1999; Haydon and Carmignoto, 2006). This tight and precise coordination of the astrocyte

Ca^{2+} signaling generated by neuronal activation seems to be achieved, in great part, through connexin (Cxs)-mediated intercellular communication (Simard et al., 2003; Orellana et al., 2011).

Connexins belong to the protein family that forms the intercellular channels known as gap junctions, which communicate directly the cytoplasm of two neighboring cells, allowing intercellular transfer of current and solutes smaller than 1.4 nm of diameter (Perkins et al., 1998; Unger et al., 1999), such as ions and second messengers (e.g., Ca^{2+} and IP_3) (Evans and Martin, 2002; Saez et al., 2003; Isakson et al., 2007). The association of six connexins makes up a hemichannel (i.e., half of gap junction channel) and head to head alignment of two hemichannels, each one provided by each adjacent cell, composes a gap junction channel (Saez et al., 2003). In addition to form gap junction channels, individual hemichannels are functional and provide a communication pathway between the intra and extracellular compartments, allowing influx of ions or release of paracrine/autocrine signals (Bruzzone et al., 2001; Stout et al., 2002; Goodenough and Paul, 2003; Cherian et al., 2005; Figueroa et al., 2013).

It has been described that astrocytes express several connexin isoforms, but Cx30 and Cx43 have been recognized as the most prominent connexins of these cells (Thompson and MacVicar, 2008; Ezan et al., 2012; Gaete et al., 2014). Although gap junctions provide a direct communication pathway for the propagation and coordination of Ca^{2+} signals between astrocytes (Simard et al., 2003; Orellana et al., 2011; Chandrasekhar and Bera, 2012), connexin hemichannels may also be involved in this process. Opening of Cx43-formed hemichannels is control by Ca^{2+} and these hemichannels are permeable to Ca^{2+} (De Bock et al., 2011, 2012; Chandrasekhar and Bera, 2012). Then, hemichannels may contribute to generate Ca^{2+} signals initiated by $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases as those observed in astrocytes in response to neuronal activation. In this context, Ca^{2+} oscillations activated by bradykinin in rat brain endothelial (RBE4) cells or Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells were sensitive to short-time application (<30 min) of the connexin blocking peptides $^{37,43}\text{Gap}27$ (a mimetic peptide of the second extracellular loop of Cx37 and Cx43) or $^{43}\text{Gap}26$ (a mimetic peptide of the first extracellular loop of Cx43), respectively (De Bock et al., 2011, 2012). This rapid effect of connexin mimetic peptides is consistent with hemichannel inhibition, because gap junction function is only disrupted by longer periods of treatment. In addition, in MDCK cells, bradykinin-induced Ca^{2+} oscillations were also inhibited after reducing the extracellular Ca^{2+} concentration, siRNA silencing of Cx43 or altering the carboxy-terminal-dependent Ca^{2+} -mediated regulation of Cx43 hemichannels by loading the cells with the peptide CT9 that correspond to the last 9 amino acids of the Cx43 carboxy-terminal (De Bock et al., 2012). As Ca^{2+} oscillations depend on IP_3R activation and hemichannel opening by photolytic release of Ca^{2+} did not triggered Ca^{2+} oscillations (De Bock et al., 2012); these results show that Cx43-formed hemichannels may contribute to the generation of IP_3R commanded Ca^{2+} signals, probably, by providing a pathway for Ca^{2+} stores refilling.

In addition, hemichannels formed by Cx30 and Cx43 have been described to be permeable to ATP (Stout et al., 2002; Kang et al., 2008; Sipos et al., 2009; Svenningsen et al., 2013) and ATP release has been shown to represent an important mechanism involved in the regenerative propagation of Ca^{2+} signals along the astrocyte processes and in the coordination of this signal between neighboring astrocytes (Stout et al., 2002; Orellana et al., 2011). Likewise Cx43 hemichannels, Cx30-based hemichannels may also be activated by Ca^{2+} , and then, the increase in astrocytic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ can lead to ATP release through Cx30 hemichannels or Cx43 hemichannels or both (**Figure 1**). The subsequent rise in extracellular ATP concentration can stimulate P2 purinergic receptors on either the same astrocyte from which it was released or on neighboring astrocytes (Simard et al., 2003; Suadicani et al., 2009; Orellana et al., 2011), which may contribute to enhance the Ca^{2+} wave propagation or to the intercellular coordination of the Ca^{2+} signaling, respectively. In addition of ATP release, the importance of connexins in neurovascular coupling is highlighted by the fact that Cx43 hemichannels were also found to mediate the release of PGE_2 (Cherian et al., 2005; **Figure 1**).

It is noteworthy that astrocytes express pannexin-1 (Panx-1), a member of a protein family (Panx-1, Panx-2 and Panx-3) that forms channels with similar characteristics of connexin hemichannels (Panchin et al., 2000; Bruzzone et al., 2003). Panx-1-formed channels are not thought to contribute to gap junction-like communication, but they have been found to mediate ATP release in astrocytes (Iglesias et al., 2009; Orellana et al., 2011; Suadicani et al., 2012). Although there is an increasing body of evidence supporting the release of ATP via connexin hemichannels and pannexin channels, it is important to note that astrocytes may also release ATP by Ca^{2+} -dependent exocytosis (Pryazhnikov and Khiroug, 2008). The relevance of ATP release in neurovascular coupling and the involvement of connexins, pannexins and exocytosis have not yet conclusively determined, but it is likely that, if these three mechanisms co-exist, they contribute to different phases of the response or are activated in distinct physiological conditions, which may provide fine regulation of ATP signaling in astrocytes.

Astrocytes and cerebral arterioles express adenosine receptors (Pilitsis and Kimelberg, 1998; Ngai et al., 2001) and ATP may rapidly be hydrolyzed to adenosine by extracellular ecto-ATPases (Xu and Pelligrino, 2007; Pelligrino et al., 2011; Vetri et al., 2011), which, in astrocytes, have been described to be located close to hemichannels (Joseph et al., 2003; Fields and Burnstock, 2006). Then, the ATP hydrolysis to adenosine may also contribute to the propagation and coordination of astrocyte-mediated Ca^{2+} signals and directly to the dilation of parenchymal arterioles in response to neuronal activation (**Figure 1**). Interestingly, activation of $\text{A}_{2\text{B}}$ receptors has been reported to elicit an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Pilitsis and Kimelberg, 1998) and potentiate the ATP-induced Ca^{2+} response in astrocytes (Jiménez et al., 1999; Alloisio et al., 2004). Consistent with the participation of these receptors in neurovascular coupling, $\text{A}_{2\text{B}}$ antagonists inhibit the increase in cerebral blood flow observed in response to whisker stimulation (Shi et al., 2008). In addition, adenosine derived from ATP released via connexin hemichannels located at astrocyte endfeet

(Simard et al., 2003) may evoke arteriolar dilation by direct stimulation of vascular smooth muscle $\text{A}_{2\text{A}}$ or $\text{A}_{2\text{B}}$ receptors (Ngai et al., 2001), which is coherent with the inhibition by $\text{A}_{2\text{A}}$ antagonists of the pial arteriolar dilation observed during sciatic nerve stimulation (Meno et al., 2001).

NITRIC OXIDE (NO) IN NEUROVASCULAR COUPLING

Nitric oxide (NO) is a widely distributed, pleiotropic signaling molecule synthesized by the enzyme NO synthase (NOS) from the amino acid L-arginine (Moncada et al., 1991). Three isoforms of NOS have been described: endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) and inducible NOS (iNOS; Moncada et al., 1991; Alderton et al., 2001). eNOS and nNOS are expressed constitutively primarily, but not exclusively, in endothelial cells and neurons, respectively, and the activation of these isoforms depends on an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Alderton et al., 2001). In contrast, the expression of iNOS is typically assumed to be induced by cytokines and others agents during the immune response and its activity does not depend on an increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Pautz et al., 2010). NO is a potent vasodilator (Moncada et al., 1991), which led to the proposal that neurovascular coupling is directly mediated by the Ca^{2+} -dependent NO production associated to the activation of cortical neurons. In fact, inhibition of NO production with N^{G} -nitro-L-arginine (L-NA, a general NOS inhibitor), deletion of nNOS and specific nNOS inhibition with 7-nitroindazole have been reported to attenuate the increase in sensory cortex cerebral blood flow observed in response to vibratory hindpaw stimulation in mouse (Kitauro et al., 2007) or transcallosal electrical stimulation *in vivo* in rat (Brožíčková and Otáhal, 2013). Although these data support the participation of nNOS in neurovascular coupling, they are not in disagreement with the critical role played by astrocytes in this response, because NO-synthesizing enzymes are not present in excitatory neurons of many brain regions (Iwase et al., 1998; Karagiannis et al., 2009; Tricoire et al., 2010) and astrocytes have been shown to express eNOS and nNOS (Gabbott and Bacon, 1996; Doyle and Slater, 1997; Shin, 2001; Lin et al., 2007). Additionally, astrocytes may also express low levels of iNOS, which has also been related with normal astrocyte function (Buskila et al., 2007). NO production by astrocytes has been proposed to participate in the regulation of neuronal activity (Buskila et al., 2007), astrocytic spontaneous Ca^{2+} transients (Schipke et al., 2008) and the astrocytic release of glutamate and ATP (Bal-Price et al., 2002; Ida et al., 2008).

It is well-known that the effects of NO are mediated by the activation of the soluble guanylate cyclase and the cGMP/PKG pathway, which has been considered as the “classical” mechanism of NO signaling (Moncada et al., 1991). Nevertheless, beside activation of soluble guanylate cyclase, S-nitrosylation (also termed as S-nitrosation) has emerged as an important “non-classical” mechanism of NO signaling (Ahern et al., 2002; Martínez-Ruiz et al., 2013). It is important to note that, in contrast to the activation of the cGMP/PKG pathway, the S-nitrosylation signaling mechanism is preferentially observed close to the NO source, where NO concentration is higher (Martínez-Ruiz et al., 2013). S-nitrosylation comprises NO-mediated oxidation of cysteine residues to form a nitrosothiol,

a post-translational modification that has been recognized to modulate the activity of several signaling proteins (Martínez-Ruiz et al., 2013). As a physiological signaling process, S-nitrosylation is transient and the nitroso group can be removed (i.e., denitrosylation) after the stimulation fades out (Martínez-Ruiz et al., 2013; Sengupta and Holmgren, 2013). Interestingly, connexin function is regulated by S-nitrosylation (Retamal et al., 2006). In astrocytes, Cx43 was found to be S-nitrosylated in response to metabolic inhibition, which was tightly related to opening of hemichannels formed by this connexin isoform (Retamal et al., 2006). This finding is coherent with the recent demonstration that NO opens hemichannels expressed in cultured astrocytes and in HeLa cells transfected with Cx37, Cx40 or Cx43 (Figueroa et al., 2013), which shows that, in addition of Cx43 hemichannels, NO also induces the activation of Cx37- and Cx40-based hemichannels. Interestingly, this work also demonstrated that NO crosses the plasma membrane preferentially through connexin hemichannels (Figueroa et al., 2013), at least, through those formed by Cx37, Cx40 or Cx43. On the other hand, the effect of NO on Panx-1-formed channels is controversial, since NO has been found to activate or inhibit these channels and in both cases S-nitrosylation was proposed to be involved (Zhang et al., 2008; Lohman et al., 2012).

The potential relevance of NO-induced connexin hemichannel activation in neurovascular coupling is highlighted by the contribution of NO to the ATP-elicited Ca^{2+} signal in astrocytes that described Li and collaborators (Li et al., 2003). These authors found that the release of Ca^{2+} from the intracellular stores initiated by ATP leads to the activation of a NO-dependent pathway of Ca^{2+} influx that plays an important role in the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the subsequent Ca^{2+} store refilling observed in this response. The NO-induced Ca^{2+} influx did not depend on the activation of cGMP production (Li et al., 2003), suggesting the involvement of S-nitrosylation. Interestingly, the Ca^{2+} influx activated by NO was sensitive to Cd^{2+} and 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB; Li et al., 2003). Although Cd^{2+} is thought to be a nonselective Ca^{2+} channel blocker and 2-APB is recognized as an IP_3R antagonist, both blockers have been shown to inhibit connexin hemichannels (Tao and Harris, 2007; Tang et al., 2009). Then, these results suggest that NO-dependent connexin hemichannel activation by S-nitrosylation may be involved, not only in ATP release, but also in the Ca^{2+} signaling evoked by ATP in astrocytes, and consequently, in the Ca^{2+} wave propagation observed in the neurovascular coupling (Figure 1), which is consistent with the recent report indicating that inhibition or deletion of eNOS blunted the astrocyte-mediated neurovascular coupling-dependent vasodilation (Stobart et al., 2013). Furthermore, as connexin hemichannels mediate the intercellular transfer of NO (Figueroa et al., 2013) and Cx43 is preferentially expressed in astrocytic endfeet (Simard et al., 2003), Cx43-formed hemichannels may contribute to the neuronal activation-induced vasodilation by directing the NO signaling toward pericyclic arterioles (Figure 1). In addition of connexins, NO signaling has also been shown to be involved in the control of TRPV4 and BK channel function. NO regulates negatively TRPV4 channels

by S-nitrosylation (Lee et al., 2011) and induces the opening of BK directly by S-nitrosylation or through the cGMP/PKG pathway (Bolotina et al., 1994; Tanaka et al., 2000), which suggests that NO may regulate the astrocytic Ca^{2+} signaling at different levels and contribute to the BK-mediated vasodilation (Figure 1).

Although opening and regulation of connexin hemichannels is not yet clear in the context of astrocyte function in normal physiological conditions, these data suggest that Ca^{2+} -mediated activation of NO production may be involved in the regulation of the astrocytic Ca^{2+} signal triggered in neurovascular coupling through activation of a Ca^{2+} influx or ATP release via Cx43-formed hemichannels. However, the involvement of connexin hemichannels or Panx-1 channels in the NO-dependent regulation of the neuronal activation-initiated Ca^{2+} and ATP signaling in astrocytes remains to be determined.

CONCLUDING REMARKS

Neurovascular coupling is a complex signaling mechanism that depends on functional and coordinated interactions of astrocyte with neurons and vascular cells. Changes in neuronal activity are transduced into vasomotor responses through astrocytic Ca^{2+} signals, which are activated by the neurotransmitters released at the synapsis, principally glutamate. The Ca^{2+} signal is propagated through the astrocytic processes to the endfeet by an IP_3R -dependent Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism and by autocrine ATP signaling via P_2 purinergic receptors or $\text{A}_{2\text{B}}$ adenosine receptors (after ATP hydrolysis by ecto-ATPases). ATP may be released through hemichannels formed by Cx30 or Cx43 and/or channels formed by Panx-1 and, in addition, activation of these channels provides a direct pathway for Ca^{2+} influx that may be involved in the regulation of the IP_3R -initiated astrocytic Ca^{2+} signal. However, although connexins and Panx-1 are likely to play a central role in the astrocyte-mediated neurovascular coupling, NO seems to control and orchestrate the development of the Ca^{2+} response, since NO production is activated by the initial IP_3R -mediated Ca^{2+} release and NO is involved in the generation, propagation and regulation of the Ca^{2+} signaling. This is because the increase in NO concentration leads to ATP release and activates a Ca^{2+} influx pathway that contributes to the astrocytic Ca^{2+} signal observed in response to both ATP or metabotropic glutamate receptor stimulation. The NO-evoked Ca^{2+} influx seems to be also involved in the regulation of the Ca^{2+} signaling by contributing to refill the IP_3R -associated intracellular Ca^{2+} store. Although the activation of Cx43 hemichannels by S-nitrosylation may provide the pathway for the NO-dependent ATP release and Ca^{2+} influx, the participation of connexin- or Panx-1 formed channels in the NO-dependent Ca^{2+} signals must be confirmed in future investigations.

The propagation of the neuronal-activated Ca^{2+} wave into the astrocyte endfeet is supported and regulated by specialized signaling mechanisms of these subcellular domains. Astrocyte endfeet express Cx43 hemichannels and TRPV4 channels and although the generation of the Ca^{2+} signal in the endfeet is governed by IP_3Rs , Ca^{2+} -dependent activation of Cx43

hemichannels and TRPV4 channels may contribute to enhance the Ca^{2+} signal at specialized microdomains associated with the activation of vasodilator mechanisms. Interestingly, diffusion or production of NO in the endfeet may be involved in the control of the Ca^{2+} signal by inducing the opening of Cx43 hemichannels and the inhibition of TRPV4 channels. Furthermore, the NO-mediated Cx43 hemichannel activation may also play an important role in the astrocyte endfoot-elicited vasodilation by providing the pathway for the release of NO and PGE_2 into the perivascular space. In addition of Cx43 hemichannels, NO may also induce the activation of BK channels at the astrocytic endfeet, which highlights the relevance of the interaction between NO and Ca^{2+} in the regulation of the astrocyte-dependent vasodilator signals activated during neurovascular coupling. The specific contribution of eNOS and nNOS to the astrocyte-conducted Ca^{2+} -mediated vasodilator signaling may be determined by the subcellular location and spatial organization of these NOS isoforms in relation to other signaling proteins involved in the regulation of neurovascular coupling. Then, the study of the subcellular distribution of eNOS and nNOS in astrocytes and the possible association of these NO-synthesizing enzymes with connexins, Panx-1, TRPV4 channels and BK channels may be an interesting and fruitful area of investigation that may help to understand the complex and dynamic regulation of neurovascular coupling.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant Puente 30/2014 from Vicerrectoría de Investigación y Doctorado—VRI de la Pontificia Universidad Católica de Chile and Grant Anillos ACT-140091 from the Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica—CONICYT.

REFERENCES

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., and Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13–25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Ahern, G. P., Klyachko, V. A., and Jackson, M. B. (2002). cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.* 25, 510–517. doi: 10.1016/s0166-2236(02)02254-3
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., and Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593–615. doi: 10.1042/0264-6021:3570593
- Alloisio, S., Cugnoli, C., Ferroni, S., and Nobile, M. (2004). Differential modulation of ATP-induced calcium signalling by A1 and A2 adenosine receptors in cultured cortical astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 141, 935–942. doi: 10.1038/sj.bjp.0705707
- Anderson, C. M., and Nedergaard, M. (2003). Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *Trends Neurosci.* 26, 340–344; author reply 344–345. doi: 10.1016/s0166-2236(03)00142-5
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., and Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215. doi: 10.1016/s0166-2236(98)01349-6
- Attwell, D., Buchan, A. M., Chrapak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B. A., and Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232–243. doi: 10.1038/nature09613
- Bal-Price, A., Moneer, Z., and Brown, G. C. (2002). Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia* 40, 312–323. doi: 10.1002/glia.10124
- Benfenati, V., Amiry-Moghaddam, M., Caprini, M., Mylonakou, M. N., Rapisarda, C., Ottersen, O. P., et al. (2007). Expression and functional characterization of transient receptor potential vanilloid-related channel 4 (TRPV4) in rat cortical astrocytes. *Neuroscience* 148, 876–892. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.06.039
- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J., and Cohen, R. A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368, 850–853. doi: 10.1038/368850a0
- Brožicková, C., and Otáhal, J. (2013). Effect of an inhibitor of neuronal nitric oxide synthase 7-nitroindazole on cerebral hemodynamic response and brain excitability in urethane-anesthetized rats. *Physiol. Res.* 62(Suppl. 1), S57–S66.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., and De Flora, A. (2001). Connexin 43 hemichannels mediate Ca^{2+} -regulated transmembrane NAD^{+} fluxes in intact cells. *FASEB J.* 15, 10–12. doi: 10.1096/fj.00-0566ffe
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., and Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 13644–13649. doi: 10.1073/pnas.2233464100
- Buskila, Y., Abu-Ghanem, Y., Levi, Y., Moran, A., Grauer, E., and Amitai, Y. (2007). Enhanced astrocytic nitric oxide production and neuronal modifications in the neocortex of a NOS2 mutant mouse. *PLoS One* 2:e843. doi: 10.1371/journal.pone.0000843
- Chandrasekhar, A., and Bera, A. K. (2012). Hemichannels: permeants and their effect on development, physiology and death. *Cell Biochem. Funct.* 30, 89–100. doi: 10.1002/cbf.2794
- Cherian, P. P., Siller-Jackson, A. J., Gu, S., Wang, X., Bonewald, L. F., Sprague, E., et al. (2005). Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol. Biol. Cell* 16, 3100–3106. doi: 10.1091/mbc.e04-10-0912
- De Bock, M., Culot, M., Wang, N., Bol, M., Decrock, E., De Vuyst, E., et al. (2011). Connexin channels provide a target to manipulate brain endothelial calcium dynamics and blood-brain barrier permeability. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 1942–1957. doi: 10.1038/jcbfm.2011.86
- De Bock, M., Wang, N., Bol, M., Decrock, E., Ponsaerts, R., Bultynck, G., et al. (2012). Connexin 43 hemichannels contribute to cytoplasmic Ca^{2+} oscillations by providing a bimodal Ca^{2+} -dependent Ca^{2+} entry pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 12250–12266. doi: 10.1074/jbc.M111.299610
- Doyle, C. A., and Slater, P. (1997). Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. *Neuroscience* 76, 387–395. doi: 10.1016/s0306-4522(96)00297-7
- Dunn, K. M., Hill-Eubanks, D. C., Liedtke, W. B., and Nelson, M. T. (2013). TRPV4 channels stimulate Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in astrocytic endfeet and amplify neurovascular coupling responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110, 6157–6162. doi: 10.1073/pnas.1216514110
- Evans, W. H., and Martin, P. E. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Mol. Membr. Biol.* 19, 121–136. doi: 10.1080/09687680210139839
- Ezan, P., André, P., Cisternino, S., Saubaméa, B., Boulay, A. C., Dautremer, S., et al. (2012). Deletion of astroglial connexins weakens the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1457–1467. doi: 10.1038/jcbfm.2012.45
- Fields, R. D., and Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 423–436. doi: 10.1038/nrn1928
- Figueroa, X. F., Lillo, M. A., Gaete, P. S., Riquelme, M. A., and Sáez, J. C. (2013). Diffusion of nitric oxide across cell membranes of the vascular wall requires specific connexin-based channels. *Neuropharmacology* 75, 471–478. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.02.022
- Filosa, J. A., Bonev, A. D., and Nelson, M. T. (2004). Calcium dynamics in cortical astrocytes and arterioles during neurovascular coupling. *Circ. Res.* 95, e73–e81. doi: 10.1161/01.res.0000148636.60732.2e
- Filosa, J. A., Bonev, A. D., Straub, S. V., Meredith, A. L., Wilkerson, M. K., Aldrich, R. W., et al. (2006). Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat. Neurosci.* 9, 1397–1403. doi: 10.1038/nn1779
- Filosa, J. A., and Iddings, J. A. (2013). Astrocyte regulation of cerebral vascular tone. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305, H609–H619. doi: 10.1152/ajpheart.00359.2013
- Gabbott, P. L., and Bacon, S. J. (1996). Localisation of NADPH diaphorase activity and NOS immunoreactivity in astroglia in normal adult rat brain. *Brain Res.* 714, 135–144. doi: 10.1016/0006-8993(95)01509-4
- Gaete, P. S., Lillo, M. A., and Figueroa, X. F. (2014). Functional role of connexins and pannexins in the interaction between vascular and nervous system. *J. Cell. Physiol.* 229, 1336–1345. doi: 10.1002/jcp.24563
- Girouard, H., Bonev, A. D., Hannah, R. M., Meredith, A., Aldrich, R. W., and Nelson, M. T. (2010). Astrocytic endfoot Ca^{2+} and BK channels determine both

- arteriolar dilation and constriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107, 3811–3816. doi: 10.1073/pnas.0914722107
- Golovina, V. A., and Blaustein, M. P. (1997). Spatially and functionally distinct Ca^{2+} stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science* 275, 1643–1648. doi: 10.1126/science.275.5306.1643
- Golovina, V. A., and Blaustein, M. P. (2000). Unloading and refilling of two classes of spatially resolved endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores in astrocytes. *Glia* 31, 15–28. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(200007)31:1<15::aid-glia20>3.0.co;2-h
- Goodenough, D. A., and Paul, D. L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 285–294. doi: 10.1038/nrm1072
- Gordon, G. R., Choi, H. B., Rungta, R. L., Ellis-Davies, G. C., and MacVicar, B. A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456, 745–749. doi: 10.1038/nature07525
- Hawkins, B. T., and Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 57, 173–185. doi: 10.1124/pr.57.2.4
- Haydon, P. G., and Carmignoto, G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol. Rev.* 86, 1009–1031. doi: 10.1152/physrev.00049.2005
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 347–360. doi: 10.1038/nrn1387
- Ida, T., Hara, M., Nakamura, Y., Kozaki, S., Tsunoda, S., and Ihara, H. (2008). Cytokine-induced enhancement of calcium-dependent glutamate release from astrocytes mediated by nitric oxide. *Neurosci. Lett.* 432, 232–236. doi: 10.1016/j.neulet.2007.12.047
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D. C., and Scemes, E. (2009). Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte “hemichannels”. *J. Neurosci.* 29, 7092–7097. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6062-08.2009
- Isakson, B. E., Ramos, S. I., and Duling, B. R. (2007). Ca^{2+} and inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling across the myoendothelial junction. *Circ. Res.* 100, 246–254. doi: 10.1161/01.res.0000257744.23795.93
- Iwase, K., Iyama, K., Akagi, K., Yano, S., Fukunaga, K., Miyamoto, E., et al. (1998). Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 53, 1–12. doi: 10.1016/s0169-328x(97)00139-3
- Jiménez, A. I., Castro, E., Mirabet, M., Franco, R., Delicado, E. G., and Miras-Portugal, M. T. (1999). Potentiation of ATP calcium responses by $\text{A}_{2\text{B}}$ receptor stimulation and other signals coupled to Gs proteins in type-1 cerebellar astrocytes. *Glia* 26, 119–128. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199904)26:2<119::aid-glia3>3.0.co;2-d
- Joseph, S. M., Buchakjian, M. R., and Dubyak, G. R. (2003). Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 23331–23342. doi: 10.1074/jbc.m302680200
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., et al. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J. Neurosci.* 28, 4702–4711. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008
- Karagiannis, A., Gallopín, T., David, C., Battaglia, D., Geoffroy, H., Rossier, J., et al. (2009). Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J. Neurosci.* 29, 3642–3659. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0058-09.2009
- Kitaura, H., Uozumi, N., Tohmi, M., Yamazaki, M., Sakimura, K., Kudoh, M., et al. (2007). Roles of nitric oxide as a vasodilator in neurovascular coupling of mouse somatosensory cortex. *Neurosci. Res.* 59, 160–171. doi: 10.1016/j.neures.2007.06.1469
- Koehler, R. C., Gebremedhin, D., and Harder, D. R. (2006). Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J. Appl. Physiol.* (1985) 100, 307–317. doi: 10.1152/japplphysiol.00938.2005
- Lee, E. J., Shin, S. H., Hyun, S., Chun, J., and Kang, S. S. (2011). Mutation of a putative S-nitrosylation site of TRPV4 protein facilitates the channel activates. *Animal Cells Syst. (Seoul)* 15, 95–106. doi: 10.1080/19768354.2011.555183
- Leybaert, L. (2005). Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 2–16. doi: 10.1038/sj.cjcbfm.9600001
- Li, N., Sul, J. Y., and Haydon, P. G. (2003). A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *J. Neurosci.* 23, 10302–10310.
- Lin, L. H., Taktakishvili, O., and Talman, W. T. (2007). Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1171, 42–51. doi: 10.1016/j.brainres.2007.07.057
- Lohman, A. W., Weaver, J. L., Billaud, M., Sandilos, J. K., Griffiths, R., Straub, A. C., et al. (2012). S-nitrosylation inhibits pannexin 1 channel function. *J. Biol. Chem.* 287, 39602–39612. doi: 10.1074/jbc.M112.397976
- Martínez-Ruiz, A., Araújo, I. M., Izquierdo-Álvarez, A., Hernánsanz-Agustín, P., Lamas, S., and Serrador, J. M. (2013). Specificity in S-nitrosylation: a short-range mechanism for NO signaling? *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1220–1235. doi: 10.1089/ars.2012.5066
- Meno, J. R., Crum, A. V., and Winn, H. R. (2001). Effect of adenosine receptor blockade on pial arteriolar dilation during sciatic nerve stimulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H2018–H2027.
- Metaa, M. R., and Newman, E. A. (2006). Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J. Neurosci.* 26, 2862–2870. doi: 10.1523/jneurosci.4048-05.2006
- Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142.
- Mulligan, S. J., and MacVicar, B. A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431, 195–199. doi: 10.1038/nature02827
- Muoio, V., Persson, P. B., and Sendeski, M. M. (2014). The neurovascular unit—concept review. *Acta Physiol. (Oxf.)* 210, 790–798. doi: 10.1111/apha.12250
- Ngai, A. C., Coyne, E. F., Meno, J. R., West, G. A., and Winn, H. R. (2001). Receptor subtypes mediating adenosine-induced dilation of cerebral arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H2329–H2335.
- Nilius, B., and Voets, T. (2005). TRP channels: a TR(1)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch.* 451, 1–10. doi: 10.1007/s00424-005-1462-y
- Orellana, J. A., Figueroa, X. F., Sánchez, H. A., Contreras-Duarte, S., Velarde, V., and Sáez, J. C. (2011). Hemichannels in the neurovascular unit and white matter under normal and inflamed conditions. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 10, 404–414. doi: 10.2174/187152711794653869
- Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., and Lukyanov, S. (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr. Biol.* 10, R473–R474. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00576-5
- Parri, H. R., and Crunelli, V. (2003). The role of Ca^{2+} in the generation of spontaneous astrocytic Ca^{2+} oscillations. *Neuroscience* 120, 979–992. doi: 10.1016/s0306-4522(03)00379-8
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., and Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23, 75–93. doi: 10.1016/j.niox.2010.04.007
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 38, 233–252. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.028
- Pelligrino, D. A., Vetri, F., and Xu, H. L. (2011). Purinergic mechanisms in gliovascular coupling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 229–236. doi: 10.1016/j.semdb.2011.02.010
- Perkins, G. A., Goodenough, D. A., and Sosinsky, G. E. (1998). Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J. Mol. Biol.* 277, 171–177. doi: 10.1006/jmbi.1997.1580
- Pilitsis, J. G., and Kimelberg, H. K. (1998). Adenosine receptor mediated stimulation of intracellular calcium in acutely isolated astrocytes. *Brain Res.* 798, 294–303. doi: 10.1016/s0006-8993(98)00430-2
- Porter, J. T., and McCarthy, K. D. (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog. Neurobiol.* 51, 439–455. doi: 10.1016/s0301-0082(96)00068-8
- Price, D. L., Ludwig, J. W., Mi, H., Schwarz, T. L., and Ellisman, M. H. (2002). Distribution of rSlo Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat astrocyte perivascular endfeet. *Brain Res.* 956, 183–193. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03266-3
- Pryazhnikov, E., and Khiroug, L. (2008). Sub-micromolar increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ triggers delayed exocytosis of ATP in cultured astrocytes. *Glia* 56, 38–49. doi: 10.1002/glia.20590
- Retamal, M. A., Cortés, C. J., Reuss, L., Bennett, M. V., and Sáez, J. C. (2006). S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 4475–4480. doi: 10.1073/pnas.051118103
- Rolfe, D. F., and Brown, G. C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* 77, 731–758.
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martínez, A. D., and Beyer, E. C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.* 83, 1359–1400. doi: 10.1152/physrev.00007.2003

- Schipke, C. G., Heidemann, A., Skupin, A., Peters, O., Falcke, M., and Kettenmann, H. (2008). Temperature and nitric oxide control spontaneous calcium transients in astrocytes. *Cell Calcium* 43, 285–295. doi: 10.1016/j.ceca.2007.06.002
- Sengupta, R., and Holmgren, A. (2013). Thioredoxin and thioredoxin reductase in relation to reversible S-nitrosylation. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 259–269. doi: 10.1089/ars.2012.4716
- Shi, Y., Liu, X., Gebremedhin, D., Falck, J. R., Harder, D. R., and Koehler, R. C. (2008). Interaction of mechanisms involving epoxyeicosatrienoic acids, adenosine receptors and metabotropic glutamate receptors in neurovascular coupling in rat whisker barrel cortex. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 111–125. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600511
- Shin, T. (2001). Increased expression of neuronal nitric oxide synthase in astrocytes and macrophages in the spinal cord of Lewis rats with autoimmune encephalomyelitis. *J. Vet. Sci.* 2, 195–199. doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.023
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q. S., and Nedergaard, M. (2003). Signaling at the gliovascular interface. *J. Neurosci.* 23, 9254–9262.
- Sipos, A., Vargas, S. L., Toma, I., Hanner, F., Willecke, K., and Peti-Peterdi, J. (2009). Connexin 30 deficiency impairs renal tubular ATP release and pressure natriuresis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1724–1732. doi: 10.1681/ASN.2008101099
- Stobart, J. L., Lu, L., Anderson, H. D., Mori, H., and Anderson, C. M. (2013). Astrocyte-induced cortical vasodilation is mediated by D-serine and endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110, 3149–3154. doi: 10.1073/pnas.1215929110
- Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C., and Charles, A. C. (2002). Inter-cellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J. Biol. Chem.* 277, 10482–10488. doi: 10.1074/jbc.m109902200
- Straub, S. V., Bonev, A. D., Wilkerson, M. K., and Nelson, M. T. (2006). Dynamic inositol trisphosphate-mediated calcium signals within astrocytic endfeet underlie vasodilation of cerebral arterioles. *J. Gen. Physiol.* 128, 659–669. doi: 10.1085/jgp.200609650
- Straub, S. V., and Nelson, M. T. (2007). Astrocytic calcium signaling: the information currency coupling neuronal activity to the cerebral microcirculation. *Trends Cardiovasc. Med.* 17, 183–190. doi: 10.1016/j.tcm.2007.05.001
- Suadicani, S. O., Iglesias, R., Spray, D. C., and Scemes, E. (2009). Point mutation in the mouse P₂X₇ receptor affects intercellular calcium waves in astrocytes. *ASN Neuro* 1:e00005. doi: 10.1042/AN20090001
- Suadicani, S. O., Iglesias, R., Wang, J., Dahl, G., Spray, D. C., and Scemes, E. (2012). ATP signaling is deficient in cultured Pannexin1-null mouse astrocytes. *Glia* 60, 1106–1116. doi: 10.1002/glia.22338
- Svenningsen, P., Burford, J. L., and Peti-Peterdi, J. (2013). ATP releasing connexin 30 hemichannels mediate flow-induced calcium signaling in the collecting duct. *Front. Physiol.* 4:292. doi: 10.3389/fphys.2013.00292
- Takano, T., Tian, G. F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., et al. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat. Neurosci.* 9, 260–267. doi: 10.1038/nn1623
- Tanaka, Y., Igarashi, T., Kaneko, H., Yamaki, F., Mochizuki, Y., Aida, M., et al. (2000). NO-mediated MaxiK(Ca) channel activation produces relaxation of guinea pig aorta independently of voltage-dependent L-type Ca(2+) channels. *Gen. Pharmacol.* 34, 159–165. doi: 10.1016/s0306-3623(00)00056-2
- Tang, Q., Dowd, T. L., Verselis, V. K., and Bargiello, T. A. (2009). Conformational changes in a pore-forming region underlie voltage-dependent “loop gating” of an unapposed connexin hemichannel. *J. Gen. Physiol.* 133, 555–570. doi: 10.1085/jgp.200910207
- Tao, L., and Harris, A. L. (2007). 2-aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits channels composed of connexin26 and/or connexin32. *Mol. Pharmacol.* 71, 570–579. doi: 10.1124/mol.106.027508
- Thompson, R. J., and MacVicar, B. A. (2008). Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels (Austin)* 2, 81–86. doi: 10.4161/chan.2.2.6003
- Tricoire, L., Pelkey, K. A., Daw, M. I., Sousa, V. H., Miyoshi, G., Jeffries, B., et al. (2010). Common origins of hippocampal Ivy and nitric oxide synthase expressing neurogliaform cells. *J. Neurosci.* 30, 2165–2176. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5123-09.2010
- Unger, V. M., Kumar, N. M., Gilula, N. B., and Yeager, M. (1999). Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283, 1176–1180. doi: 10.1126/science.283.5405.1176
- Vetri, F., Xu, H., Mao, L., Paisansathan, C., and Pelligrino, D. A. (2011). ATP hydrolysis pathways and their contributions to pial arteriolar dilation in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H1369–H1377. doi: 10.1152/ajpheart.00556.2011
- Xu, H. L., and Pelligrino, D. A. (2007). ATP release and hydrolysis contribute to rat pial arteriolar dilatation elicited by neuronal activation. *Exp. Physiol.* 92, 647–651. doi: 10.1113/expphysiol.2006.036863
- Zhang, L., Deng, T., Sun, Y., Liu, K., Yang, Y., and Zheng, X. (2008). Role for nitric oxide in permeability of hippocampal neuronal hemichannels during oxygen glucose deprivation. *J. Neurosci. Res.* 86, 2281–2291. doi: 10.1002/jnr.21675
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K. A., Pozzan, T., et al. (2003a). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* 6, 43–50. doi: 10.1038/nn980
- Zonta, M., Sebelin, A., Gobbo, S., Fellin, T., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2003b). Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *J. Physiol.* 553, 407–414. doi: 10.1113/jphysiol.2003.046706

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 01 December 2014; accepted: 07 February 2015; published online: 10 March 2015.

Citation: Muñoz MF, Puebla M and Figueroa XF (2015) Control of the neurovascular coupling by nitric oxide-dependent regulation of astrocytic Ca²⁺ signaling. *Front. Cell. Neurosci.* 9:59. doi: 10.3389/fncel.2015.00059

This article was submitted to the journal *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

Copyright © 2015 Muñoz, Puebla and Figueroa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.