

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y**  
**FARMACEUTICAS**



**“Rol del receptor P2X7 en la respuesta de los  
astrocitos a Thy-1 en un contexto de inflamación por  
daño celular”**

**Presentada a la Universidad de Chile  
para optar al Grado de Doctor en Farmacología**

**Por:**

**Álvaro Gonzalo Álvarez Martínez**

**Director de Tesis**

**Dra. Lisette Leyton – Dr. Andrew Quest**

**SANTIAGO- CHILE**

**2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

**Álvaro Gonzalo Álvarez Martínez**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de ..... de 2014.

**Directores de Tesis:**

Dra. Lisette Leyton

\_\_\_\_\_

Dr. Andrew Quest

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante:**

Dr. Javier Puente (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dr. Luis Aguayo

\_\_\_\_\_

Dr. Hernán Lara

\_\_\_\_\_

Dr. Juan Carlos Sáez

\_\_\_\_\_

## **Dedicatoria**

*A Carolina y Nicolás,*

## **Agradecimientos**

**A mi familia, por el apoyo y la fuerza que me mantuvo hasta el final.**

**A mis padres por permitirme llegar hasta este nivel.**

**A mis tutores cuyo consejo fue trascendente y su apoyo inestimable.**

**A mis compañeros de laboratorio que hicieron el trabajo más liviano.**

**A todos los que me apoyaron y permitieron que terminara este trabajo.**

**A Conicyt por suministrarme el financiamiento para manutención y para la compra de insumos para el trabajo.**

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>Dedicatoria</b> .....	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>iv</b>
<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>viii</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
3.1. Astrocitos y astrogliosis .....	1
3.2. Thy-1 y sus interacciones con otras moléculas de adhesión .....	4
3.3. Migración Celular.....	9
3.4. ATP y mecanismos de salida de ATP desde el astrocito. ....	13
3.5. Receptor P2X7 .....	17
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>22</b>
<b>5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>22</b>
5.1.1. Estudiar rutas involucradas en los cambios en niveles extracelulares de ATP gatillado por la unión de Thy-1 con la Integrina $\alpha\beta 3$ y con Síndecan-4. ....	22
5.1.2. Dilucidar la función de P2X7R activado en la formación de adhesiones focales.....	22
5.1.3. Estudiar en un modelo de inflamación por herida si el antagonista de P2X7R, BBG, y el bloqueo de la interacción Thy-1/Integrina $\alpha\beta 3$ disminuyen la migración de los astrocitos. ....	23
5.1.4. Estudiar la capacidad de astrocitos primarios de responder a Thy-1 y evaluar el aumento en la expresión de P2X7R frente a un estímulo inflamatorio en astrocitos no reactivos. ....	23
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
6.1. Cultivo de células DI-TNC1.....	24
6.2. Cultivo primario de astrocitos.....	24
6.3. Preparación de cubreobjetos para siembra de astrocitos de cultivo primario. ....	25
6.4. Preparación de Thy-1-Fc y estimulación.....	25
6.5. Medición de ATP extracelular .....	26

6.6. Incorporación de Lucifer Yellow .....	26
6.7. Formación de adhesiones focales .....	27
6.8. Transfección de células por método de nucleofección.....	28
6.9. Ensayos de polaridad .....	28
6.10. Medición de calcio intracelular .....	29
6.11. Obtención de extractos celulares y estimulación con TNF $\alpha$ .....	30
6.12. Western blots.....	31
6.13 Ensayo de cierre de herida .....	32
6.14. Análisis estadístico y expresión de resultados .....	32
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
7.1. Objetivos Específico 1. Estudiar rutas involucradas en los cambios en niveles extracelulares de ATP gatillados por la unión de Thy-1 con la Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ y con Síndecan-4. ....	33
7.1.1. Rutas de Salida de ATP .....	35
7.1.2. Efectos del bloqueo de hemicanales en las respuestas celulares inducidas por Thy-1 en astrocitos DITNC <sub>1</sub> .....	39
7.1.3. Estudio de las rutas involucradas en la salida de ATP a través de hemicanales inducida por Thy-1 .....	42
7.2. Objetivo específico 2: Dilucidar la función de P2X7R activado en la formación de adhesiones focales. ....	48
7.3. Objetivo 3. Estudiar en un modelo de inflamación por herida si el antagonista de P2X7R, BBG, y el bloqueo de la interacción Thy-1/Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ disminuyen la migración de los astrocitos.....	51
7.3.1. Participación del receptor P2X7 y de la salida de ATP en la migración de los astrocitos inducida por Thy-1.....	51
7.4. Objetivo específico 4. Estudiar la capacidad de astrocitos primarios de responder a Thy-1 y evaluar el aumento en la expresión de P2X7R frente a un estímulo inflamatorio en astrocitos no reactivos.....	64
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
8.1. Aumentos extracelulares de ATP inducidos por Thy-1 .....	77
8.2. Salida de ATP a través de hemicanales .....	79
8.3. Salida de Calcio por receptor de IP3 .....	83
8.4. Participación del receptor P2X7 en la formación de adhesiones focales inducida por Thy-1 .....	85

8.5. Participación del receptor P2X7 en la migración de astrocitos inducida por Thy-1 .....	88
8.6. Cambios en los efectos sobre los astrocitos inducidos por Thy-1 .....	89
8.7. Participación del receptor P2X7 en la migración de astrocitos inducida por BzATP .....	91
8.8. Respuesta de astrocitos primarios a Thy-1 .....	93
<b>9. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....</b>	<b>100</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>105</b>

## 1. RESUMEN

Los astrocitos responden a un estímulo inflamatorio modificando su morfología y su patrón de expresión génica y participando en la formación de la cicatriz glial, en el caso de lesión traumática. La cicatriz glial se relaciona con la generación de un ambiente no permisivo para la regeneración axonal, el que contiene además moléculas responsables de la pobre reparación existente en el sistema nervioso central. Entre estas moléculas destacan los proteoglicanos de Condroitin sulfato secretado por los astrocitos que forman la cicatriz glial, la proteína Nogo presente en la membrana de los oligodendrocitos y, muy importantemente para este estudio, la glicoproteína Thy-1, presente en la superficie neuronal.

Por muchos años, nuestro laboratorio ha estado enfocado en estudiar las funciones y modo de señalización de Thy-1, proteína anclada por un tallo glicosilfosfatidil inositol a la cara externa de la membrana plasmática. Evidencias indican que Thy-1 participa en la inhibición del crecimiento axonal y en mediar interacciones célula - célula. Hemos mostrado además que el efecto de Thy-1 ocurre por medio de dos receptores, la Integrina  $\alpha\beta 3$  y Sindecán-4 presentes en los astrocitos de línea DITNC<sub>1</sub>. La interacción de Thy-1 con sus receptores por tiempos cortos induce un aumento de la adhesión de los astrocitos, mientras que la estimulación prolongada con Thy-1 induce la migración de estas células.

La interacción de Thy-1 con sus receptores induce en los astrocitos la activación de cascadas transduccionales que llevan al aumento en la actividad, temporalmente diferenciado, de las GTPasas RhoA y Rac1 entre otros. Además Thy-1 induce la salida de ATP desde el astrocito que resulta en la activación del receptor P2X7 y la entrada de calcio extracelular. Se sabe que estas señales son necesarias para la adhesión de estas células; sin embargo, ¿Cómo sale el ATP de los astrocitos en respuesta a Thy-1? ¿Se requiere de este ATP extracelular y de la activación del receptor P2X7 para la migración de los astrocitos DITNC<sub>1</sub> inducida por Thy-1? Son preguntas que buscamos responder en este trabajo.

Por otro lado, resultados de nuestro laboratorio muestran que, contrario a lo encontrado para los astrocitos DITNC<sub>1</sub>, astrocitos de cultivo primario no responden a Thy-1 y expresan niveles muy bajos de la Integrina  $\beta$ 3. Además, se ha descrito que astrocitos primarios aumentan la expresión de esta Integrina en condiciones de daño por derrame cerebral. Dado que los astrocitos sufren cambios morfológicos y migran en condiciones proinflamatorias para reparar el daño, es posible que las diferentes respuestas observadas en los astrocitos primarios y los de línea celular frente al estímulo de Thy-1 se deban a los distintos niveles de integrina expresada por ambos tipo de células.

Por lo tanto, en este estudio proponemos que la migración de los astrocitos DITNC<sub>1</sub> inducida por Thy-1 requiere de la salida del ATP al espacio extracelular – por mecanismos aún por dilucidar – y de la activación del

receptor P2X7. Además, que la baja expresión de la Integrina  $\beta 3$  no permite a los astrocitos de cultivo primario responder a Thy-1.

Para estudiar la salida de ATP desde el astrocito y qué vías están involucradas se realizaron mediciones de ATP extracelular por técnicas de luminiscencia, incorporación de sondas fluorescentes a las células, medición de cinéticas de calcio intracelular, entre otras. Para evaluar los requerimientos en la migración inducida por Thy-1 se llevaron a cabo ensayos de cierre de herida y ensayos de polaridad celular. La participación de las distintas moléculas en los mecanismos estudiados se analizó con el uso de inhibidores farmacológicos, bloqueadores de canales o antagonistas de receptores, también se utilizó herramientas de modificación de la expresión génica de las moléculas estudiadas.

Para monitorear la respuesta de los astrocitos primarios al estímulo de Thy-1, se realizó cultivos de astrocitos corticales, los que fueron tratados o no con citoquinas proinflamatorias como  $\text{TNF}\alpha$ . Se analizó cambios de expresión de la Integrina  $\beta 3$  por Western Blot frente a este tratamiento. La respuesta migratoria de los astrocitos tratados con o sin  $\text{TNF}\alpha$ , frente al estímulo de Thy-1 se realizó por ensayo de cierre de herida en distintas condiciones, como silenciando o sobreexpresando la Integrina  $\beta 3$ .

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que Thy-1 induce la salida de ATP, requiriendo la presencia de ambos sitios de interacción con sus receptores. Mutación en el sitio de unión a integrinas anula completamente la respuesta, mientras que la mutación en el sitio de unión a

Sindecán-4 disminuye y retrasa la respuesta. Se demuestra en este trabajo que la salida de ATP ocurre a través de los hemicanales Connexina 43 y Panexina 1, abriéndose estos hemicanales por medio de un mecanismo que requiere de aumentos de calcio intracelular proveniente del retículo endoplásmico y que sale al citoplasma a través del receptor de IP3R.

La salida de ATP es necesaria para el aumento en el área promedio de la adhesión focal y el aumento en el número de adhesiones focales por célula inducida por estimulaciones cortas con Thy-1. Estimulaciones prolongadas llevan a un aumento en la polaridad celular y en la migración de los astrocitos DITNC<sub>1</sub>, efecto que también requiere de la apertura de hemicanales, la presencia de ATP extracelular y de la activación del receptor P2X7.

La estimulación de los astrocitos con BzATP, agonista del receptor P2X7, a altas concentraciones estimula la migración celular, mientras que bajas concentraciones, por si solas, no provocan este efecto. Sin embargo, nuestros estudios muestran que frente a una estimulación concomitante de Thy-1 mutado en el sitio de unión a Integrina y BzATP a bajas concentraciones es suficiente para inducir la migración de los astrocitos DITNC<sub>1</sub> sugiriendo que el aumento extracelular de ATP requiere de la actividad del sitio de unión a Integrina de Thy-1. Estos resultados indican además que la activación del receptor P2X7 por ATP (o BzATP) y la ruta activada río debajo de la interacción de Thy-1 con probablemente Síndecan-

4 (Thy-1 mutado en el sitio de unión a Integrina posee sitio de unión a heparina intacto) son necesarias para inducir la migración de los astrocitos.

Los astrocitos de cultivo primario cambiaron su fenotipo tras ser expuestos a la citoquina pro-inflamatoria TNF $\alpha$ , aumentando la expresión de las proteínas Integrina  $\beta$ 3, GFAP y receptor P2X7, lo que permitió también a los astrocitos migrar en respuesta a Thy-1. Ensayos realizados con astrocitos primarios en que se sobre-expresa o silencia el gen codificante para la Integrina  $\beta$ 3, demostraron que la respuesta a Thy-1 luego del tratamiento con agentes pro-inflamatorios, es dependiente de la expresión de dicha Integrina. Se demostró además que la migración de estos astrocitos inducida por Thy-1 también requiere de ATP extracelular y de la activación del receptor P2X7.

Estos datos aportan al entendimiento del papel que tienen los astrocitos en el desarrollo de una respuesta inflamatoria tras un daño al sistema nervioso central. Además, aportan antecedentes interesantes sobre cómo una interacción neurona – astrocito, a través de Thy-1 y sus receptores, regula la migración de los astrocitos modificando la señalización intracelular, la permeabilidad de la célula y generando un fenómeno de transactivación que induce cambios en el comportamiento celular. Comprender cómo cambia el comportamiento de los astrocitos frente a la interacción con Thy-1 es importante para generar oportunidades terapéuticas y posibles blancos farmacológicos para contrarrestar la inhibición del crecimiento axonal relacionada con esta interacción.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo aparecen numerosas preguntas nuevas, por ejemplo qué vías se relacionan con la apertura de los hemicanales y cómo estas rutas se conectan con cambios en la adhesividad y migración de los astrocitos. Importante será también comprender el papel que tiene Síndecan-4 en la liberación de ATP inducida por Thy-1 y en la respuesta de los astrocitos de cultivo primario a Thy-1 en un contexto inflamatorio. Finalmente, llevar este conocimiento obtenido en modelos celulares a un modelo animal con perspectivas de tratamiento sería un objetivo clave para reforzar esta investigación.

## 2. ABSTRACT

Astrocytes respond to inflammatory stimuli by modifying their morphology and gene expression pattern, and participate in the formation of the glial scar in the case of a traumatic lesion. This glial scar represents a non-permissive environment for axonal regeneration that harbors many inhibitory molecules thought to be responsible for the poor capacity of neurons in the Central Nervous System to repair themselves. In this context, molecules like Chondroitin sulfate proteoglycans secreted by astrocytes, the Nogo protein present on the surface of oligodendrocytes and, importantly for our studies, the neuronal surface glycosyl phosphatidylinositol protein Thy-1, all are highly relevant.

For many years, our laboratory has focused on the study of Thy-1 function and signaling. We have shown that Thy-1 inhibits axonal growth and engages in cell-cell interactions. We have also demonstrated that these effects are elicited through the interaction with two receptors present in DITNC<sub>1</sub> astrocytes:  $\alpha_v\beta_3$  Integrin and Syndecan-4. We have observed that short-term interaction of Thy-1 with these two receptors enhances astrocyte adhesion; however, following prolonged stimulation, Thy-1 induces astrocyte migration.

Thy-1 interaction with its receptors induces the activation of signal transduction pathways in astrocytes that increase RhoA and Rac1 GTPase activity with different kinetics. Thy-1 also induces ATP release from the

astrocytes, resulting in the activation of the P2X7 receptor and entry of extracellular calcium. We know that these signals are necessary for astrocyte adhesion. However, how ATP is released in response to Thy-1 remains to be determined. Also whether extracellular ATP and P2X7 receptor activation are required for DITNC<sub>1</sub> astrocyte migration induced by Thy-1 is unknown. These and related questions we sought to answer with the studies described in this thesis.

On the other hand, results from our laboratory have shown that, in contrast to DITNC<sub>1</sub> cells, primary astrocytes in culture do not respond to Thy-1 and express very low levels of  $\beta_3$  integrin, which however increase under pro-inflammatory conditions, such as those produced in the brain by a stroke. Because astrocytes undergo morphological changes and migrate under these conditions in an attempt to limit and repair the damage, we hypothesized that the different responses observed in DITNC<sub>1</sub> cells and primary astrocytes, after Thy-1 stimulation, are due to the different levels of integrin expression observed in the two types of cells.

Therefore, in this study we propose that DITNC<sub>1</sub> cell migration induced by Thy-1 requires ATP release into the extracellular space – by still unknown mechanisms – and P2X7 receptor activation. Furthermore, we hypothesize that primary astrocytes do not respond to Thy-1 due to their low levels of  $\beta_3$  Integrin expression.

In order to study ATP release from the astrocytes, and the signaling pathways involved, we measured extracellular ATP by luminescence

techniques, and evaluated calcium kinetics by loading the cells with fluorescent probes, and follow fluorescent dye uptake. To assess the requirements of astrocyte migration induced by Thy-1, we performed wound healing and cell polarity assays. The participation of the different molecules in the mechanisms under study was analyzed by the use of pharmacological inhibitors, channel blockers or receptor antagonists. Also, expression of some of these molecules was modified using shRNA and siRNA or other approaches.

Primary astrocyte responses to Thy-1 were monitored in cortical astrocytes treated or not treated with pro-inflammatory cytokines, such as TNF $\alpha$ . Then, changes in  $\beta_3$  Integrin expression were analyzed by Western Blotting, and astrocyte migration was evaluated using the wound healing assay under different conditions, including silencing or overexpression of  $\beta_3$  Integrin.

The results shown in this study indicate that ATP release induced by Thy-1 required the interaction with both  $\alpha_v\beta_3$  Integrin and Syndecan-4 receptors. Mutation of the integrin-binding site completely abolished the response, while mutation in the heparin-binding domain decreased and delayed ATP release. We further demonstrate that ATP release occurred through Connexin 43 and Pannexin 1 hemichannels, which are opened by a mechanism that required an increase in intracellular calcium stored in the endoplasmic reticulum. This calcium was released to the cytoplasm through IP3R receptor activation.

ATP release was necessary for the increase of both average focal adhesion area and the number of focal adhesions per cell induced by stimulation for

short periods with Thy-1. Prolonged stimulation induced DITNC<sub>1</sub> cell polarization and migration, and both of these effects required the opening of hemichannels, the presence of extracellular ATP and P2X7 receptor activation.

Treatment of astrocytes with BzATP, a P2X7 receptor agonist, stimulated cell migration at high concentrations. However, our study shows that DITNC<sub>1</sub> astrocytes treated with low concentrations of BzATP, which did not induce cell migration, were able to migrate upon co-stimulation with a mutant form of Thy-1 lacking the integrin-binding site, but with an intact heparin-binding domain, suggesting that increases in extracellular ATP requires the integrin-binding site of Thy-1. These results also indicate that activation of the P2X7 receptor by ATP (or BzATP) and downstream signaling induced by Thy-1 through Syndecan-4, are necessary for astrocyte migration.

Primary astrocytes changed their phenotype after treatment with TNF $\alpha$ , increased the expression of  $\beta_3$  Integrin, GFAP and P2X7 receptor, and migrated in response to Thy-1. Furthermore, experiments in which  $\beta_3$  Integrin was overexpressed or silenced indicated that after treatment with pro-inflammatory agents, the observed responses to Thy-1 depended on the expression of this integrin. Migration of TNF $\alpha$ -treated astrocytes induced by Thy-1 also required extracellular ATP and the activation of the P2X7receptor.

These results improve our understanding of the role that astrocytes play during an inflammatory response after damage to the Central Nervous System. They also uncover mechanisms relevant to how neuron-astrocyte

interactions, established via neuronal Thy-1 and its astrocytic receptors, regulates astrocyte migration, modifies intracellular signaling, cell permeability and generates changes in cell behavior. These results set the stage for future studies that will yield a deeper understanding of how astrocytes change their behavior after interacting with Thy-1. These insights may eventually help in generating therapeutic opportunities and pharmacological targets to counteract the inhibition of axonal growth ascribed to interaction with astrocytes.

With our results, new questions arise. For example, which pathways are related to the opening of hemichannels? How do these pathways regulate changes in adhesion and migration of astrocytes? What role does Syndecan-4 play in ATP release induced by Thy-1? What is the role of Syndecan-4 in primary astrocytes stimulated with Thy-1 under inflammatory conditions? Finally, it would be very interesting to compare these results with the responses that are observed in animal models. In conjunction, these approaches may eventually help to define new approaches for the treatment of patients with post-trauma brain damage.

### **3. INTRODUCCIÓN**

El sistema nervioso (SN) se compone de neuronas, encargadas del procesamiento, transmisión e integración de la información, y de glías, las que dan soporte funcional a las neuronas, regulan el funcionamiento del SN y participan en la comunicación célula – célula. Existen distintos tipos de glías y cada una posee una función particular: la microglia participa como fagocito profesional, la célula de Schwann, en SN periférico, así como el oligodendrocito, en SN central (SNC), forman la vaina de mielina; mientras que, los astrocitos regulan la actividad sináptica y la comunicación entre las células.

#### **3.1. Astrocitos y astrogliosis**

Los astrocitos, que deben su nombre a su morfología estrellada, son las células más abundantes del SNC. Se encuentran en estrecho contacto con las neuronas, y con células endoteliales, cumpliendo diversas funciones que incluyen la protección de las neuronas, la regulación del flujo de neurotransmisores, la mantención de la homeostasis del sistema nervioso, de la integridad y funcionalidad de la barrera hematoencefálica, el modelamiento de la matriz extracelular y la comunicación con otras células a través de gliotransmisores (Sofroniew, 2009; Fitch y Silver, 2008; Hamilton, 2010).

Frente a situaciones que generen una respuesta inflamatoria como, por ejemplo, un trauma o una enfermedad neurodegenerativa, los astrocitos experimentan modificaciones en su morfología, adquiriendo un fenotipo fibroblástico e hipertrófico. Además, muestran cambios en la expresión de proteínas, apareciendo los marcadores de reactividad astrocitaria, como las proteínas de filamentos intermedios, Nestina y la ácido fibrilar de glía (GFAP), u otras proteínas como Conexina 43 (Theodoric, 2012). Este fenómeno de conversión astrocitaria se denomina astrogliosis (Xie y Zheng, 2008; Sofroniew y Vinters, 2010).

Es importante mencionar que los cambios en los patrones de expresión no incluyen sólo a los clásicos marcadores de reactividad mencionados, sino que también otras proteínas como factores transcripcionales, integrinas o metaloproteinasas de matriz extracelular. Estas moléculas no se han empleado como marcadores debido a la temporalidad de estas variaciones (Jin R y cols., 2007; Sofroniew 2009; Zamanian y cols., 2012).

De las previamente mencionadas, GFAP es la proteína estándar utilizada como marcador de reactividad; no obstante, se ha visto que hay astrocitos que en estado no reactivo, también expresan esta proteína. Por ello, a través de análisis genómicos de astrocitos reactivos, se ha buscado candidatos más idóneos para ser usados como marcadores de reactividad, proponiéndose moléculas como Lcn2 y Serpina3n (Zamanian y cols., 2012).

En general, la presencia de la astrogliosis se relaciona con cambios en la arquitectura del SNC en forma graduada, continua y finamente regulada. Las

consecuencias de este fenómeno son el aumento del número de astrocitos reactivos en la zona del daño, probablemente por el movimiento de poblaciones de astrocitos atraídos quimiotácticamente a la zona del daño (Zamanian y cols., 2012). Al igual que para la población de astrocitos normales, existen numerosos tipos de astrocitos reactivos, los que muestran diversas formas y patrones de expresión de proteínas (Zamanian y cols., 2012). Estos astrocitos diversos, en conjunto con otros tipos celulares gliales como oligodendrocitos y microglías, forman la cicatriz glial en la zona dañada (Xie y Zheng., 2008). En este lugar, microglías o astrocitos secretan una amplia gama de factores proinflamatorios como las citoquinas TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$  o moléculas recientemente asociadas a estos fenómenos como el ATP (Xie y Zheng., 2008).

Los astrocitos responden autocrina o paracrinamente a estímulos inflamatorios, no sólo con cambios morfológicos y de expresión génica, sino que además, pueden secretar factores tróficos que ayuden a la sobrevivencia de las neuronas cercanas a la zona del daño, así como a otras glías afectadas (Xie y Zheng., 2008; Parpura y Zorec, 2010; Wiese y cols., 2012).

Si bien la cicatriz glial ha sido relacionada con la limitación del daño, fundamentalmente por la extensión de procesos astrocitarios que aíslan la región dañada, también se relaciona con una limitación en la capacidad de las neuronas de regenerar las prolongaciones afectadas (Wanner y cols., 2013). Un gran número de moléculas presentes en la cicatriz han sido

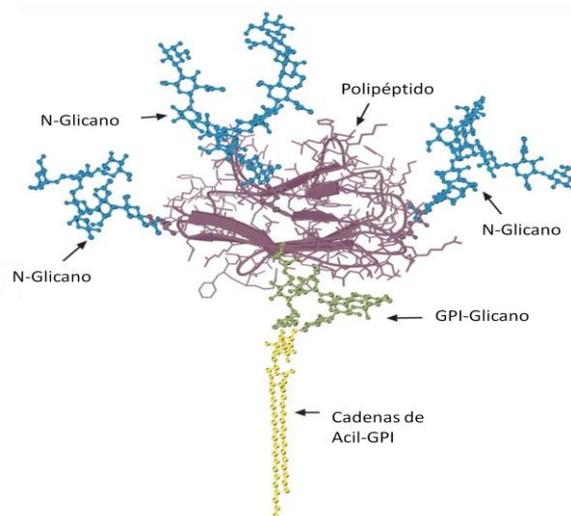
descritas como responsables de impedir la regeneración axonal, por ejemplo, proteínas de membrana del oligodendrocito como Nogo, la glicoproteína asociada a mielina (MAG) o a la glicoproteína de la mielina en oligodendrocito (OMgp) (Grandpré y Strittmatter, 2001; Quarles, 2009); el proteoglicano de la matriz extracelular secretado por los astrocitos reactivos, condroitín sulfato (CSPG) (Sakisaka y Takai, 2005), así como también, moléculas presentes en la membrana neuronal como el receptor de Nogo (Fournier y cols, 2001) y la glicoproteína Thy-1 (Mahanthappa y Patterson, 1992). En esta tesis, nos hemos enfocado en el estudio de Thy-1, porque su función en el SNC es aún desconocida.

### **3.2. Thy-1 y sus interacciones con otras moléculas de adhesión**

La expresión de Thy-1 ha sido descrita en numerosas células, como fibroblastos pulmonares o neuronas (Craig y cols., 1993; Saalbach y cols., 1999). Thy-1 tiene 110 aminoácidos y pesa entre 25 a 30 kDa, presenta una estructura similar a las inmunoglobulinas, con cerca de un 30 % de su masa compuesta por carbohidratos, anclándose a la membrana plasmática con un tallo de glicosil fosfatidil inositol (Figura 1). El peso total de Thy-1 puede llegar a representar hasta un 7,5 % del peso de las proteínas de membrana neuronal (Morris, 1992).

Debido a su muy baja expresión en etapas del desarrollo y al aumento durante la etapa adulta, se ha sugerido que Thy-1 juega un papel en la

mantención de procesos y conexiones neuronales, función que se desprende importante por el grado de mantención evolutivo de la proteína. Thy-1 ha sido implicado en la inhibición, tanto del desarrollo de neuritas, como de su reparación posterior a un daño neuronal (Morris, 1992; Tiveron, 1992). Además, la interacción entre neuronas y astrocitos impide la generación de prolongaciones en la neurona, cuando Thy-1 está presente (Herrera-Molina y cols., 2012, 2013). Concordantemente, anticuerpos bloqueadores o el silenciamiento de Thy-1 permiten la generación de nuevos procesos y el crecimiento de las neuritas (Chen y cols., 2005).



**Figura 1. Estructura de Thy-1.** Thy-1 es una glicoproteína que se ancla a la parte externa de la membrana plasmática a través de un tallo de glicosil fosfatidil inositol. Posee modificaciones glicosídicas como N-Glicanos y un centro polipeptídico. Modificado de Mark Wormald and Raymond Dwek, Oxford Institute Glycobiology.

Thy-1 también ha sido relacionado con fenómenos de adhesión celular y comunicación célula – célula. Nuestro laboratorio demostró que las células

de timoma de ratón EL-4, que expresan Thy-1 en su superficie, interactúan con la Integrina  $\beta 3$  en astrocitos DITNC<sub>1</sub> modificando la morfología de estas células (Leyton y cols., 2001). Otros autores también han reportado la interacción de Thy-1 con distintas Integrinas como la  $\alpha\beta 2$  o la  $\alpha M\beta 2$  (Choi y cols., 2005; Saalbach y cols., 2004). Por ello, las integrinas parecen ser claves en la interacción célula – célula mediada por Thy-1.

Las integrinas son proteínas transmembrana que conectan el citoesqueleto con la matriz extracelular o con proteínas de membrana de otras células. Estructuralmente, forman un dímero  $\alpha\beta$ , el que posee funciones estructurales, de adhesión e incluso de señalización. Una de las estructuras multimoleculares que contienen integrinas son las adhesiones focales, estos complejos proporcionan el anclaje de la célula a la matriz extracelular. En general, hay moléculas de presencia permanente en las adhesiones como proteínas del citoesqueleto (filamentos de actina), proteínas con función estructural (actinina, vinculina, paxilina), quinasas (FAK, Src, PAK), fosfatasa (SHP-2) o proteasas (Calpaína-2), entre otras (Miranti y Brugge, 2002).

Como se mencionó previamente, estudios describen a Thy-1 como responsable de la inhibición del crecimiento de neuritas en neuronas cocultivadas con astrocitos (Tiveron, 1992). Ello sugiere la presencia de un interlocutor para Thy-1 en los astrocitos. Nuestro laboratorio fue el primero en describir que Thy-1 neuronal interactuaba con la Integrina  $\alpha\beta 3$  de astrocitos, aumentando el número y área de las adhesiones focales, las

fibras de estrés y la adhesión a la matriz extracelular (Leyton y cols., 2001; Hermosilla y cols., 2008); también que la secuencia tripeptídica RLD, análoga al dominio de unión a integrinas RGD, presente en Thy-1 es el sitio de unión a la Integrina  $\alpha\beta_3$ , donde la mutación del Ácido Aspártico por un Ácido Glutámico es suficiente para evitar la unión a la Integrina y con ello, el aumento en la formación de adhesiones focales inducida por Thy-1 (Hermosilla y cols., 2008). Además, nuestro laboratorio describió que los efectos inducidos por Thy-1 en los astrocitos requieren también de la participación de Síndecan-4, requiriéndose la presencia de la secuencia REKRRK (dominio HBD) de Thy-1, secuencia de unión a heparina como las cadenas de heparán sulfato presentes en el Síndecan (Ávalos y cols., 2009).

Síndecan-4 es un proteoglicano transmembrana que pertenece a la familia de los síndecanos. Esta familia está conformada por los síndecanos 1, 2, 3 y 4; se ha descrito que estas proteínas participan en inflamación, coagulación sanguínea, cicatrización, adhesión celular y migración celular, entre otros (Alexopoulou y cols., 2007; Araki y cols., 2009; Bass y cols., 2009; Cizmeci-Smith y cols., 1997). Los síndecanos poseen un dominio extracelular con sitios de unión a glucosaminoglicanos, modificaciones glicosídicas que le permiten interactuar con numerosos ligandos solubles o proteínas de la matriz extracelular (Bernfield y cols., 1999; Bass y Humphries, 2002). El dominio intracelular es una región citoplasmática corta con secuencias que sugieren la capacidad de asociarse a moléculas de señalización intracelular (Zimmermann y cols., 1999) como PIP2 y PKC $\alpha$  (Lee y cols., 1998).

La interacción de Thy-1 con sus dos receptores, Integrina  $\alpha\beta 3$  y Síndecan-4, induce la activación de una serie de vías transduccionales relacionadas con cambios en la adhesión de los astrocitos DITNC<sub>1</sub> a la matriz. Entre estas vías se cuentan aquellas conducentes a la formación de adhesiones focales y fibras de estrés, como la activación de FAK, p160ROCK y RhoA (Leyton y cols., 2001; Avalos y cols., 2002, 2004; Hermosilla y cols., 2008). Además, hemos encontrado que la señalización activada por Thy-1 involucra a PKC $\alpha$ , Src y PI3K (Avalos y cols., 2009; Kong y cols., 2013). También se ha observado un posible rol de PLC $\gamma$  en la respuesta a Thy-1, ya que hemos visto que bloqueadores del receptor de IP3 disminuyen la activación de RhoA y el aumento de la adhesividad de los astrocitos inducida por Thy-1 (Avalos y cols., 2009). Relacionado también con el aumento de las adhesiones focales, hemos descrito que la estimulación de astrocitos DITNC<sub>1</sub> con Thy-1 induce aumentos extracelulares de ATP y posterior activación del receptor de P2X7 y entrada de calcio a la célula, todos estos eventos son requeridos para cambiar la adhesividad de los astrocitos (Henriquez y cols., 2011).

Adicionalmente, nuestro laboratorio ha descrito recientemente que la estimulación sostenida con Thy-1 induce la migración de los astrocitos DITNC<sub>1</sub> en un ensayo de herida, por mecanismos moleculares que involucran la activación de las quinasas FAK y PI3K, y de la GTPasa pequeña Rac1 (Kong y cols., 2013). Además, se activa uno de los factores

estimuladores de la actividad GTPasa de Rac1, denominado Tiam1 (Kong y cols., resultados no publicados).

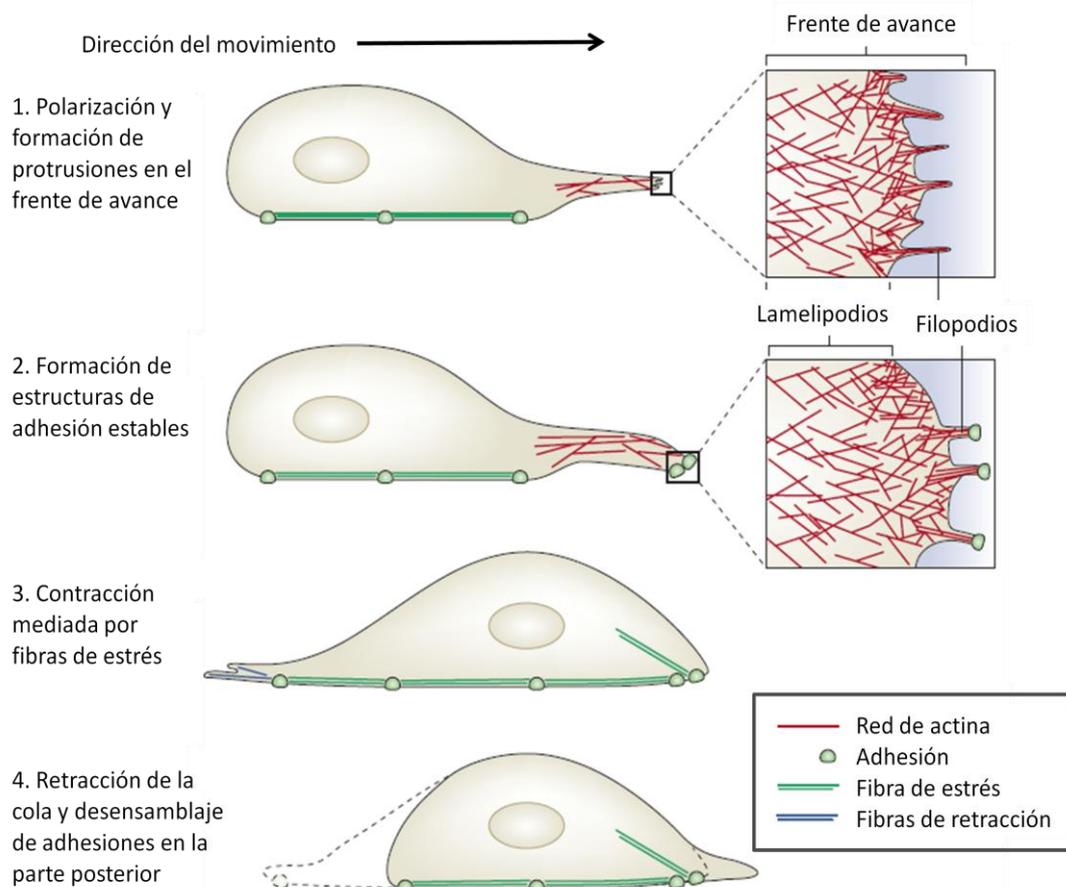
### **3.3. Migración Celular**

La migración celular es un evento complejo donde participan un alto número de moléculas de señalización y que incluye la re-organización del citoesqueleto. Temporalmente, la migración consta de numerosas etapas, iniciándose con la polarización celular, donde se define la existencia de un frente de avance y ocurre la reubicación del aparato de Golgi y el centro organizador de microtúbulos, colocándose ambos entre el núcleo y el recién definido frente de avance, una posición ventajosa para la adecuada entrega de vesículas a las protrusiones que formarán parte de las estructuras de avance (Etienne-Manneville y cols., 2005). Posteriormente, hay formación de protusiones que permitirán la aparición de estructuras dependientes del citoesqueleto de actina, como filopodios y lamelipodios. En este frente de avance aparecen contactos focales asociados a microfilamentos de actina, los que "maduran" a adhesiones focales que aparecen unidas a las fibras de estrés brindando a la célula la capacidad de contraerse. Esta actividad del frente de la célula, en conjunto con el desensamblaje de las adhesiones focales de la parte trasera de la misma, genera la tensión suficiente para la retracción de la cola y el avance de la célula (Raftopoulou y Hall, 2004; Barber y Welch, 2006) (Figura 2).

La formación y rompimiento de adhesiones focales en forma dinámica es clave para el desarrollo exitoso de la migración celular, para ello las adhesiones maduras y estables deben desaparecer en la cola, a través de mecanismos que incluyen la quinasa FAK, calcio y las proteasas llamadas calpaínas; sólo se mantienen las adhesiones cercanas a las protrusiones recién formadas. Estructuras también importantes son las fibras de estrés conformadas por paquetes de entre 10 a 30 microfilamentos de actina, unidas mediante  $\alpha$ -actinina y miosina y fuertemente asociadas a las adhesiones focales. Se ha postulado que la orientación de estas fibras, paralelas al eje del movimiento, permite la generación de gran cantidad de fuerza utilizada para la retracción de la cola y el avance de la célula (Chan y cols., 2010) (Figura 2).

La migración de los astrocitos se ha propuesto como una respuesta de estas células frente a diferentes estímulos. Por ejemplo, en condiciones inflamatorias y generación de astrogliosis, se ha descrito que los astrocitos migran hacia la zona del daño y, además, proliferan (Renault-Mihara y cols., 2008). No obstante esto, recientemente la actividad migratoria de los astrocitos en modelos *in vivo* ha sido puesta en duda, y se ha responsabilizado a la proliferación celular como el evento que genera el aumento de astrocitos en la zona del daño. Se ha propuesto que los astrocitos adultos se desdiferencian, reanundando el ciclo celular y proliferando (Zamanian y cols., 2012). Otra alternativa es que progenitores de astrocitos, que tengan capacidad proliferativa, migren a la zona del daño

y generen el aumento en el número de astrocitos (Zhao y cols., 2009). Otro reporte descarta totalmente que los astrocitos puedan migrar en respuesta a un daño inflamatorio, afirmando que frente a ese estímulo, astrocitos no migran, ni tampoco parecen proliferar de forma significativa en experimentos realizados *in vivo* (Bardehle y cols., 2013). Frente a los numerosos y contradictorios datos sobre la migración de astrocitos, es necesario considerar las diferencias entre los modelos de estudio y la generalización de los resultados.



**Figura 2. Migración celular.** La célula sufre una serie de cambios morfológicos y estructurales durante el proceso de migración celular. Primero, se polariza, reposiciona el aparato de Golgi y forma procesos

migratorios en el frente de avance, como filopodios y lamelipodios. Posteriormente, estas estructuras se estabilizan, para luego empezar con la contracción celular y la retracción de la cola, producto del rompimiento de las adhesiones focales de la parte trasera de la célula. Modificado de Pieta K. Mattila & Pekka Lappalainen, 2008. Nature Reviews Molecular Cell Biology.

Particularmente y como ya se mencionó, nuestro laboratorio recientemente ha descrito que la estimulación sostenida con Thy-1 induce la migración de los astrocitos DITNC<sub>1</sub> (Kong y cols., 2013). No obstante, tanto el aumento de las adhesiones focales como la migración inducidos por Thy-1 en astrocitos DITNC<sub>1</sub> no ha podido ser replicado en un modelo celular de astrocitos de cultivo primario. Investigaciones más recientes de nuestro laboratorio indican que los astrocitos primarios expresan el receptor de Thy-1, Integrina  $\beta$ 3, en muy baja cantidad. La expresión de este receptor, en concordancia a lo descrito en literatura para situaciones de derrame cerebral inducido (Ellison y cols., 2009), se ha logrado aumentar en condiciones inflamatorias, particularmente tras incubar las células con citoquinas proinflamatorias (resultados no publicados). Sin embargo, si los astrocitos de cultivo primario son capaces de migrar en respuesta al estímulo con Thy-1 luego del tratamiento con agentes pro-inflamatorios, es una pregunta que aún no ha sido contestada. Tampoco se ha demostrado si la migración de astrocitos inducida por Thy-1 requiere de ATP extracelular y del receptor P2X7.

### **3.4. ATP y mecanismos de salida de ATP desde el astrocito.**

Se ha señalado previamente que el ATP extracelular es necesario para el aumento de adhesiones focales inducido por Thy-1 (Henriquez y cols, 2011). El ATP es históricamente conocido por su papel en el metabolismo energético celular y en la regulación de la actividad enzimática, entre otras cosas; pero, siempre muestra un papel intracelular, y su función como molécula extracelular tiene una vida media más corta y más controvertida. La participación del ATP como primer mensajero fue ampliamente cuestionada en sus comienzos, pero la acumulación de evidencia responsabilizándolo de numerosos efectos sobre diversos tipos celulares así como también como gliotransmisor de astrocitos y regulador de la función neuronal (Newman, 2003, Fellin y cols, 2006), quimioattractante de macrófagos (Lambert y cols., 2010; Kawamura y cols., 2012), promotor de metástasis (Li y cols., 2013) o regulador de la contracción del músculo esquelético (Cea y cols., 2012; Riquelme y cols., 2013) han hecho desaparecer las aprehensiones sobre la función del ATP extracelular (Sperlagh y cols., 2006, Hamilton y cols., 2010).

Lo que aún es foco de investigación es cómo sale el ATP de las células al medio extracelular. En condiciones fisiológicas, se ha propuesto dos mecanismos generales de salida del ATP. El primero es a través de mecanismos exocíticos (Pangrsic y cols., 2007), el segundo, a través de los hemicanales, ya sea panexinas o conexinas (Bennett y cols., 2012). En

astrocitos, se ha mostrado que ambos mecanismos existen (Stout y cols., 2002; Pangrsic y cols., 2007; Thompson y cols., 2008) .

La salida de ATP por exocitosis involucra la formación de vesículas y su posterior fusión, dependiente de calcio, con la membrana plasmática. En general, la secreción de ATP ocurre en vesículas que contienen otros componentes, por ejemplo, péptidos, como el natriurético auricular, o glutamato (Pangrsic y cols., 2007). Estas vesículas siguen normalmente la ruta secretoria clásica de las células, aunque existen también casos donde la vesículas provienen de la ruta secretora del lisosoma (Zhang y cols., 2007).

Los hemicanales han sido profusamente estudiados en lo que respecta a la liberación de ATP. Las conexinas fueron las primeras moléculas a las que se responsabilizó de este fenómeno, hasta que en ratones donde la conexina más abundante (Conexina 43) había sido silenciada, se observó que otros hemicanales llamados panexinas también podían ser responsables por los aumentos extracelulares de ATP (Pelegri y cols., 2006; Iglesias y cols., 2009).

Las conexinas corresponden a canales que, tras interactuar con otras conexinas de células vecinas forman un canal intercelular, estableciendo una conexión entre los citoplasmas de ambas células (Thompson y cols., 2008). Esta estructura es denominada unión de tipo gap. Posteriormente, se describió que las conexinas pueden tener funciones aún en ausencia de unión a otras células, actuando como un canal que conecta el citoplasma con el medio extracelular. Estos canales son inespecíficos y funcionan por

exclusión de tamaño, dejando pasar moléculas de variados tamaños dependiendo de la conexina implicada, pero que pueden comprender algunos azúcares, péptidos pequeños, glutamato o ATP (Bennett y cols., 2012).

Las panexinas son las proteínas homólogas en vertebrados para los hemicanales de invertebrados, llamados inexinas. Las panexinas funcionan como canales transmembrana y permiten el paso de moléculas pequeñas como ATP (Thompson y cols., 2008). Además, se ha descrito ampliamente en la literatura que Panexina 1 trabaja en conjunto con receptores purinérgicos como el P2X7, permitiendo la salida de ATP en cantidades suficientes para activar los receptores (Pelegri, 2008; Bennett y cols., 2012). Se han descrito tres tipos distintos de panexinas, donde Panexina 1 es la más ubicua y más estudiada, mientras que Panexina 2 ha sido relacionada con diferenciación de neuronas y el desarrollo tumoral, Panexina 3 se ha visto envuelta en diferenciación de osteoblastos, condrocitos y transporte de semen (Penuela y cols., 2013).

Hemicanales de Conexina-43 se pueden abrir por los radicales libres, es decir, las especies reactivas del oxígeno, ROS, o especies reactivas de nitrógeno, RNS- ya que secuestradores de ROS / RNS reducen la captación de Lucifer Yellow y bromuro de etidio en astrocitos primarios (Orellana, 2013; Contreras, 2002), dos colorantes que atraviesan las membranas celulares a través hemicanales abiertos (Ballatori, 1999; Contreras, 2002; Orellana, 2013; Retamal, 2006). Hemicanales de Panexina 1 también pueden ser

activados por la generación de ROS / RNS, como se demuestra por la salida de calceína de neuronas bajo privación de glucosa e inhibición metabólica (Zhang, 2008; Vuyst, 2009). El calcio es un regulador clave de la función mitocondrial y controla a este organelo para la producción de ATP y ROS (Brookes, 2004). Por lo tanto, se sugiere que el aumento de la concentración de calcio intracelular podría dar lugar a una respuesta de estrés oxidativo (Zhang, 2008; Myers, 2009; Vuyst, 2009), que luego activaría conexinas y panexinas (Orellana, 2013; De Vuyst, 2009; Zhang, 2008).

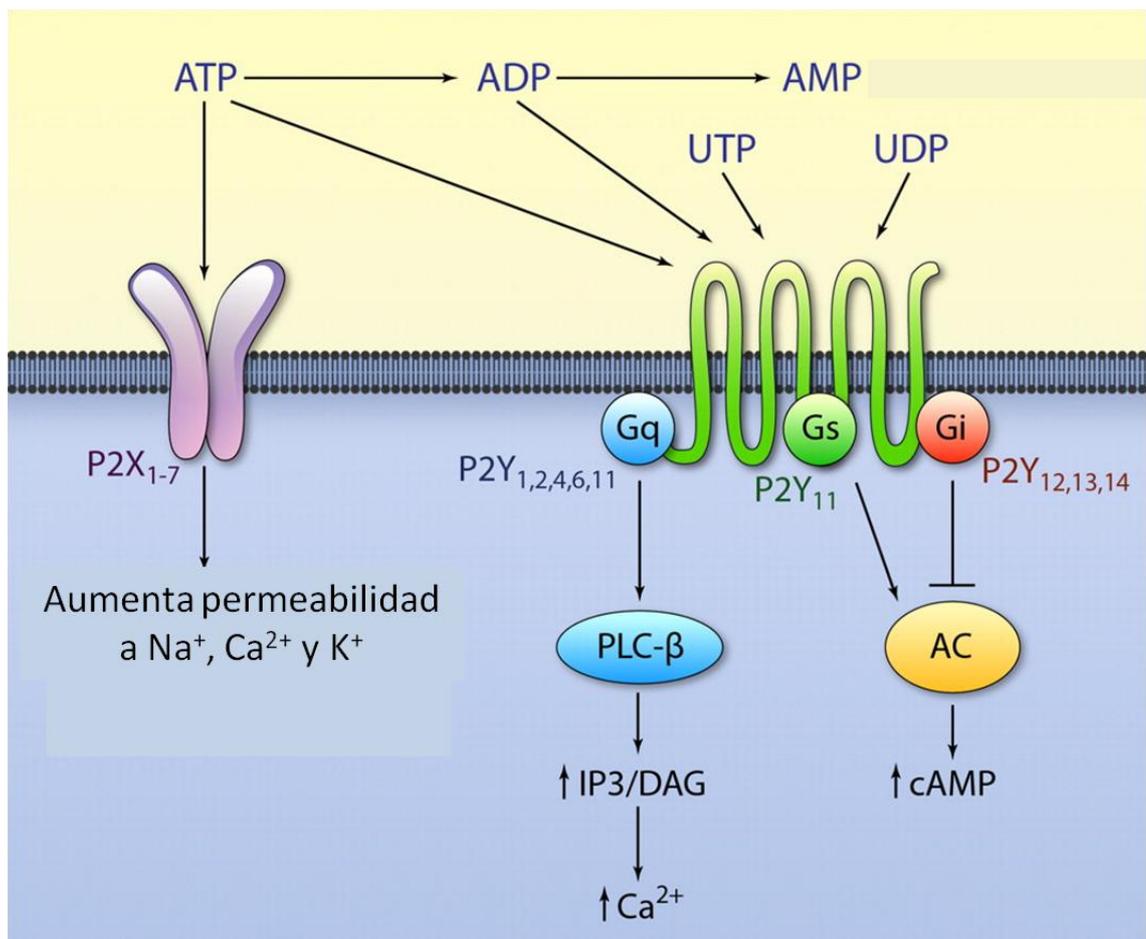
Los hemicanales a través de la liberación de ATP pueden activar receptores purinérgicos, moléculas que también han sido relacionadas con la migración celular. En particular, para panexinas se les ha relacionado con la quimioatracción por ATP que produce el movimiento de neutrófilos o leucocitos (Gregory y cols., 2011; Bao y cols., 2013). En lo que respecta a conexinas, hay mucha más información disponible. Se sabe que la presencia de diferentes conexinas es necesaria para la migración e invasión de células tumorales (Ghosh y cols., 2013; Zucker y cols., 2013), para la migración de fibroblastos venosos (Mendoza-Naranjo, 2012) y también de neuronas durante el desarrollo (Liu y cols., 2012), entre otros tipos celulares. Este efecto promigratorio podría no depender de la capacidad de las conexinas de formar un poro sino que en algunos casos, como el de la Conexina 43 en fibroblastos, su dominio C-terminal puede interactuar y modificar el citoesqueleto y la dinámica de las tubulinas, así como la polaridad celular (Kameritsch y cols., 2012). Particularmente en astrocitos, la Conexina 43 es

requerida para la migración de estas células en condiciones de inflamación y astrogliosis, sumado a lo anterior, se ha propuesto su interacción con diversas proteínas del citoesqueleto, como  $\beta$ -Actina y GFAP en este tipo celular (Olk y cols., 2010).

### **3.5. Receptor P2X7**

Los receptores purinérgicos son receptores para nucleótidos como ATP, UTP o ADP, entre otros. Se dividen en dos grandes grupos, los P2Y y los P2X. Los P2Y corresponden a receptores acoplados a diversas proteínas G, mientras que los P2X son canales iónicos que aumentan su probabilidad de apertura en presencia de los ligandos mencionados (North, 2002) (Figura 3). Dentro de los receptores P2X, el receptor P2X7 (P2X7R) aparece con características distintas al resto de los miembros de este grupo, posee una baja afinidad por el ATP-Mg (forma en que el ATP se presenta mayormente) y una mayor afinidad por ATP<sup>-2</sup> y por otros ligandos como BzATP (Takenouchi y cols., 2010). La formación de heterodímeros con otras subunidades P2X, como sí se encuentra para el resto de los subtipos de receptores purinérgicos no se ha demostrado para P2X7 (North, 2002). Principalmente, P2X7 es permeable a iones como Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>, posee la menor afinidad por ATP, ubicándose en el rango de 100  $\mu$ M, y al menos un orden de magnitud más de afinidad de BzATP, un análogo no hidrolizable del ATP. Además presenta una muy lenta desensibilización frente a ligandos y su prolongada activación conduce a la formación de un gran poro que

permite la entrada de moléculas de hasta 900 Da (Takenouchi y cols, 2010). Además, este receptor posee un gran dominio C-terminal intracelular que le permite ejercer funciones de regulador e iniciador de vías de transducción de señales donde participan Akt (Jacques-Silva y cols., 2004) o FAK (Yu y cols., 2010), rutas distintas a las activadas por cambios en la permeabilidad a iones como  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 3. Receptores purinérgicos.** ATP actúa como ligando extracelular sobre sus receptores P2X, receptores ionotrópicos, y P2Y, receptores metabotrópicos. Estos últimos pueden ser activados además por otros nucleótidos como ADP, UTP y UDP. (Modificado de Yang y Liang, 2012, Circulation Research).

El receptor P2X7 tiene una masa cercana a los 72 kDa, puede tener modificaciones glicosídicas y presenta una baja homología respecto a las secuencias de otros P2X (cercana al 30 %). En general, es una molécula ampliamente expresada en variados tejidos, como linfocitos, macrófagos, células epiteliales, células del músculo liso, eritrocitos, neuronas y astrocitos (North, 2002). Funcionalmente, este receptor se relaciona con amplias funciones celulares, por ejemplo, ha sido involucrado en muerte celular cuando la apertura del poro se prolonga en el tiempo, o en mecanismos de sobrevida, cuando la respuesta es acotada en el tiempo (Raymond y Le Stunff, 2006). La muerte celular gatillada por el P2X7R puede ocurrir tanto por apoptosis, por poseer dominios de unión a caspasas, como necrosis, por provocar aumento de síntesis de cerámidas y de producción de ROS mitocondrial (Raymond y Le Stunff, 2006)

En el SNC, el P2X7R ha sido relacionado con la protección de la función neuronal, con la actividad inflamatoria y liberadora de citoquinas de la microglía. Además, regula la comunicación entre neuronas y astrocitos, por ejemplo, influyendo en la liberación de glutamato hacia el medio extracelular o participando en la comunicación mediada por las ondas de calcio intercelulares entre distintos astrocitos y entre neuronas y astrocitos (Sperlagh y cols, 2006).

P2X7R puede interactuar con quinasas como Akt, FAK, proteínas del citoesqueleto como  $\beta$ -actina (Pffeifer y cols, 2004) o estructurales como  $\alpha$ -actinina o Integrina  $\beta$ 2 (Kim y cols., 2001) a través de su dominio C-terminal,

relacionándose por ello con estructuras de adhesión celular. Esto concuerda con los resultados informados por nuestro laboratorio, donde la presencia y activación del receptor P2X7 en astrocitos son necesarias para el aumento del área e incremento en el número de las adhesiones focales inducidas por Thy-1 (Henriquez y cols, 2011).

P2X7R no solo ha sido relacionado con estructuras de adhesión, sino que también con la migración celular. En células del sistema inmune se ha descrito que el desplazamiento de neutrófilos hacia la señal quimioattractante de ATP extracelular liberado por macrófagos, requiere del receptor P2X7 (Kawamura y cols., 2012). El receptor también es requerido para que células tumorales tengan capacidad invasiva de tejidos (Ren y cols., 2010; Ryu y cols., 2011; Jelassi y cols., 2013). En otros tipos celulares, como células epiteliales de córnea, se ha visto que la estimulación de las células con BzATP, agonista del P2X7R, induce la migración en un ensayo de cierre de herida (Mayo y cols., 2011). Resultados similares se han obtenido con células de glioma estimuladas con BzATP (Wei y cols., 2008). Por el contrario, P2X7R participa en la inhibición de la migración de fibroblastos en modelos de enfermedad inflamatoria cardiaca (Kumagai y cols., 2013). Por ello es importante aclarar el posible rol de P2X7R en la migración de astrocitos inducida por Thy-1.

Existen aún numerosas interrogantes que deben ser respondidas para entender el funcionamiento de la interacción de Thy-1 con sus receptores en

astrocitos. En particular, se desconoce cómo la interacción de Thy-1 con sus receptores induce la salida de ATP desde el astrocito, qué mecanismos moleculares están involucrados y cómo esto afecta la respuesta a Thy-1 de los astrocitos. Tampoco está claro si la migración de los astrocitos inducida por Thy-1 requiere de ATP y de la activación del receptor P2X7. Por último, queda por conocer si los astrocitos de cultivo primario son capaces de responder a Thy-1 en forma similar a como lo hacen los astrocitos DITNC<sub>1</sub>. Importantemente, la relación entre P2X7R y Síndecan-4 en la migración celular no ha sido estudiada.

#### **4. HIPÓTESIS**

La respuesta de migración de astrocitos inducida por la interacción Thy-1/Integrina  $\alpha\beta3$  y de Thy-1/Síndecán-4 en un contexto de inflamación por daño celular requiere de un aumento del ATP extracelular y la activación de P2X7R.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los mecanismos moleculares por los cuales la unión de Thy-1 con sus receptores en astrocitos induce la participación de P2X7R, comprobando que la antagonización de estos receptores impide la migración de los astrocitos en un modelo de inflamación por herida.

#### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

5.1.1. Estudiar rutas involucradas en los cambios en niveles extracelulares de ATP gatillado por la unión de Thy-1 con la Integrina  $\alpha\beta3$  y con Síndecán-4.

5.1.2. Dilucidar la función de P2X7R activado en la formación de adhesiones focales.

5.1.3. Estudiar en un modelo de inflamación por herida si el antagonista de P2X7R, BBG, y el bloqueo de la interacción Thy-1/Integrina  $\alpha\beta3$  disminuyen la migración de los astrocitos.

5.1.4. Estudiar la capacidad de astrocitos primarios de responder a Thy-1 y evaluar el aumento en la expresión de P2X7R frente a un estímulo inflamatorio en astrocitos no reactivos.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Cultivo de células DI-TNC1**

Los astrocitos DI-TNC1 (ATCC, CRL-2005) son una línea celular obtenida desde cultivo primario de astrocitos tipo I, procedentes de diencéfalo de rata. Se cultivaron células de pasajes altos en placas que contenían medio RPMI suplementado con 5 % de SFB (Hyclone), 0.1 mM de 2-mercaptoetanol, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Para subcultivar, las células se lavaron con PBS y luego se trataron con tripsina 0.25 %/EDTA por 5 minutos a 37°C. Se agregó medio fresco a las células, estas se resuspendieron con pipeta de vidrio estéril y se realizó su conteo con azul de tripano para diluir en medio fresco el número de células que se requiere para cada experimento.

### **6.2. Cultivo primario de astrocitos**

Los astrocitos primarios fueron obtenidos a partir de cortezas de cerebros de ratas de 24 a 48 horas de vida. Las cortezas fueron separadas de sus meninges, vasos sanguíneos e hipocampos. El tejido fue fragmentado con bisturí, digerido con tripsina 0.25%/EDTA y disociado con pipetas Pasteur de diámetro de punta ancha y luego de punta delgada y las células disgregadas fueron sembradas en placas de 100 mm previamente tratadas con poli-L-lisina durante toda la noche. Se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Biological Industries), 100 U/mL de penicilina y 100 g/mL de estreptomycin. Luego de 14 días de

cultivo se observaron mayoritariamente astrocitos y microglías. Se extrajo las microglías contaminantes usando un agitador orbital y la adición de tripsina 0,125%/EDTA e incubadas a 37°C. La monocapa de astrocitos remanente en la placa fue lavada con PBS y tratada con 800 µL de tripsina 0.25 %/EDTA. Finalmente, los astrocitos fueron contados en cámara de Neubauer con azul de tripano 0,5 % y sembrados a una densidad dependiente de cada experimento.

### **6.3. Preparación de cubreobjetos para siembra de astrocitos de cultivo primario.**

Los cubreobjetos de 12 mm o 25 mm, según corresponda, fueron tratados previos a la siembra de astrocitos de cultivo primario con poli-L-lisina durante 16 horas. Luego se lavaron con agua nanopura estéril por 15 minutos, repitiéndose el lavado tres veces más. Posterior al lavado, se extrae toda el agua y se procede a realizar la siembra de las células.

### **6.4. Preparación de Thy-1-Fc y estimulación**

La proteína de fusión Thy-1-Fc fue obtenida de acuerdo a lo publicado (Leyton y cols, 2001). Tanto Thy-1-Fc como las versiones mutantes en sitio de unión a Integrina (RLE) y en sitio de unión a Síndecan-4 (AEAAA), fueron previamente incubadas con Proteína A Sefarosa, en la proporción 10:1 en un volumen mínimo de 400 µL completado con PBS, durante 1 hora a 4° C, con suaves agitaciones, antes de ser utilizadas como estímulo.

### **6.5. Medición de ATP extracelular**

Astrocitos DITNC<sub>1</sub> (50.000 células en 50 uL de medio RPMI sin suero por tubo de 1,5 ml) fueron estimulados con 1:0,1 µg de Thy-1-Fc:Proteína A durante 10 minutos, salvo que se indique lo contrario; posteriormente, las muestras fueron centrifugadas 5 minutos a 800xg. Luego se tomó medio del sobrenadante, el cual fue incubado en oscuridad durante 40 minutos con 20 µL de medio de reacción del kit Cell Titer Glo (Promega). Posteriormente, se realizó la lectura de la luminiscencia en Luminómetro Synergy2, Biotek, la medición en cada punto temporal o en cada condición se realizó en duplicado. Los valores de lectura obtenidos se interpolan en una curva de calibración realizada con distintas concentraciones de ATP preparado en el momento (curva: 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM).

### **6.6. Incorporación de Lucifer Yellow**

Astrocitos DITNC<sub>1</sub> (400.000 células en medio RPMI con 5 % FSB) fueron sembrados en placas de 25 mm. A las 24 horas, previa incubación con inhibidores según se describa, los astrocitos fueron estimulados 10 minutos con 8,8 µg de Thy-1-Fc:Proteína A. Posteriormente, se les incubó, a 37 °C, con Lucifer Yellow 0,5 mg/mL diluido en medio amortiguador Hepes 5 mM pH 7.4 (Solución Ringer: NaCl 155 mM, KCl 4,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Hepes 5 mM pH 7.4, Glucosa 10 mM) por 10 minutos, luego se lavó dos veces con solución Ringer y se tomó fotografías en microscopio confocal con lente 40x. Se cuantificó intensidad de fluorescencia en unidades

relativas con el programa ImageJ (NIH) usando el plug-in ROI, la cuantificación corresponde a 50 células por condición por cada experimento independiente. La sonda fue excitada a 458 nm y emitió entre 500 y 530 nm.

### **6.7. Formación de adhesiones focales**

Astrocitos DITNC<sub>1</sub> sembrados en cubreobjetos de 12 mm fueron estimulados con células de la línea tipo neuronal CAD (300.000 células por cubreobjeto, en 500 uL de medio RPMI sin suero), con BzATP a las concentraciones señaladas o con Thy-1-Fc-Proteína A (4 µg por cubreobjeto). En los casos que se señalan, las células fueron incubadas previamente al estímulo con BBG o oATP a las concentraciones señaladas. Posteriormente los astrocitos se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer PIPES 100 mM pH 7.6 (KOH 40 mM, EGTA 2 mM y MgCl<sub>2</sub>) 10 minutos, permeabilizadas con Tritón 0,1 % en buffer universal (buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.6 con NaCl 150 mM y Azida 0,1 %) durante 10 minutos, bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA 2 % en buffer universal e incubadas durante 1 hora con anticuerpo anti-vinculina para marcar adhesiones focales y con faloidina-rodamina para marcar citoesqueleto de actina. Las muestras se observaron en microscopio Olympus IX 81 DSU objetivo 60X, se fotografiaron con cámara XM10, y el número y área de adhesiones focales se contabilizó en 100 células por condición por cada experimento independiente, de acuerdo al método previamente descrito (Avalos, 2009).

## **6.8. Transfección de células por método de nucleofección**

Astroцитos DITNC1 o astroцитos de cultivo primario, según corresponda fueron transfectados siguiendo instrucciones del fabricante Amaxa. Brevemente, 400.000 células en suspensión fueron mezcladas con reactivo de transfección proporcionado por el fabricante (Amaxa Cell Line NucleofectorKit V); posteriormente, fueron sometidas a corriente eléctrica de acuerdo a programa diseñado por el fabricante para astroцитos (programa T-20). Luego, las células fueron sembradas en placas de cultivo de acuerdo a su uso posterior. Para silenciar a la Integrina  $\beta 3$  se utilizó un “smart pool” (Ambion) mientras que el plasmidio para la sobreexpresión fue una donación (por el Dr C. Rüegg, Universidad de Fribourg, Suiza) . Para transfecciones de siRNA contra Integrina  $\beta 3$  o siRNA control negativo se utilizó 300 nM del siRNA; para transfecciones con plasmidio que expresa eGFP o eGFP-Integrina  $\beta 3$  se utilizó 1  $\mu$ g de ADN.

## **6.9. Ensayos de polaridad**

Astroцитos corticales obtenidos de cultivo primario fueron sembrados en cubreobjetos de 12 mm (10.000 células en medio DMEM-F12, 10 % FSB), posteriormente fueron tratados por 48 horas, a 37 °C en incubadora con 5 % CO<sub>2</sub>, con TNF $\alpha$  10 ng/mL, preparado en medio de cultivo DMEM-F12 y estimulados durante 5 horas con BzATP a las concentraciones señaladas o con Thy-1-Fc-Proteína A (4  $\mu$ g por cubreobjeto). Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en buffer PIPES 100 mM pH 6.8 (KOH 40 mM, EGTA 2 mM y MgCl<sub>2</sub>) durante 10 minutos, permeabilizadas

con Tritón 0,1 % en buffer universal por 10 minutos y bloqueadas durante 1 hora con BSA 2 % en buffer universal. Luego, fueron incubadas, primero con anticuerpo anti-Giantina (dilución 1:200) y luego, con anticuerpo secundario anti conejo acoplado a FITC (1:200) y faloidina-rodamina (1:1000) durante 1 hora a 37 °C. La observación se realizó en microscopio Olympus IX 81 DSU objetivo 40X y las células se fotografiaron con cámara XM10. Astrocitos de línea celular DITNC<sub>1</sub>, sembrados en cubreobjetos de 12 mm fueron estimulados durante 7 horas con BzATP a las concentraciones señaladas o con Thy-1-Fc-Proteína A (4 µg por cubreobjeto) y sometidos al mismo procedimiento experimental. Para la cuantificación se contaron 100 células por condición por experimento independiente. Se consideró una célula polarizada a aquella cuyo aparato de Golgi estaba orientado entre el núcleo y la zona de la herida.

#### **6.10. Medición de calcio intracelular**

Astrocitos de cultivo primario fueron sembrados en cubreobjetos de 25 mm de diámetro (400.000 células en medio DMEM-F12, 10 % FSB), que habían sido tratados previamente con Poli-L-lisina por 16 horas días previos al experimento. Las células fueron tratadas, previo al experimento y después de 24 horas desde la siembra, por 48 horas con TNF $\alpha$ . En el día del experimento, las células fueron incubadas 40 minutos con la sonda Fluo-4-AM 5 µM disuelta en medio Ringer sin magnesio a 37 °C en incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 %. Posteriormente, las células fueron lavadas suavemente con el mismo medio sin sonda, medio en el que se realizaron las mediciones. Los

experimentos fueron hechos en microscopio Olympus IX 81 DSU objetivo 40X, con laser de excitación a 488 nm y captándose la emisión en un rango entre 515 – 550 nm. Las fotografías fueron tomadas cada 2 segundos, habitualmente los estímulos fueron agregados en la foto 20 y se continuó tomando fotos durante 15 minutos. Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron sembrados en cubreobjetos de 25 mm de diámetro y sometidos al mismo procedimiento durante el experimento que los astrocitos primarios. La fluorescencia se cuantificó con el programa ImageJ (NIH) en 50 células por condición por tiempo de estímulo.

#### **6.11. Obtención de extractos celulares y estimulación con TNF $\alpha$**

En placas de 6 centímetros se sembraron astrocitos de cultivo primario (1.000.000 de células en medio DMEM-F12, 10 % FSB) para obtener extractos celulares para Western blot. Se les agregó medio con TNF $\alpha$  10 ng/mL y se incubaron a 37°C por distintos tiempos: 0, 2, 8, 24 y 48 horas. Una vez cumplido el periodo de incubación, se lavaron las células dos veces con PBS frío y se extrajeron las proteínas con buffer RIPA (buffer Tris-OH 10 mM pH 7,2, Tritón X-100 1 %, desoxicolato de sodio 1 %, SDS 0,1 %, NaCl 150 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, EDTA 5 mM más inhibidores de proteasas, leupeptina 12.5  $\mu$ g/mL, antipaína 10  $\mu$ g/ml y benzamidina 100  $\mu$ g/ml). Las muestras fueron incubadas a 4° C en el buffer durante 20 minutos y posteriormente, sonicadas 3 veces por 3 segundos, a 75 watts. Por último, se sometieron a centrifugación, durante 15 minutos a 12.000 x g, conservándose el sobrenadante.

## 6.12. Western blots

Las proteínas de las muestras fueron cuantificadas por el método BCA (Pierce). Posteriormente las muestras se desnaturalaron, 30-50  $\mu\text{g}$  de proteínas totales en buffer de carga a 100 °C por 5 minutos. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida al 10 % a 70 V por 60 minutos y a 110 V por 90 minutos, utilizando buffer de corrida (Tris 25 mM, glicina 0,23 M pH 8,3 y SDS 0.1 %). Luego, las proteínas se electrotransfirieron en buffer de transferencia (Tris 25 mM; glicina 0,23M pH 8.3 y metanol 20%), a una membrana de nitrocelulosa a 115 V por 95 minutos, en hielo. Las proteínas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau (solución acuosa con 0,3 % Rojo Ponceau y 0,5 % Acido Acético). Las membranas se lavaron con PBS y se bloquearon con 5% de leche por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron a 4°C toda la noche con anticuerpo  $\alpha$ -P2X7R (1:1000, conejo), o anticuerpo  $\alpha$ -GFAP (1:2000, conejo), o anticuerpo  $\alpha$ -Integrina  $\beta$ 3 (1:1000, conejo) o durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo  $\alpha$ -actina (1:3000, conejo). Las membranas se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo acoplado a HRPO (1:5000) por 1 hora. Se detectó la presencia de HRPO utilizando el sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL) y se fotografió con un sistema de captura digital Ultralum Discovery 12i. Las imágenes se trataron para invertir colores y recortar imagenes con software PhotoShop y se analizaron con software Un-Scan-It gel 6.1 (Silk Scientific Corporation, Utah, USA).

### **6.13 Ensayo de cierre de herida**

Los astrocitos fueron sembrados en placas de 24 pocillos, cuando alcanzaron aproximadamente un 90 % de confluencia, se realizó 2 heridas paralelas entre sí por pocillo. Se lavó las células y tras 30 minutos de privación de suero se estimularon de acuerdo a lo señalado en cada experimento en particular. En el caso del uso de inhibidores, estos fueron agregados después de realizar la herida, concomitantemente a la privación de suero, y permanecen en el medio con las células por las 24 horas que dura el experimento. Se tomó 10 fotos por herida a los tiempos de 0 hora y 24 horas, posteriormente el área que permanece libre de células fue medida en cada foto con el programa ImageJ (Veteada, NIH, USA).

### **6.14. Análisis estadístico y expresión de resultados**

Los resultados obtenidos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes (salvo se indique lo contrario). Los resultados se comparan utilizando el test Anova de una vía y post test de Tukey. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

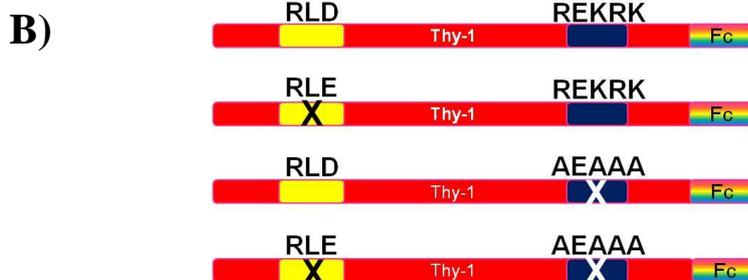
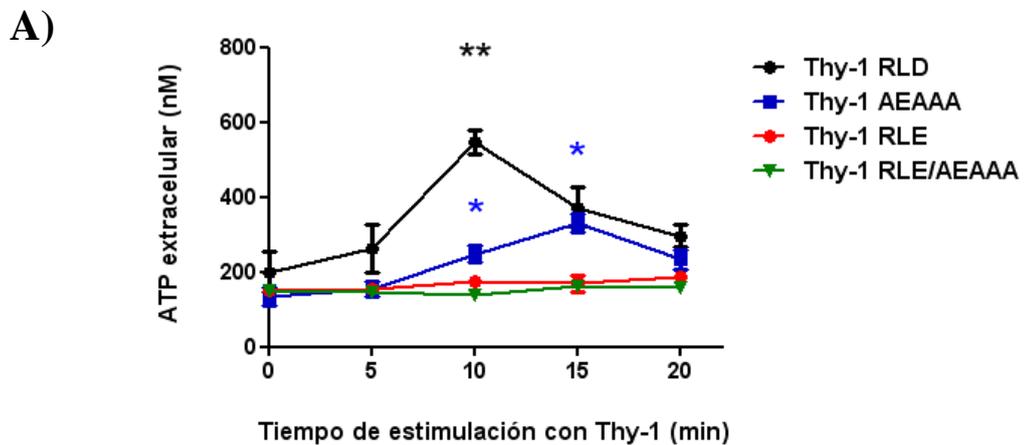
## 7. RESULTADOS

### **7.1. Objetivos Específico 1. Estudiar rutas involucradas en los cambios en niveles extracelulares de ATP gatillados por la unión de Thy-1 con la Integrina $\alpha\beta3$ y con Síndecan-4.**

Nuestro laboratorio ha descrito que la estimulación de los astrocitos DITNC<sub>1</sub> con Thy-1 induce cambios en los niveles extracelulares de ATP alcanzando un máximo valor a los 10 minutos de estimulación (Henriquez y cols., 2011). Repetimos esta cinética de estimulación con Thy-1 a 0, 5, 10, 15 y 20 minutos y, al igual que lo descrito anteriormente, nuestros resultados señalan que los niveles extracelulares de ATP aumentan con el tiempo hasta los 10 minutos de estimulación con Thy-1 para luego decaer a los 15 y 20 minutos (Figura 4A, línea negra). De acuerdo a esto, para experimentos posteriores, se utilizó 10 minutos como tiempo de estimulación, debido a que es el tiempo en que se observa una diferencia significativamente distinta con la condición basal (tiempo 0 minuto).

Thy-1 posee dos dominios de unión necesarios para inducir adhesión y migración de los astrocitos (Avalos y cols., 2009; Kong y cols, 2013). Para estudiar el papel de estos dominios en la inducción de los cambios extracelulares de ATP se estimuló a los astrocitos DITNC<sub>1</sub> con Thy-1 mutado en el sitio de unión a Integrina  $\alpha\beta3$  (RLD ->RLE), el sitio de unión a Heparina (REK RK ->AEAAA) o en ambos sitios (Figura 4B). Se observó que

la mutación en el sitio de unión a Integrina  $\alpha\beta3$  prácticamente no genera cambios en los niveles extracelulares de ATP, al igual que la versión de Thy-1 con ambas mutaciones (Figura 4A, líneas roja y verde). En tanto, la mutación del sitio de unión a Heparina alteró la respuesta a Thy-1 de los astrocitos, aumentando los niveles de ATP a los 15 minutos de estimulación, pero en una cantidad menor a la condición de estimulación con Thy-1 silvestre (Figura 4A, línea azul). En síntesis, Thy-1 induce aumento extracelular de ATP, y este efecto requiere de la presencia del sitio de unión a Integrina  $\alpha\beta3$  y depende de la presencia del sitio de unión a Heparina.



**Figura 4. Thy-1 induce el aumento extracelular de ATP en astrocitos.** A) Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron estimulados con las distintas mutantes de Thy-1-Fc-Proteína A durante el tiempo señalado. Se midieron los niveles de ATP en el sobrenadante de las células usando una reacción de quimioluminiscencia. Valores en el gráfico corresponden al promedio  $\pm$  error

estándar de  $n = 4$ . (\*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  comparado respecto a su tiempo 0) B) Esquema de la forma silvestre de Thy-1 (RLD/REKRK), Thy-1 mutado en el sitio de unión a Integrina (RLE/REKRK), Thy-1 mutado en el sitio de unión a Heparina (RLD/AEAAA) y Thy-1 con ambos sitios mutados (RLE/AEAAA) como proteínas de fusión que poseen además un fragmento Fc de IgG1 humana.

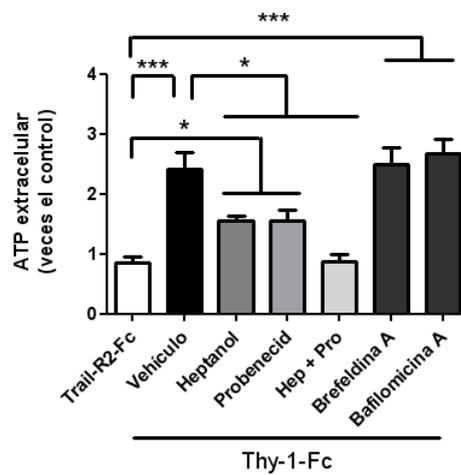
### **7.1.1. Rutas de Salida de ATP**

Para estudiar a través de qué ruta se libera el ATP desde los astrocitos DITNC<sub>1</sub> estimulados con Thy-1, se utilizó una serie de inhibidores farmacológicos de las dos rutas más probables de salida, hemicanales, ya sea a través de Panexinas y Conexinas, o exocitosis. Se utilizó el bloqueador de Conexinas Heptanol (500  $\mu\text{M}$ ), y el bloqueador de Panexinas Probenecid (1 mM). Ambos bloqueadores mostraron atenuar el aumento en los niveles extracelulares de ATP inducidos por Thy-1; no obstante, aún perduraba una diferencia significativa con la condición control negativo que corresponde a estimulación con Trail-R2-Fc. Para aclarar este punto se utilizó la mezcla de los inhibidores, la cual redujo hasta niveles basales la cantidad de ATP extracelular liberada por Thy-1 (Figura 5A).

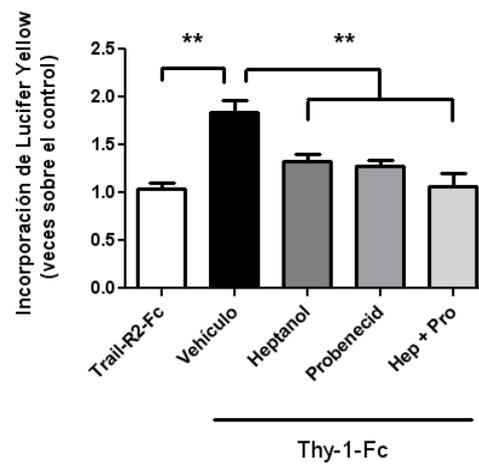
Para analizar la posible participación de la exocitosis en los cambios de ATP extracelular inducido por Thy-1 se utilizó inhibidores de la exocitosis como Brefeldina A (3  $\mu\text{g/mL}$ ) y Bafilomicina A (1  $\mu\text{M}$ ). Ninguno de estos compuestos afectó los niveles extracelulares de ATP que se observan al estimular con Thy-1, por lo que se descartó que la exocitosis estuviese involucrada en este fenómeno (Figura 5A).

Para confirmar los datos obtenidos con los bloqueadores de hemicanales se midió, como índice de la apertura de hemicanales, la incorporación de Lucifer Yellow por los astrocitos DITNC<sub>1</sub>. Se observó que la estimulación por 10 minutos con Thy-1 aumenta la incorporación de esta sonda fluorescente, la cual es atenuada por Probenecid y Heptanol y reducida a niveles basales por la mezcla de ambos inhibidores (Figura 5B y 5C).

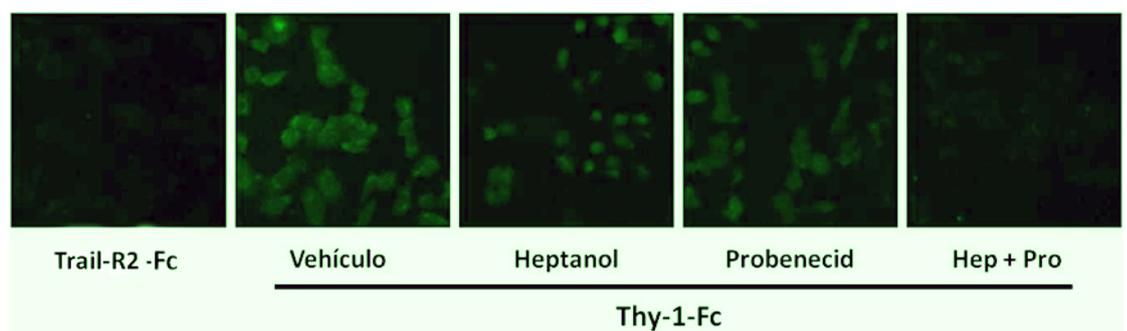
**A)**



**B)**



**C)**

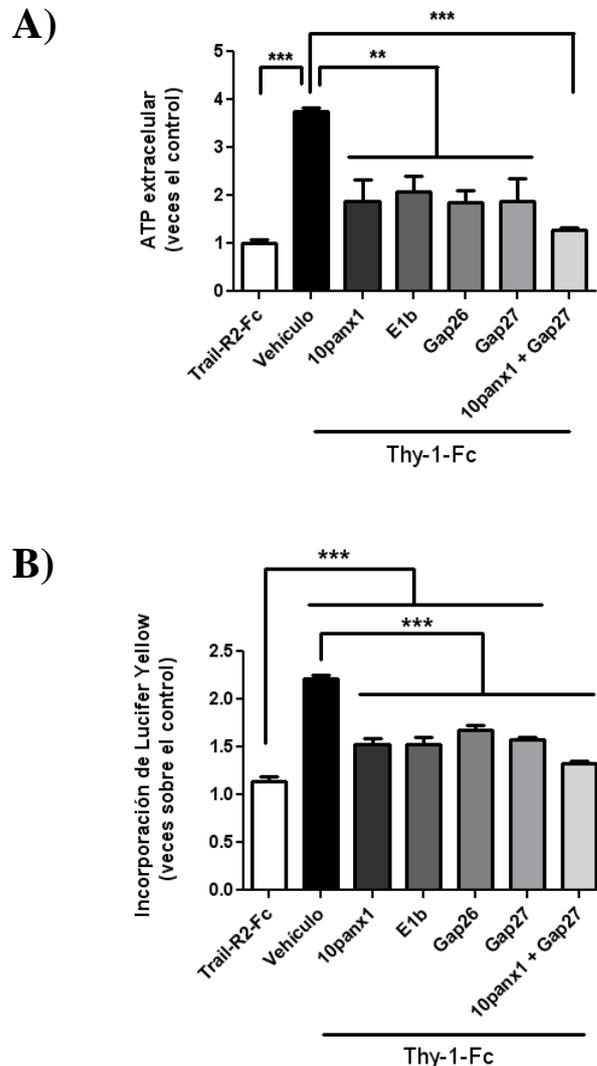


**Figura 5. Bloqueadores de hemicanales disminuyen los niveles extracelulares de ATP y la incorporación de Lucifer Yellow en astrocitos estimulados con Thy-1.** Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron incubados con los bloqueadores de hemicanales Heptanol (500  $\mu$ M), Probenecid (1 mM) o la mezcla de ambos por 30 minutos, previo y en conjunto a la estimulación con Thy-1. Brefeldina A (3  $\mu$ g/mL) y Bafilomicina A (1  $\mu$ M), como bloqueadores de la exocitosis, fueron utilizados por 4 horas. A) Niveles de ATP en medio extracelular de astrocitos DITNC<sub>1</sub> estimulados con Thy-1-Fc (1  $\mu$ g por cada 50.000 células) o con Trail-R2-Fc como control negativo. B) Incorporación de Lucifer Yellow, medida a través de la cuantificación de la fluorescencia intracelular. Valores indican el promedio  $\pm$  error estándar normalizado sobre la condición no estimulada (no mostrada), de 4 experimentos independientes. C) Imagen representativa de la incorporación de Lucifer Yellow. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ).

Para comprobar los resultados obtenidos con los inhibidores ya mencionados, se repitieron los experimentos anteriores utilizando como bloqueadores de hemicanales a los péptidos 10panx1 y E1b, específicos para Panexina 1 (Pelegrin y cols, 2006) y los péptidos Gap26 y Gap27 como bloqueadores de Conexina 43 (Evans y cols, 2001). Tanto para las cuantificaciones de los niveles de ATP extracelular (Figura 6A) como para la incorporación de Lucifer Yellow (Figura 6B) se observó los mismos resultados obtenidos con el uso de los bloqueadores de hemicanales, Probenecid y Heptanol. Las respuestas se inhiben bloqueando los hemicanales individualmente pero la inhibición es completa al bloquear ambos hemicanales al mismo tiempo.

De acuerdo a estos resultados, la salida de ATP inducida por Thy-1 se realizaría a través de ambos hemicanales, particularmente y dada la especificidad descrita para los inhibidores utilizados (Decrock y cols., 2009;

Pelegrin y Surprenant, 2006), los resultados sugieren a Conexina 43 y Panexina 1.



**Figura 6. Péptidos bloqueadores de hemicanales disminuyen el aumento extracelular de ATP y la incorporación de Lucifer Yellow inducida por Thy-1.** Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron tratados con los péptidos inhibidores bloqueadores de panexinas 10panx1 y E1b, así como los bloqueadores de conexinas Gap26 y Gap 27 o una mezcla de ellos durante 30 minutos, previo a la estimulación con Thy-1-Fc; como control negativo se usó Trail-R2-Fc, como vehículo se utilizó 0,001 % DMSO en PBS. A) Medición de niveles extracelulares de ATP. B) Incorporación de Lucifer Yellow. Promedio  $\pm$  error estándar de cuatro experimentos independientes (\*\*\*)  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

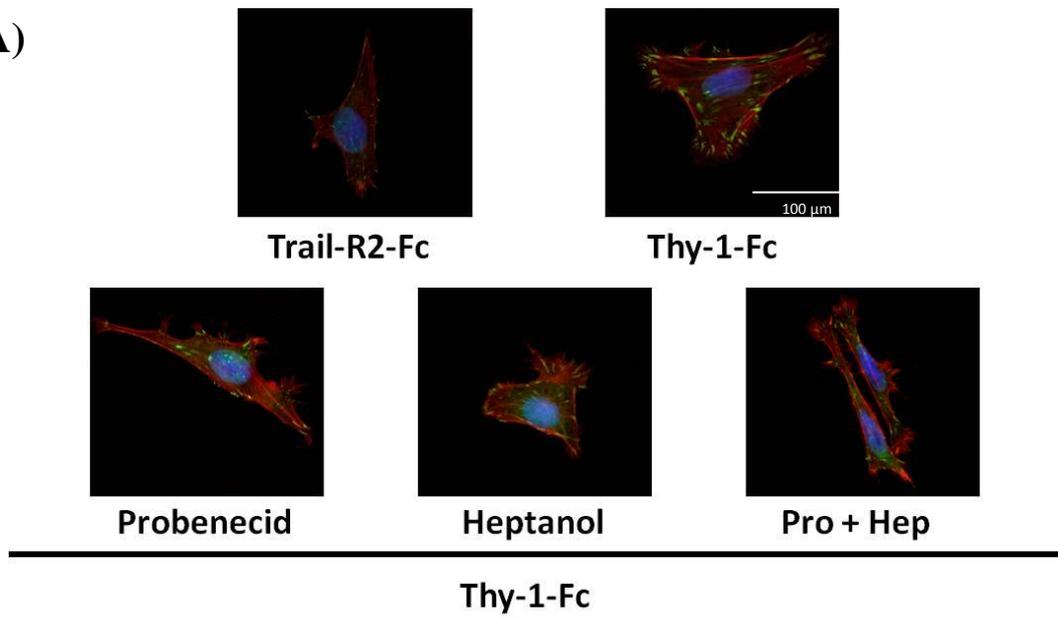
### **7.1.2. Efectos del bloqueo de hemicanales en las respuestas celulares inducidas por Thy-1 en astrocitos DITNC<sub>1</sub>**

Se estudió sí el bloqueo de los hemicanales afectaba dos respuestas inducidas por Thy-1 en los astrocitos y que, según lo descrito por nuestro laboratorio (Henriquez y cols., 2011), dependen de ATP; esto es, el aumento en el número de las adhesiones focales (Figura 7A) y el aumento intracelular de calcio (Figura 8A). Las adhesiones focales fueron identificadas por tinción de vinculina, además se tiñó la actina polimerizada presente en las fibras de estrés usando faloidina conjugada a rodamina y el núcleo fue marcado con la sonda DAPI.

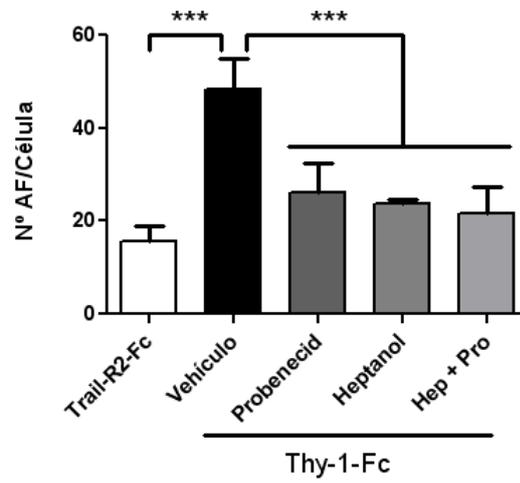
El uso de Probenecid y Heptanol o su mezcla, disminuyó significativamente el número de adhesiones focales por célula (Figura 7B), mientras que en el área promedio de las adhesiones focales se observó un efecto similar, tanto por parte de Heptanol como de Probenecid; sin embargo, la mezcla de ambos no mostró una diferencia significativa en la disminución del área, pero sí presentó una tendencia clara (Figura 7C). En tanto, las cinéticas de calcio inducidas por Thy-1 se ven afectadas por el uso de ambos inhibidores, pero solo disminuyendo a un 40% la señal observada en ausencia de los inhibidores (Figura 8B).

Estos resultados indican que la apertura de los hemicanales para la salida de ATP es necesaria para los cambios en las adhesiones focales y en las cinéticas de calcio inducidas por Thy-1 en los astrocitos.

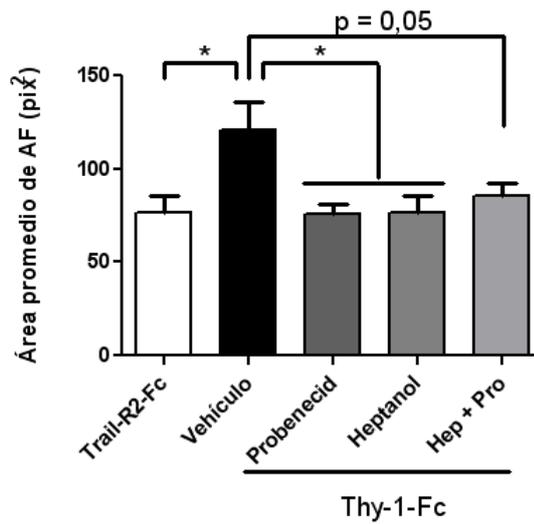
A)



B)

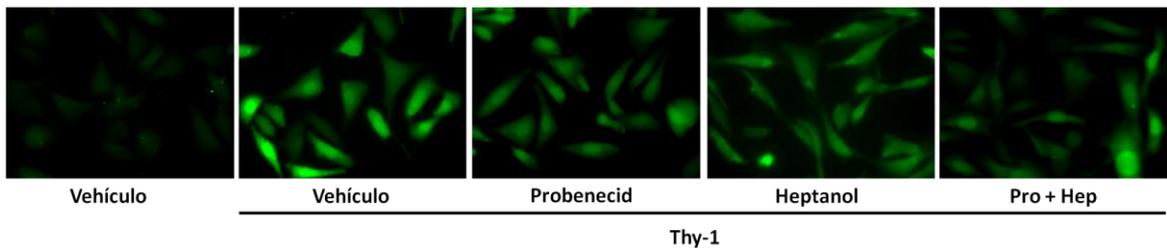


C)

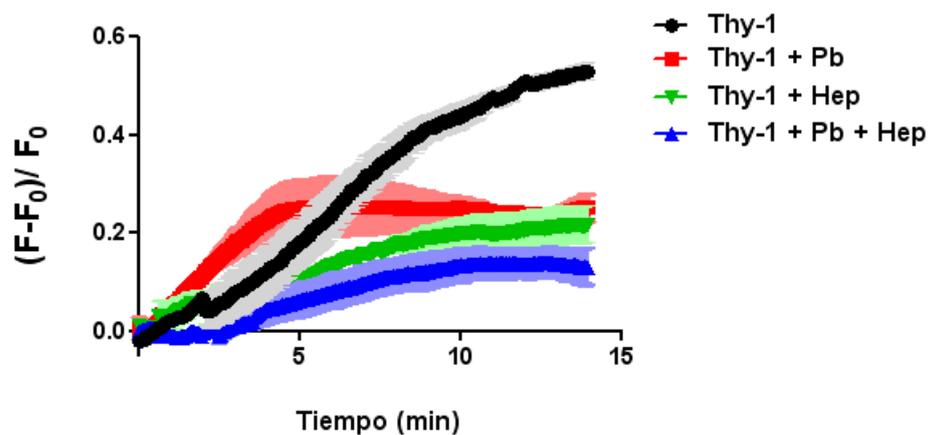


**Figura 7. Efecto de bloqueadores de hemicanales en el número y área de adhesiones focales inducidos por Thy-1.** Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron estimulados 15 minutos con 4,4 µg de Thy-1-Fc-Proteína A y donde corresponde, tratados previamente Probenecid (1 mM) o Heptanol (500 µM) o la mezcla de ambos. Posteriormente, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpo anti-vinculina (Verde), con Faloidina-Rodamina (Rojo) y DAPI (azul). A) Fotos representativas de la inmunofluorescencia indirecta B) Cuantificación del número de adhesiones focales promedio por célula. C) Cuantificación del área promedio de las adhesiones focales. Se muestra promedio de tres experimentos por cada condición ± error estándar. (\*\*\*) p < 0,001 y \* p < 0,05)

A)



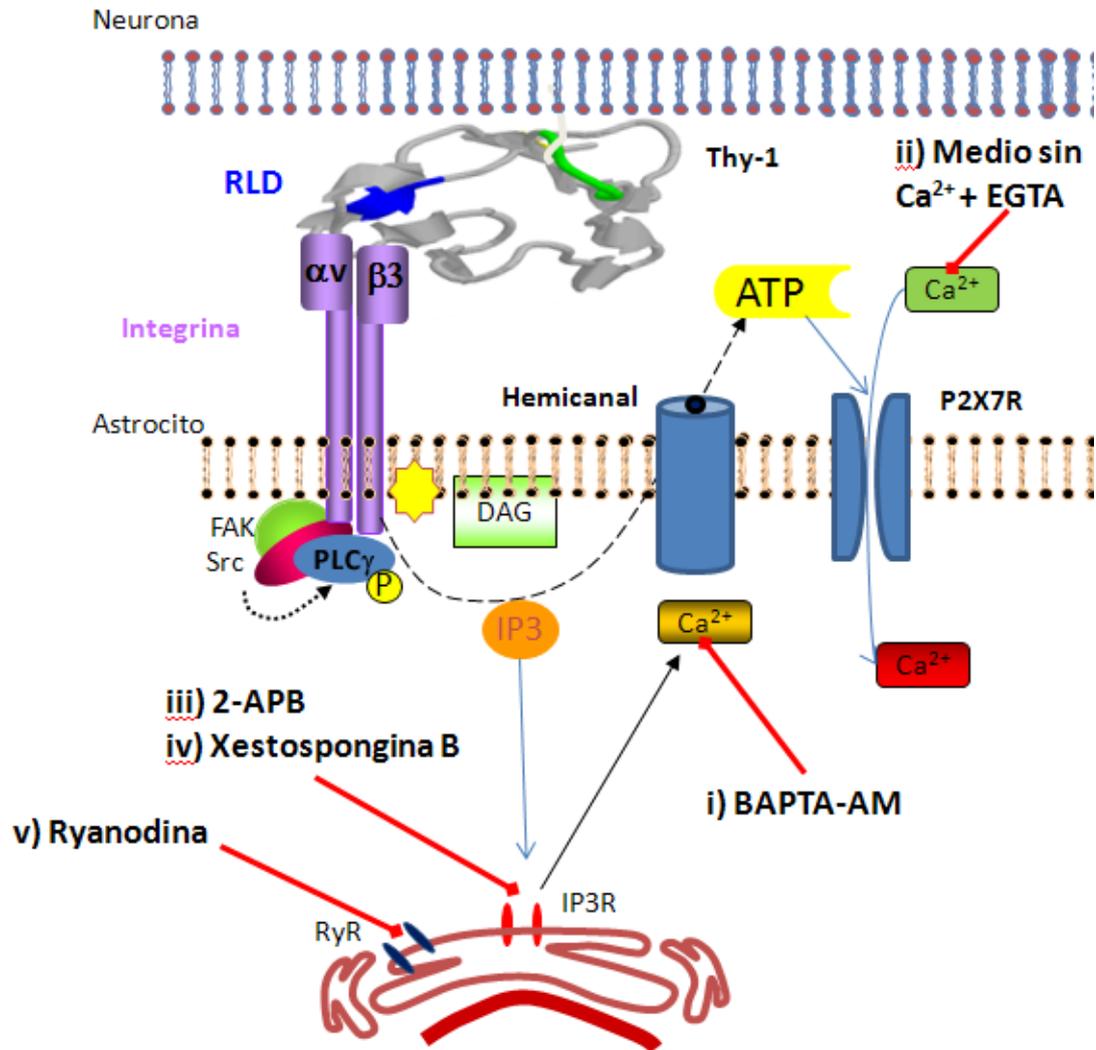
B)



**Figura 8. Cambios en la cinética de calcio inducida por Thy-1 requiere participación de los hemicanales.** Astrocitos DITNC-1 cargados con Fluo4-AM (5  $\mu$ M) durante 40 minutos a 37 °C fueron estimulados con 8,8  $\mu$ g de Thy-1-Fc-Proteína A y se midió cambios en la fluorescencia intracelular a 545 nm cada 2 segundos tras excitar la sonda a 488 nm. Las células fueron tratadas en conjunto con la sonda fluorescente y con Probenecid (1 mM) o Heptanol (500  $\mu$ M) o la mezcla de ambos durante 30 minutos. A) Imágenes representativas de cada condición a los 12 minutos de estimulación. B) Cuantificación del cambio de fluorescencia de Fluo4-AM, corresponde al promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 experimentos independientes.

### **7.1.3. Estudio de las rutas involucradas en la salida de ATP a través de hemicanales inducida por Thy-1**

En la sección de Introducción se describen las potenciales rutas que pueden estar involucradas en la apertura de hemicanales y salida de ATP. Algunas de estas rutas incluyen el calcio como un factor relevante. Por lo tanto, dados los niveles de calcio residuales observados en la figura 8B, cobró interés profundizar en el papel de este catión en los efectos provocados por Thy-1. Como se señaló previamente, la señal de calcio inducida por Thy-1 es solo parcialmente inhibida por los bloqueadores de conexinas y panexinas, por lo que no corresponde al aumento de calcio intracelular inducido por el aumento de ATP extracelular que media la apertura del canal de calcio P2X7R tras la estimulación con Thy-1 (Henriquez y cols., 2011). Para analizar cuál es el origen de este aumento de calcio, se utilizó distintos moduladores de las cinéticas de calcio, que se describen en la figura 9.



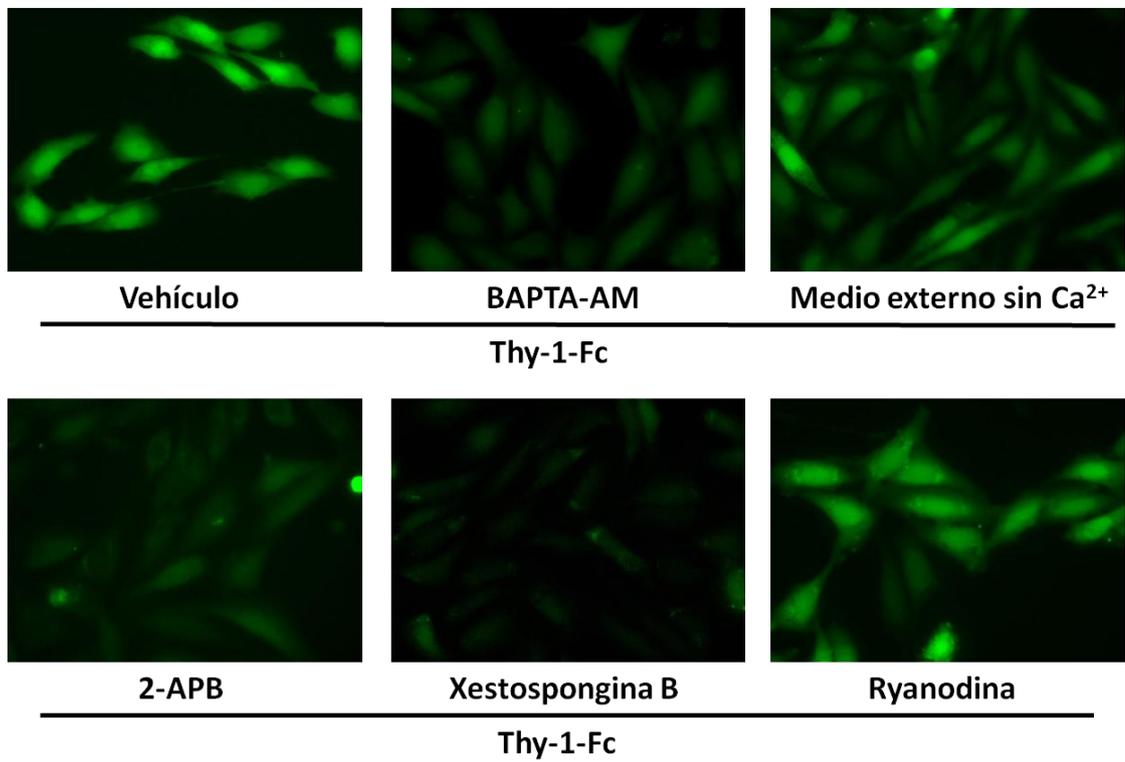
**Figura 9. Esquema de Sitios de acción de reguladores de cinéticas de calcio intracelular.** Este esquema muestra parte de las vías de señalización activada por Thy-1 Integrina que incluye aumentos intracelulares de calcio. Para analizar el origen intracelular de calcio se usó: i) Bapta-AM, quelante citoplasmático de calcio. ii) Medio Ringer sin calcio con EGTA como quelante de calcio residual del medio. iii) 2-APB, bloqueador del canal de calcio IP3R, iv) Xestospongina B, bloqueador del canal de calcio IP3R. v) Ryanodina, bloqueador del canal de calcio receptor de Ryanodina.

Para analizar un potencial origen intracelular de calcio se utilizó: i) como quelante intracelular de calcio a Bapta-AM, mientras que para estudiar un origen extracelular se utilizó ii) medio externo sin calcio y conteniendo EGTA. Los resultados muestran que Bapta-AM (5  $\mu$ M) apagó completamente la señal de calcio inducida por Thy-1, mientras que la estimulación con Thy-1 en medio externo sin calcio mostró una cinética similar a la de la figura 8B (Figura 10A y 10B). De acuerdo a esto, la señal residual de calcio observado luego de inhibir conexinas y panexinas debe provenir de fuentes intracelulares.

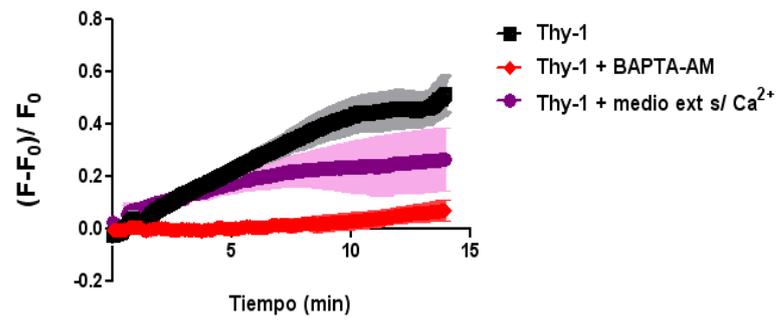
Potenciales fuentes intracelulares de calcio son los reservorios del retículo endoplásmico, particularmente existen dos vías principales por las cuales el calcio sale desde el retículo hacia el citoplasma, el canal de calcio receptor de Ryanodina (RyR) y el canal de calcio receptor de IP3 (IP3R). Para evaluar la participación de ambos canales se utilizó bloqueadores farmacológicos, Ryanodina a concentraciones inhibitorias (50  $\mu$ M) para el RyR y 2-APB y Xestospongina B para el IP3R (ver esquema Figura 9).

El tratamiento con Ryanodina no afectó las cinéticas de calcio generadas tras la estimulación con Thy-1, en tanto los bloqueadores del IP3R disminuyeron prácticamente en su totalidad las señales de calcio en presencia de Thy-1 (Figura 10A y 10C).

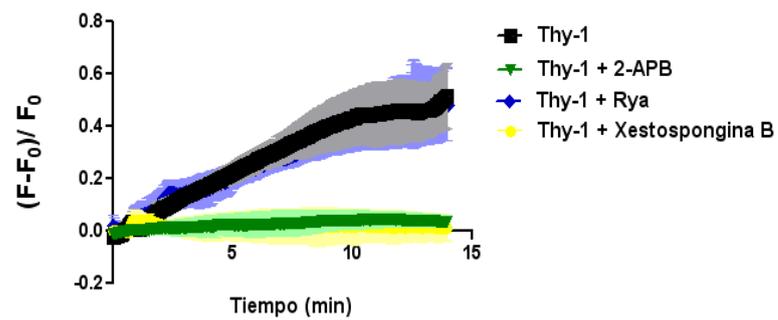
A)



B)



C)

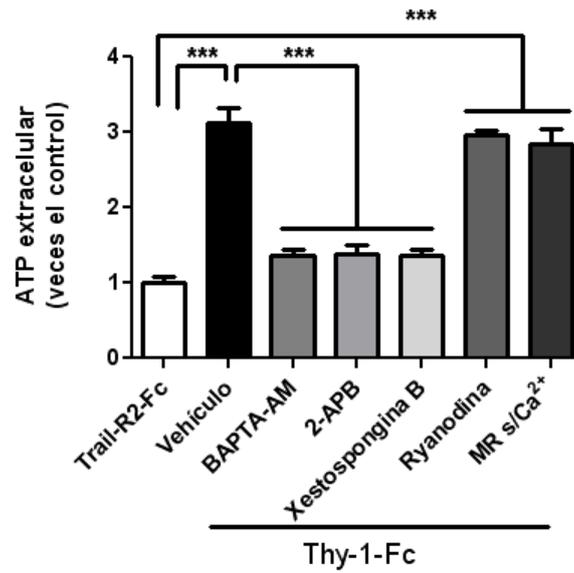


**Figura 10. Thy-1 induce un aumento del calcio intracelular dependiente del canal de calcio IP3R.** Astroцитos DITNC<sub>1</sub> sembrados en cubreobjetos de 25 mm fueron cargados con Fluo4-AM (5  $\mu$ M) durante 30 minutos a 37°C y, posteriormente, estimulados con 8,8  $\mu$ g de Thy-1-Fc-Proteína A y se midió cambios en la fluorescencia intracelular a 545 nM tras excitar a 488 nm. A) Imágenes representativas de cada condición a los 12 minutos de estimulación. B) Cuantificación del cambio de fluorescencia de Fluo4-AM en células estimuladas con Thy-1, tratadas previamente con BAPTA-AM (5  $\mu$ M, 1 hora) o su vehículo o estimuladas con Thy-1 en medio Ringer sin Calcio. C) Cuantificación del cambio de fluorescencia de Fluo4-AM en células estimuladas con Thy-1, tratadas previamente con 2-APB (5  $\mu$ M, 1 hora), Ryanodina (50  $\mu$ M, 4 horas) o Xestospongina B (5  $\mu$ M, 4 horas) o su vehículo. Se muestra promedio  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes.

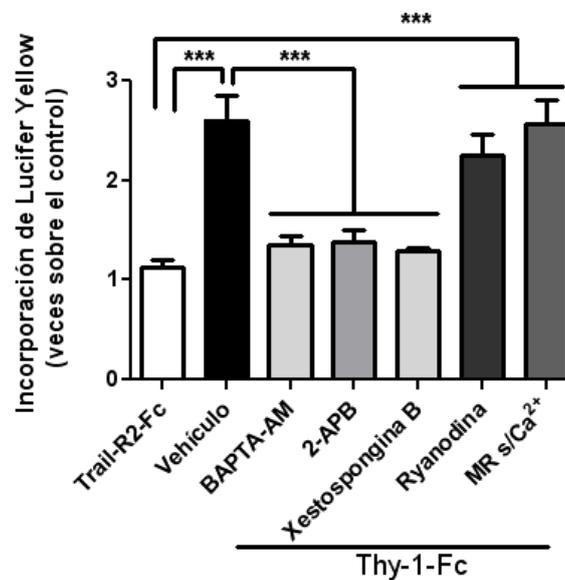
Para confirmar la relevancia de esta señal de calcio y sus fuentes en la apertura de hemicanales y salida de ATP inducidas por Thy-1, se utilizó los distintos inhibidores y condiciones que afectan los niveles intracelulares de calcio ya mencionados. BAPTA-AM, 2-APB y Xestospongina B evitaron el aumento extracelular de ATP inducidos por Thy-1 (Figura 11A) y disminuyeron la incorporación de Lucifer Yellow (Figura 11B) y, en tanto la presencia de Ryanodina o la estimulación con Thy-1 de astroцитos DITNC<sub>1</sub> en medio extracelular sin calcio, no afectó ni la salida de ATP ni la apertura de hemicanales (Figura 11A y 11B).

Resumiendo, estos datos nos muestran que para la apertura de hemicanales y la posterior salida de ATP y activación del receptor P2X7 inducida por Thy-1 en astroцитos se requiere la participación de calcio intracelular proveniente del retículo endoplásmico a través del IP3R.

A)



B)



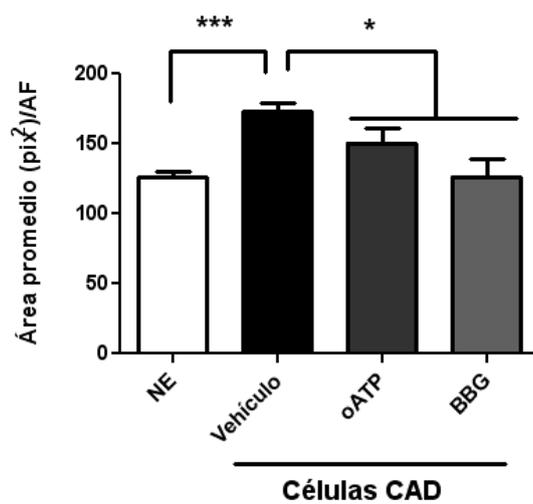
**Figura 11. Aumento de ATP extracelular e incorporación de Lucifer Yellow inducidos por Thy-1 es atenuada por disminución del calcio intracelular.** Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron incubados durante 1 hora con BAPTA-AM (5  $\mu$ M) y 2-APB (5  $\mu$ M) o 4 horas con Ryanodina (50  $\mu$ M) o Xestospongina B (5  $\mu$ M) y estimulados con Thy-1-Fc durante 10 minutos en medio Ringer normal, salvo donde se señala medio Ringer (MR) sin Calcio, que contiene EGTA. A) Medición de ATP extracelular. Se muestra promedio de valores obtenidos de tres experimentos  $\pm$  error estándar. B) Cuantificación de 4 experimentos independientes de incorporación de Lucifer Yellow (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

## **7.2. Objetivo específico 2: Dilucidar la función de P2X7R activado en la formación de adhesiones focales.**

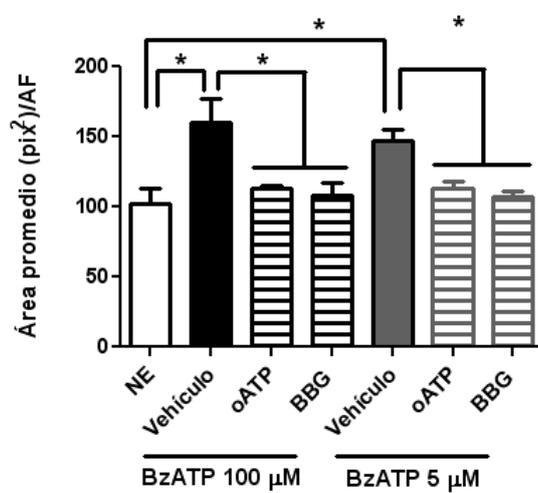
Nuestro laboratorio ha reportado que Thy-1 induce aumento en el número de adhesiones focales y en los niveles de ATP extracelular. Por ello se estudió si este ATP extracelular estaba involucrado en los cambios inducidos por Thy-1 en las adhesiones focales y si el ATP actuaba por medio de su receptor P2X7.

En resultados que fueron parte de una publicación de nuestro laboratorio (Henriquez y cols., 2011) se mostró que la incubación previa de los astrocitos DITNC<sub>1</sub> con los antagonistas del receptor P2X7, ATP oxidado (oATP) y Azul Brillante G (BBG) atenuó el aumento en el área promedio y en el número de adhesiones focales por célula inducido por Thy-1 (Figura 12A y 12C, respectivamente). En estos experimentos se utilizó células CAD como estímulo, debido a la alta cantidad de Thy-1 que poseen en su superficie. Además, la directa estimulación del receptor P2X7 con dos concentraciones distintas de su agonista específico BzATP generó un aumento tanto en número como en el área de las adhesiones focales. Este aumento también fue impedido por oATP y BBG (Figura 12B y 12D).

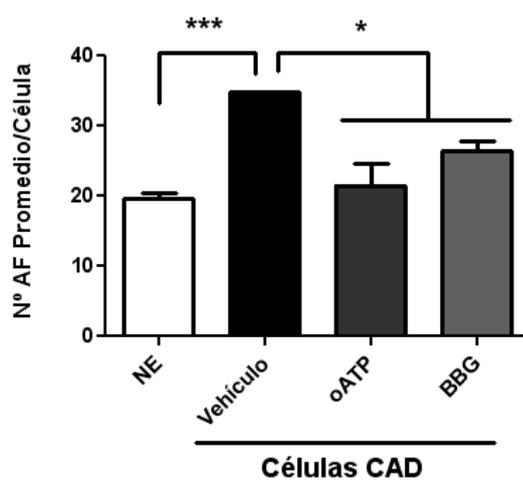
**A)**



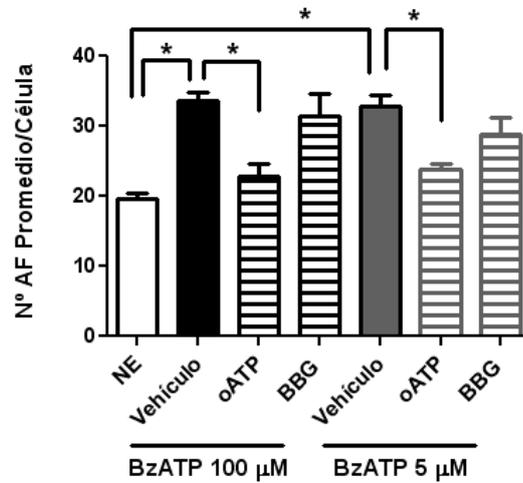
**B)**



**C)**



D)



**Figura 12. Antagonistas del receptor P2X7 bloquean el aumento en el área y número de adhesiones focales inducido por Thy-1 y BzATP.** Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron estimulados con células CAD o BzATP (100 µM o 5 µM) por 15 minutos. Donde se señala, los astrocitos fueron pretratados por 30 minutos con oATP (600 µM) o BBG (10 µM). Aproximadamente 300.000 células CAD se utilizan como herramienta de estimulación debido a la alta cantidad de Thy-1 que poseen en su superficie. NE corresponde a condición control, se agregó solo el medio de cultivo de las células. A) y B) Cuantificación del área promedio de las adhesiones focales. C) y D) Cuantificación del número de adhesiones focales promedio por célula. Se cuantificaron al menos 50 células por condición por cada uno de los experimentos. Para la cuantificación se utilizó el plug in “Análisis de Partículas” del software ImageJ (NIH). Se muestra promedio de 3 experimentos por cada condición ± error estándar. (\*\*\*) p < 0,001, \* p < 0,05).

Para confirmar la participación del receptor P2X7 en el aumento de las adhesiones focales inducido por Thy-1, se transfectaron astrocitos DITNC<sub>1</sub> con ARN interferente (ARNi) contra P2X7R. En resultados previos, publicados por nuestro laboratorio, se comprobó la disminución en los niveles de expresión del ARNm de este receptor por RT-PCR, observándose que éste es el único de los P2X que disminuye con la transfección

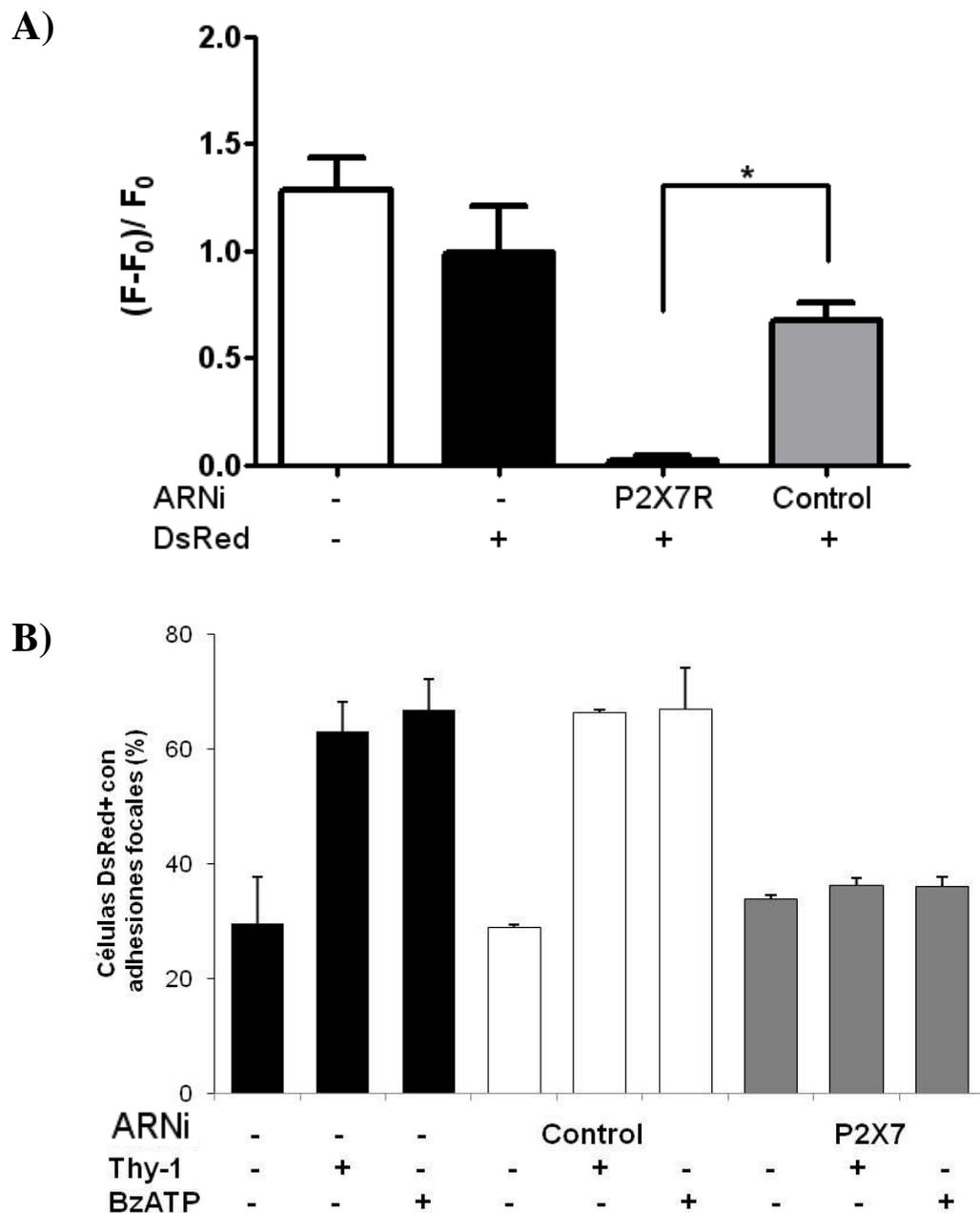
(Henriquez y cols, 2011). Primero se observó que el silenciamiento del receptor P2X7 tuviera una consecuencia funcional, viéndose que al tratar las células con BzATP, existe un aumento intracelular de calcio, el que no se observa al estimular a las células transfectadas con el ARNi contra P2X7R (Figura 13A). La disminución en la expresión de P2X7R, lograda por la transfección del ARNi, también disminuyó el número de células que presentan aumento de adhesiones focales inducida por Thy-1 o por BzATP en comparación al aumento de número de células con adhesiones focales transfectadas con ARNi control o sin transfectar (Figura 13B).

En resumen, el aumento en el número de adhesiones focales por célula y en el área promedio de las adhesiones focales inducido por Thy-1 requiere de la participación del receptor P2X7.

**7.3. Objetivo 3. Estudiar en un modelo de inflamación por herida si el antagonista de P2X7R, BBG, y el bloqueo de la interacción Thy-1/Integrina  $\alpha\beta 3$  disminuyen la migración de los astrocitos.**

**7.3.1. Participación del receptor P2X7 y de la salida de ATP en la migración de los astrocitos inducida por Thy-1.**

Kong y colaboradores describieron que Thy-1 luego de inducir una fuerte adhesión de los astrocitos, provoca una disminución en el número de las adhesiones focales y las células comienzan a formar lamelipodios y



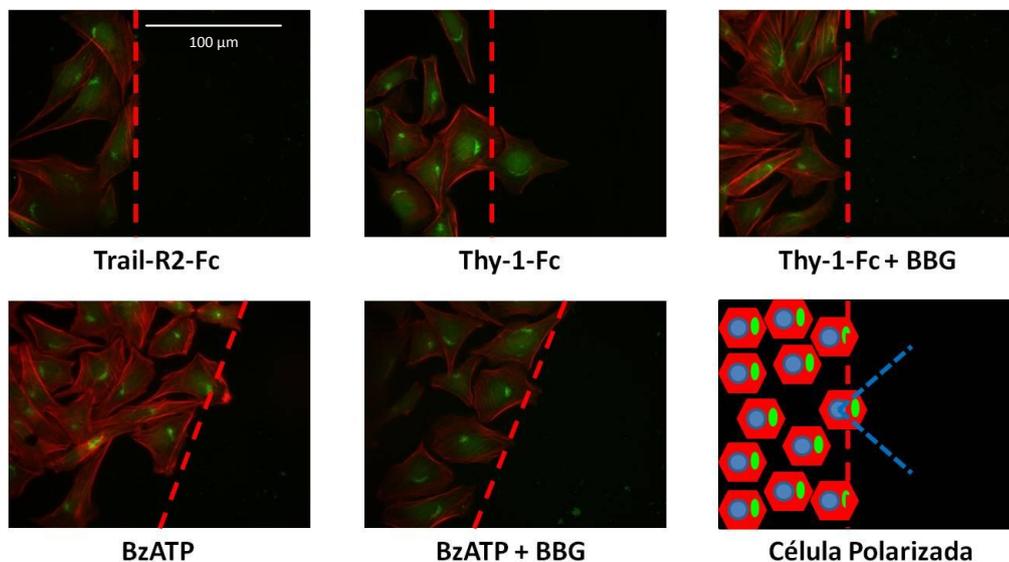
**Figura 13. El silenciamiento del receptor P2X7 disminuye la respuesta de los astrocitos a Thy-1 y BzATP.** Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron cotransfectados con un ARNi contra el receptor P2X7 y el plasmidio DsRed. Las células fueron estimuladas, donde se señale, con BzATP (100 μM) o Thy-1-Fc-Proteína A (4,4 μg) por 15 minutos. Como ARNi control se utilizó una secuencia no relacionada de origen comercial. A) Las células fueron cargadas con la sonda fluorescente Fluo-3-AM por 40 minutos. La medición muestra la intensidad de fluorescencia máxima alcanzada en cada cinética de calcio de astrocitos transfectados y controles estimulados con BzATP (\* p

< 0,05). B) Cuantificación de células con al menos 20 adhesiones focales en astrocitos positivos para la cotransfección con el ARNi correspondiente o vehículo y un plasmidio que codifica para la proteína fluorescente DsRed.

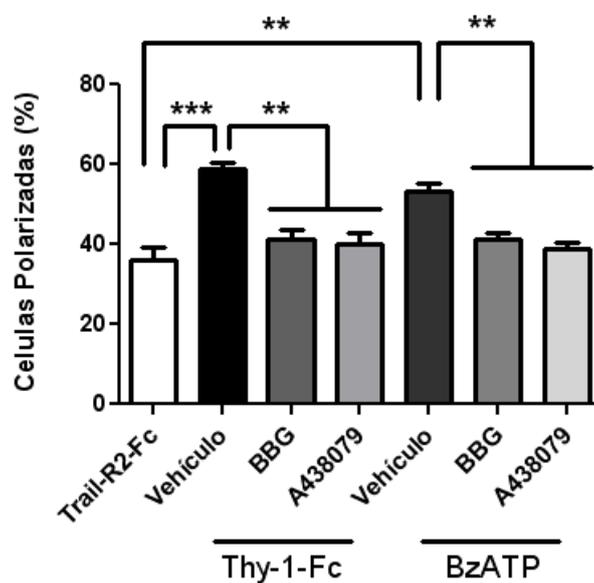
filopodios, se polarizan y migran hacia un área libre de células (Kong y cols., 2013). Considerando que los efectos de Thy-1 en las adhesiones focales requieren de la participación de ATP extracelular y del receptor P2X7, estudiamos si ambos requerimientos persisten para inducir la polarización y migración de astrocitos por Thy-1.

Para analizar polaridad celular se consideró como célula polarizada positiva aquella donde la posición del aparato de Golgi, teñido con anticuerpo contra Gigantina, se localiza frente al núcleo, en dirección a la herida, en un área que corresponde a un tercio de un círculo, cuyo punto central es el núcleo (Esquema en la Figura 14A). En la figura 14B se observa la cuantificación de lo mostrado en la figura 14A. Se muestra además, que el aumento en el número de células polarizadas estimuladas por Thy-1, no se produce cuando la estimulación se realiza en células incubadas previamente con antagonistas de P2X7. La estimulación de los astrocitos con BzATP aumenta el número de células polarizadas, siendo este efecto también disminuido por antagonistas del receptor P2X7 como BBG y A438079 (Figura 14A y 14B). Estos resultados indican que la polarización de las células inducida por Thy-1 requiere de la activación del receptor P2X7 por el ATP liberado.

A)



B)



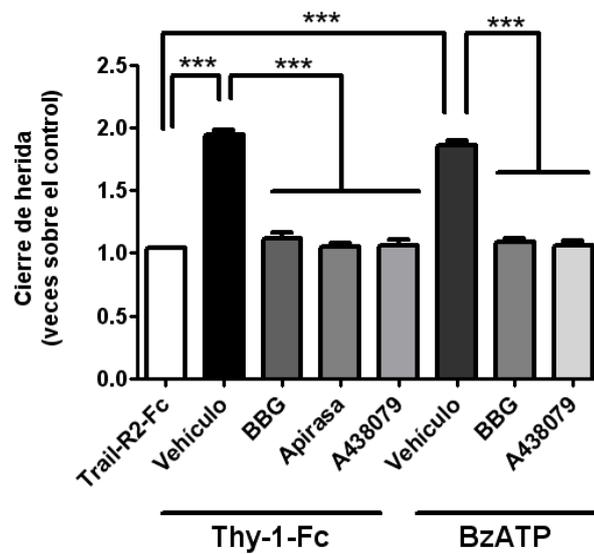
**Figura 14. Antagonistas del receptor P2X7 bloquean la polarización celular inducida por Thy-1-Fc o por BzATP.** Astrocytes DITNC<sub>1</sub> were stimulated for 7 hours with Thy-1-Fc-Protein A (4,4 μg) or with BzATP (100 μM) or Trail-R2-Fc as a negative control after being subjected to a wound assay, then immunofluorescence was performed with anti-Giantin antibody, Faloidina-Rhodamine and DAPI to mark the nucleus. Where it is indicated, the astrocytes were treated for 30 minutes with BBG (1 μM) or 1 hour with A438079 (100 nM). A) Representative images of the polarity of the

astrocitos en el borde de la herida. Célula polarizada se define como aquellas en que el Aparato de Golgi (verde) está ubicado en el tercio al frente del núcleo (azul) enfocado hacia el área de la herida, ver esquema. La línea punteada señala borde de la herida B) Cuantificación de número de células polarizadas de al menos 3 experimentos independientes por condición. Se muestra promedio  $\pm$  error estándar (\*\*\*)  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

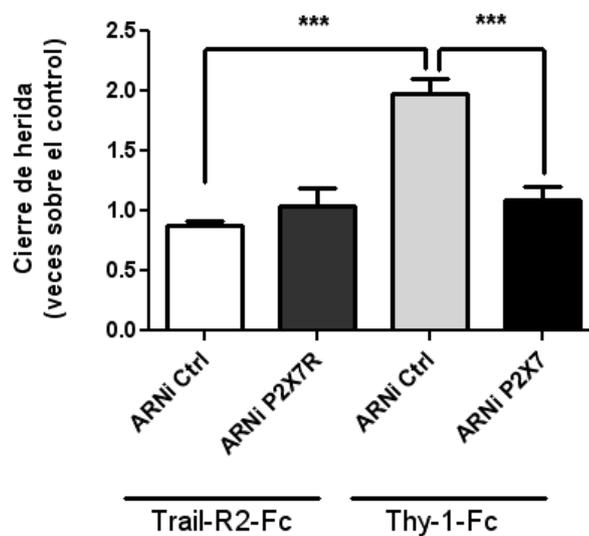
Como indicador de la migración celular se realizó ensayos de cierre de herida. Para ello se midió cómo antagonistas del receptor P2X7 o Apirasa afectan el cierre de herida inducido por Thy-1. En la figura 15A se observa que los antagonistas del receptor P2X7, BBG (5  $\mu$ M) y A438079 (100 nM), disminuyen el cierre de herida inducido por Thy-1, el mismo resultado se obtiene con la degradación del ATP inducida al agregar Apirasa (3 UI/mL). Además, la estimulación directa del receptor P2X7 con su agonista BzATP generó un incremento en el cierre de herida de los astrocitos DITNC1. Este aumento también fue atenuado por BBG y A438079. Por lo tanto, la migración de los astrocitos inducida por Thy-1 es un proceso que requiere de la salida de ATP para activar a los receptores P2X7.

Para confirmar la participación del receptor P2X7, se realizó un ensayo de herida con astrocitos DITNC<sub>1</sub> transfectados con un ARNi contra el receptor P2X7. Se observó que las células transfectadas con ARNi control responden a Thy-1, cerrando la herida tras su estimulación prolongada durante 24 horas, en tanto la transfección con el ARNi contra P2X7 bloquea el efecto de Thy-1 en la inducción del cierre de herida en relación con el ARNi control (Figura 15B).

A)



B)



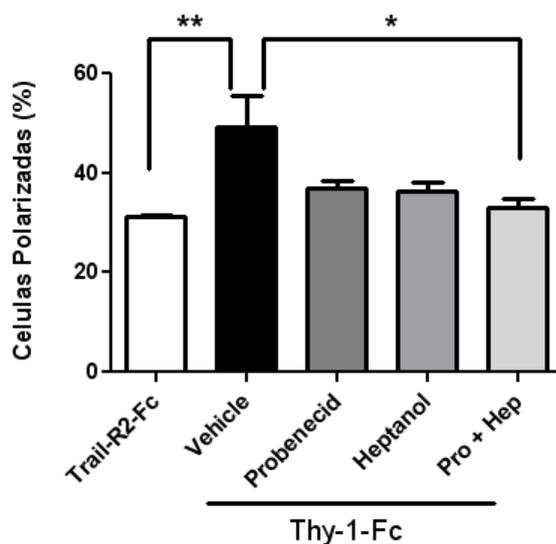
**Figura 15. La migración de astrocitos inducida por Thy-1 requiere de ATP extracelular y el receptor P2X7.** Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron sometidos a un ensayo de cierre de herida y posteriormente estimulados con Thy-1-Fc-Proteína A (4,4 µg), Trail-R2-Fc-Proteína A (4,4 µg) como control negativo o BzATP (100 µM) por 24 horas. A) Cuantificación de cierre de herida de astrocitos estimulados y tratados previamente con vehículo, BBG (1 µM), Apirasa (3 UI/mL) o A438079 (100 nM). B) Cuantificación de cierre de herida de astrocitos previamente transfectados con ARNi control (ARNi Ctrl) o contra el receptor P2X7 (ARNi P2X7) (\*\*\*) p < 0,001). Resultados de 4 experimentos independientes.

En tanto, para correlacionar la necesidad del aumento extracelular de ATP inducido por Thy-1 en la polarización celular y el cierre de herida con la salida de ATP inducida por el mismo estímulo, se estudió sí el bloqueo de los hemicanales afecta la polarización y migración de los astrocitos. Los resultados indican que tanto el bloqueador de conexinas, Heptanol, como el de panexinas, Probenecid, disminuyeron el número de células polarizadas (Figura 16A) y el cierre de herida frente a la estimulación por Thy-1 (Figura 16B).

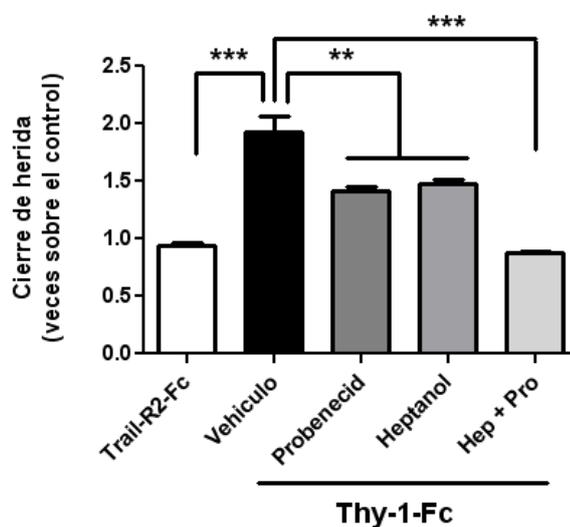
De acuerdo a estos resultados se desprende que la polaridad celular y la migración de astrocitos luego de la estimulación con Thy-1 requieren de la apertura de hemicanales, la salida de ATP y su presencia en el medio extracelular y la posterior participación del receptor P2X7.

A pesar de los antecedentes encontrados en literatura para otros tipos celulares (Wei y cols., 2008; Mayo y cols., 2011), el hecho de que se requiriera solo de BzATP para inducir la migración de los astrocitos resultó inesperado. Para analizar este fenómeno y su relación con la activación mediada por Thy-1, primero se realizó una curva concentración dependiente de BzATP en un ensayo de cierre de herida (Figura 17A). Se observó que BzATP sólo a 100 y 10  $\mu$ M es capaz de inducir el cierre de herida, mientras que a concentraciones menores no produce este efecto (Figura 17B).

A)

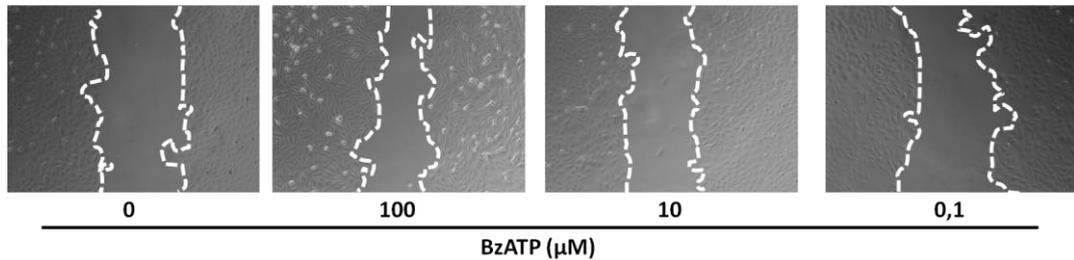


B)

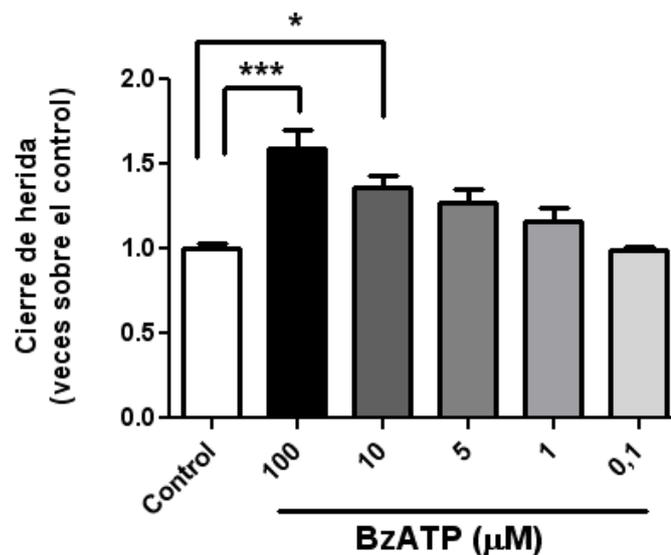


**Figura 16. Inhibidores de hemicanales disminuyen el aumento en polaridad y migración inducida por Thy-1 en astrocitos.** Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron incubados con inhibidores de hemicanales, Probenecid (1 mM) o Heptanol (500  $\mu$ M) o la mezcla de ellos, durante 30 minutos y estimulados con Thy-1-Fc-Proteína A (4,4  $\mu$ g). A) Cuantificación del número de células polarizadas. B) Cuantificación de cierre de herida a las 24 horas de estímulo con Thy-1-Fc-Proteína A. Expresado en veces del control. Se muestra promedio  $\pm$  error estándar de 4 experimentos (\*\* $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*  $p < 0,05$ ).

A)



B)



**Figura 17. BzATP estimula la migración de astrocitos DITNC<sub>1</sub> de manera concentración dependiente.** Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron sometidos a un ensayo de cierre de herida y estimulados con distintas concentraciones de BzATP (0,1; 1, 5, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Línea punteada señala el borde de la herida. A) Imágenes representativas del cierre de herida a las 24 horas. B) Cuantificación del cierre de herida a las 24 horas de 3 experimentos independientes, expresado en veces del control (vehículo). Se muestra promedio  $\pm$  error estándar (\*\*\*)  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ ).

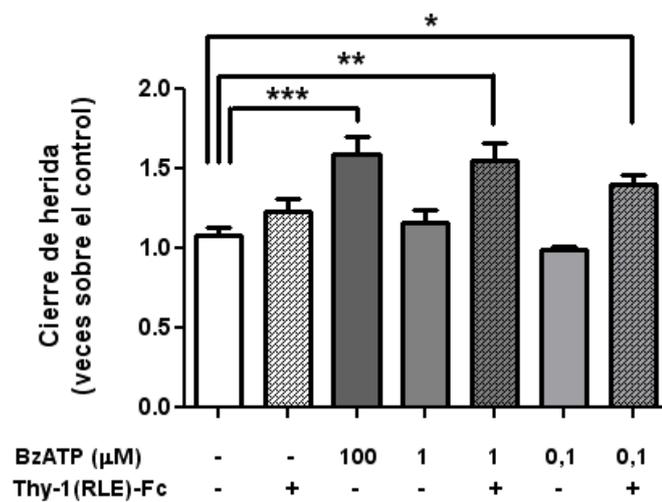
Dado que las concentraciones menores de BzATP que no inducen cierre de herida están en el mismo rango de concentración que los niveles de ATP detectados al estimular con Thy-1 (objetivo 1) y que son requeridos para

inducir cambios en las adhesiones y en la migración de los astrocitos (objetivo 2 y 3), se estudió la relación entre la activación del receptor P2X7 y la activación de los receptores de Thy-1. Kong y colaboradores describieron que tanto Thy-1 mutado en el sitio de unión a Integrinas como la versión mutada en el sitio de unión a Heparina son requeridos para inducir migración de astrocitos (Kong y cols, 2013). Según resultados mostrados en la figura 4A, se necesita estimular a la integrina  $\alpha\beta3$ , para que se eleve el ATP extracelular; sin embargo, la mutante del sitio de unión a Síndecan-4 a pesar de inducir esta salida de ATP en menor grado y con retardo (Figura 4A), no induce migración de astrocitos (Figura 4A).

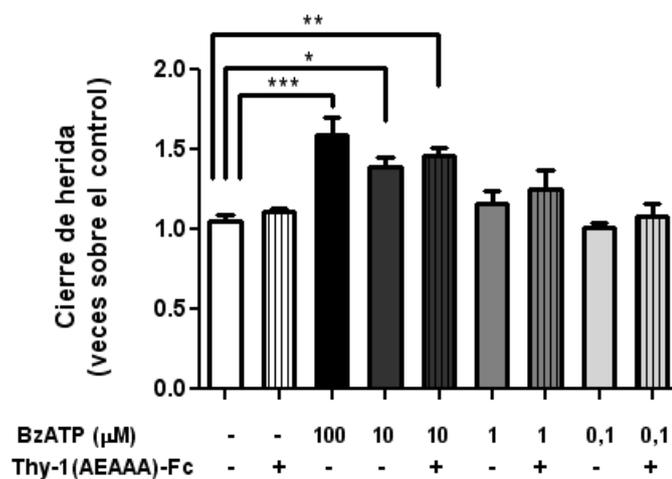
Para dilucidar la secuencialidad en que ocurren los eventos de señalización probamos estimular concomitantemente con BzATP a bajas concentraciones y con Thy-1 mutado en el sitio de unión a Integrina  $\alpha\beta3$ . Como controles se utilizó Thy-1(RLE), que no induce cierre de herida, y BzATP (100  $\mu\text{M}$ ) que si estimula el cierre. Se muestra que al estimular simultáneamente con concentraciones más bajas de BzATP, que por si solas no inducen cierre de herida, y con Thy-1 mutado en el sitio de unión a Integrina, se produce un efecto sinérgico aumentando el cierre de herida, disminuyendo el área de la herida significativamente comparado con condición control (Figura 18A). En tanto, la estimulación simultanea con BzATP, en concentraciones bajo el umbral de inducir migración por si solas, y Thy-1 mutado en el sitio de unión a Heparina no mostró efectos distintos a los obtenidos por el uso de sólo el BzATP (Figura 18B).

Estos resultados apoyan la idea de que el aumento extracelular de ATP requiere de la actividad del sitio de unión a Integrina de Thy-1 e indican que la activación del receptor P2X7 por ATP y la ruta activada río debajo de la interacción de Thy-1 con probablemente Síndecan-4 son necesarias para inducir la migración de los astrocitos.

A)



B)



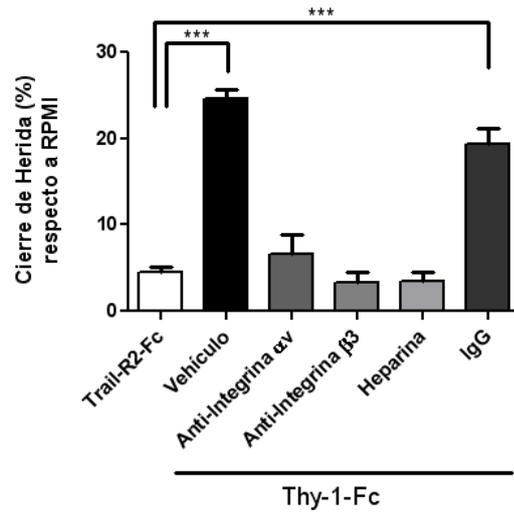
**Figura 18. BzATP en concentraciones subóptimas estimula la migración de astrocitos al utilizarse conjunto con Thy-1(RLE).** Astrocitos DITNC<sub>1</sub> se sometieron a un ensayo de herida. Inmediatamente realizada la

herida, las células fueron estimuladas con distintas concentraciones de BzATP y simultáneamente con las mutantes de Thy-1 por 24 horas. A) Cuantificación de al menos 3 experimentos independientes de cierre de herida de astrocitos a las 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de BzATP, BzATP (100  $\mu$ M) fue usado como control positivo, mientras que BzATP (1 y 0,1  $\mu$ M) se usaron en conjunto con 4,4  $\mu$ g de Thy-1(RLE)-Fc-Proteína A. B) Cuantificación de cierre de herida de astrocitos a las 24 horas de tratamiento con BzATP y con 4,4  $\mu$ g de Thy-1(AEAAA)-Fc-Proteína A según explicado en A (\*\* $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ).

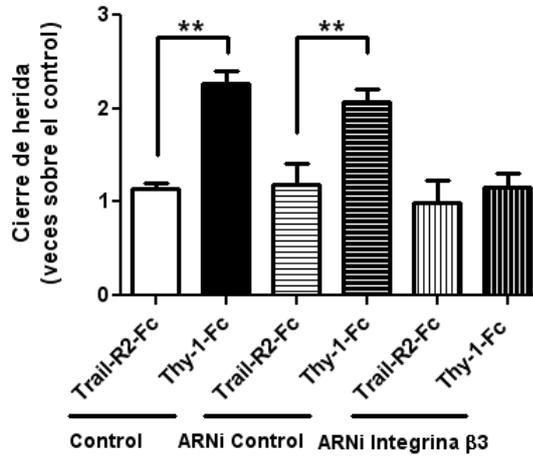
Para verificar que las interacciones de Thy-1 con sus receptores son necesarias para inducir la migración de los astrocitos, las células fueron incubadas previamente con bloqueadores de estas interacciones. Se observó que tanto el uso de anticuerpos anti Integrina  $\alpha$ v o anti Integrina  $\beta$ 3 como Heparina, para bloquear el sitio de unión a Heparina de Thy-1, disminuyen el cierre de herida inducido por Thy-1 (Figura 19A).

Para confirmar la participación de la Integrina  $\beta$ 3 se utilizó un ARNi contra la Integrina  $\beta$ 3. Las células estimuladas con Thy-1 y transfectadas con este interferente mostraron un menor cierre de herida comparado con las células estimuladas con Thy-1 y transfectadas con el interferente control (Figura 19B). Finalmente, usando las mutantes de Thy-1, se muestra que tanto Thy-1 mutado en el sitio de unión a Integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3 (Thy-1 (RLE)), como el mutado en el sitio de unión a Heparina son incapaces de inducir migración (Figura 19C).

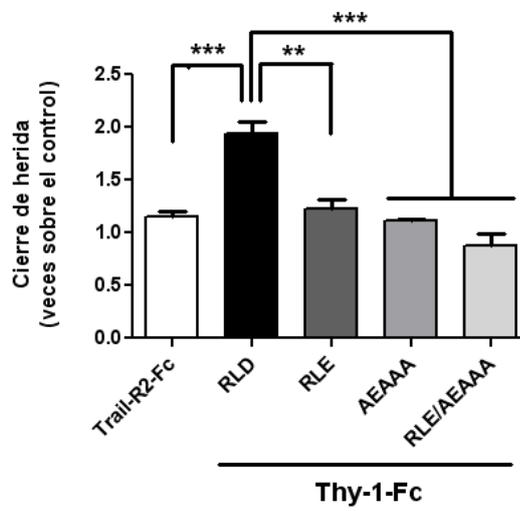
A)



B)



C)



**Figura 19. El bloqueo de los receptores de Thy-1 o el silenciamiento de la Integrina  $\beta 3$  disminuye el cierre de herida inducido por Thy-1.** Astrocitos DITNC<sub>1</sub> fueron sometidos a un ensayo de herida. Después de los tratamientos indicados, las células fueron estimuladas 24 horas con Thy-1-Fc-Proteína A (4,4  $\mu$ g) o con Trail-R2-Fc como control negativo. A) Cuantificación de ensayo de cierre de herida de 200.000 células tratadas, previo a la estimulación, con anticuerpos contra la Integrina  $\alpha v$ , contra la Integrina  $\beta 3$  o con una IgG, utilizada como control de los anticuerpos; para bloquear el sitio de unión a Heparina de Thy-1 se ocupó Heparina (400  $\mu$ g/mL por 30 minutos). B) Cuantificación de cierre de herida a las 24 horas de astrocitos transfectados con ARNi control o contra Integrina  $\beta 3$ . C) Cuantificación de ensayo de cierre de herida de astrocitos tratados con mutantes de Thy-1-Fc (\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ). Resultados de 3 experimentos independientes.

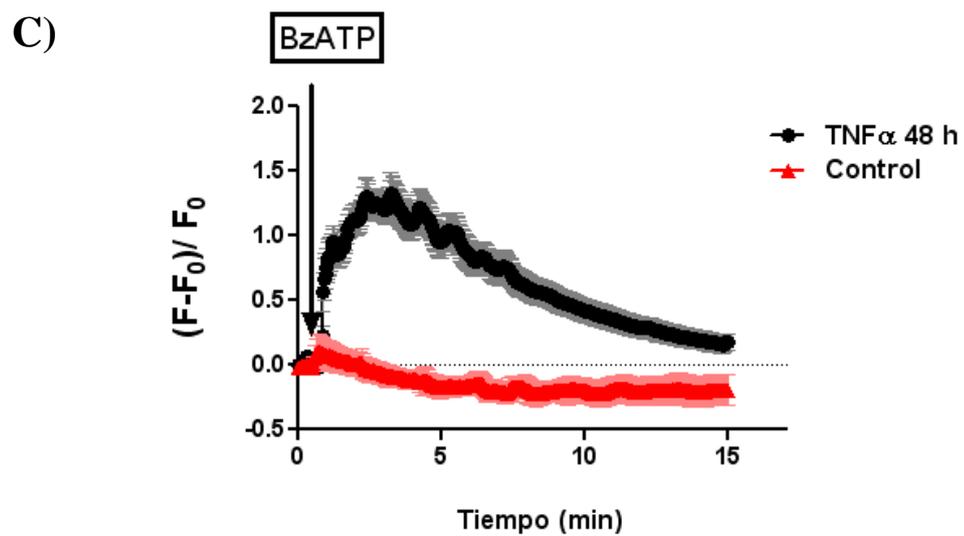
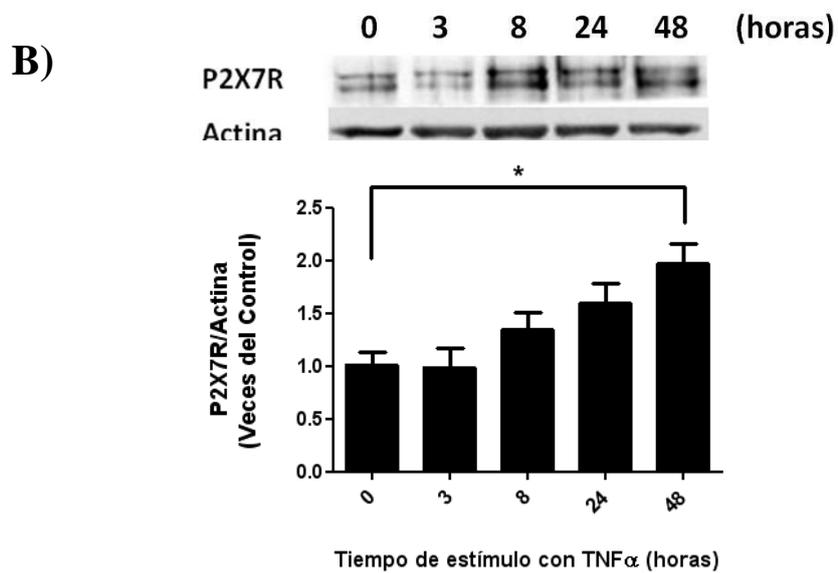
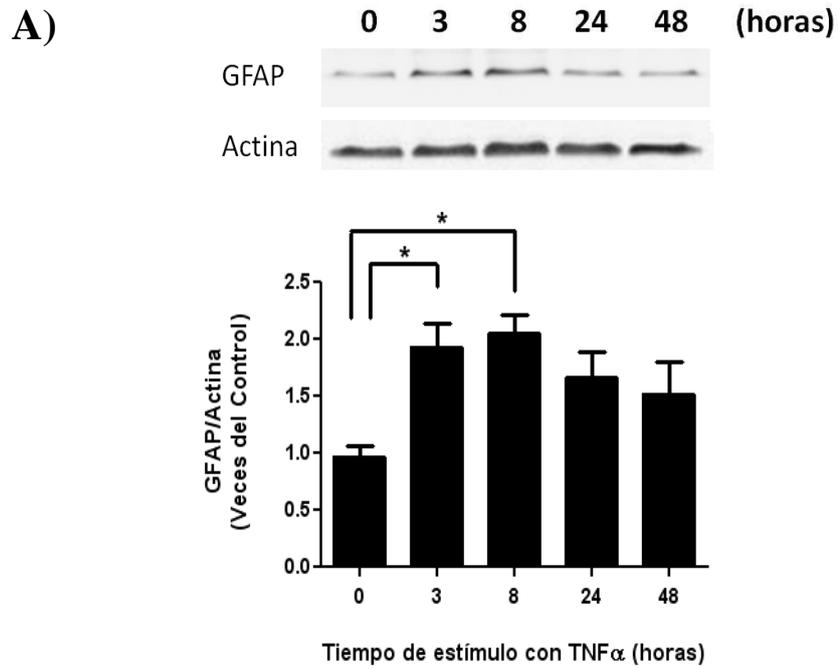
Considerando estos resultados y aquellos descritos por Avalos y colaboradores (Avalos y cols, 2009) donde se describió a Síndecan-4 como segundo receptor de Thy-1, podemos decir que Thy-1 requiere interactuar con sus dos receptores para inducir el cierre de herida de los astrocitos DITNC<sub>1</sub> y que para ello también requiere del aumento extracelular de ATP.

**7.4. Objetivo específico 4. Estudiar la capacidad de astrocitos primarios de responder a Thy-1 y evaluar el aumento en la expresión de P2X7R frente a un estímulo inflamatorio en astrocitos no reactivos.**

Resultados no publicados de nuestro laboratorio han mostrado que astrocitos provenientes de cultivo primario no responden a la estimulación con Thy-1. Además, se ha reportado que los astrocitos aumentan la expresión de la Integrina  $\beta 3$  en condiciones de daño por derrame cerebral (Ellison, 1998), pero que no se expresa en cerebro adulto normal (Pinkstaff y

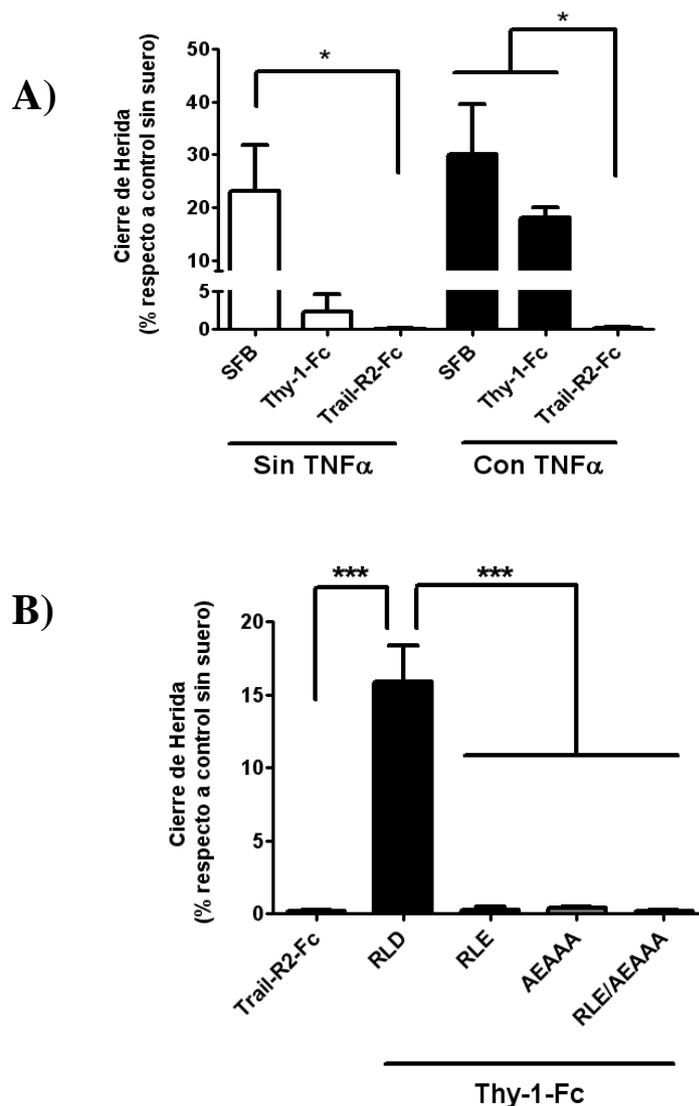
cols., 1999). Por ello estudiamos sí el tratamiento de los astrocitos de cultivo primario con TNF $\alpha$ , una citoquina proinflamatoria presente en situaciones de daño o inflamación en el sistema nervioso central, llevaba a una expresión mayor de la Integrina  $\beta$ 3 en astrocitos volviendo a los astrocitos primarios sensibles a la estimulación por Thy-1.

El tratamiento con TNF $\alpha$  genera cambios fenotípicos en los astrocitos como aumento de la expresión de GFAP a las 3 y 8 horas, para luego disminuir a las 24 y 48 horas (Figura 20A). También provoca un aumento de expresión del receptor P2X7 a las 8 y 24 horas que es significativamente distinto a las 48 horas (Figura 20B). Otros cambios en los astrocitos incluyen que en respuesta a BzATP, las células aumenten el calcio intracelular en mayor intensidad que los astrocitos no tratados con TNF $\alpha$  (Figura 20C). Estos resultados indican que con 48 horas de tratamiento con un compuesto proinflamatorio, los astrocitos elevan la expresión de receptores de P2X7 a niveles que les permite responder a su agonista BzATP con un aumento de calcio intracelular.



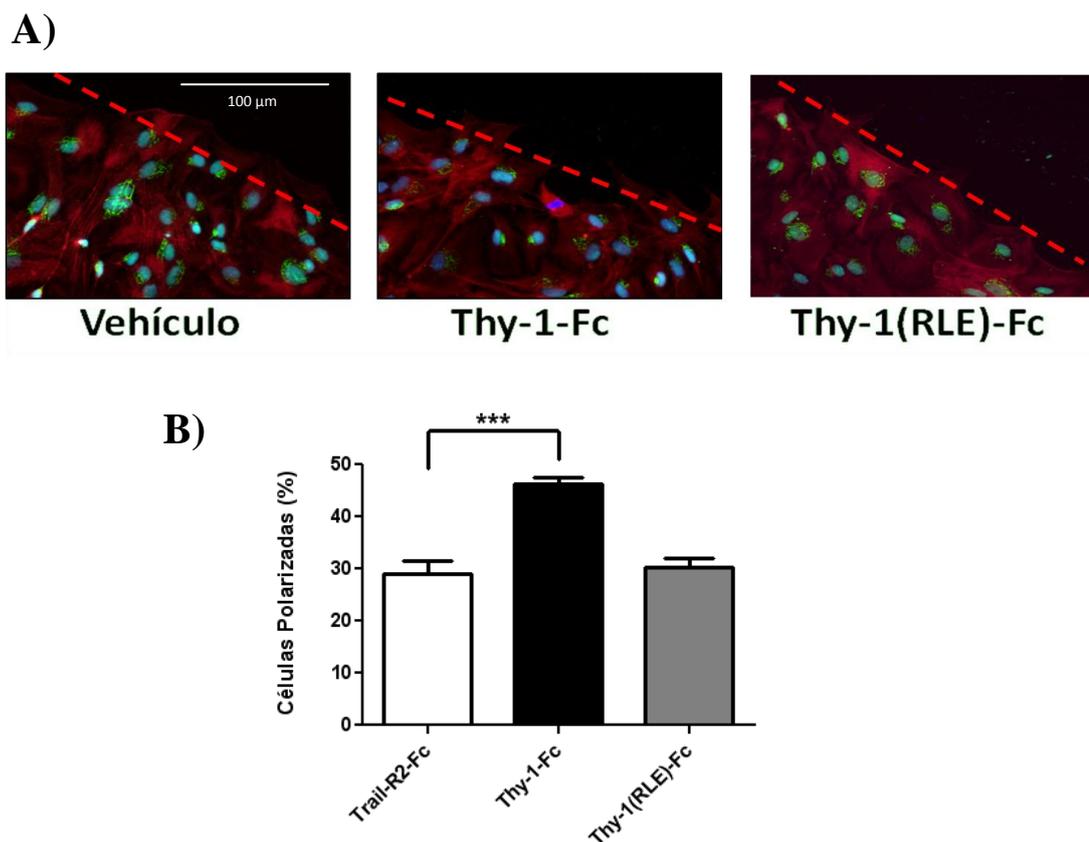
**Figura 20. Astrocitos primarios incrementan los niveles proteicos de GFAP y P2X7R al ser incubados con TNF $\alpha$ .** Astrocitos de cultivo primario fueron incubados diferentes periodos de tiempo con 10 ng/mL de TNF $\alpha$ . Se extrajo proteína y se realizó inmunowestern blot contra GFAP (1:2500), P2X7R (1:1000) y  $\beta$ -Actina (1:5000) A) Imagen representativa del western blot y cuantificación densitométrica de señal para GFAP, normalizada por Actina. Se muestra promedio de tres experimentos  $\pm$  error estándar. B) Imagen representativa del western blot y cuantificación densitométrica de señal para P2X7R, normalizada por Actina (\*  $p < 0,05$ ). Se muestran promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 experimentos independientes. C) Cuantificación de cambios en la fluorescencia de Fluo4-AM. Astrocitos de cultivo primario tratados 48 horas con TNF $\alpha$  o no tratados (control) fueron cargados por 30 minutos con Fluo4-AM y estimulados con BzATP (100  $\mu$ M). Se muestra promedio  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes.

Además, en ensayo de herida, los astrocitos de cultivo primario tratados con TNF $\alpha$  por 48 horas responden a Thy-1 aumentando la migración y su capacidad de cerrar la herida en comparación a los astrocitos no tratados con TNF $\alpha$  (Figura 21A). Interesantemente, la adición de suero (SFB por 20 minutos) al medio de cultivo induce la migración de los astrocitos independiente del tratamiento con TNF $\alpha$ , indicando que estas células poseen la maquinaria para migrar aún en ausencia del tratamiento con citoquinas inflamatorias. Adicionalmente y concordante con lo observado en los DITNC<sub>1</sub>, la estimulación con las versiones mutantes de Thy-1 no producen cambios migratorios en los astrocitos primarios, aún cuando éstos han sido pretratados con TNF $\alpha$  (Figura 21B).



**Figura 21. Astrocitos de cultivo primario responden a Thy-1 silvestre tras 48 de incubación con TNF $\alpha$  de manera dependiente del sitio de unión a integrina.** Astrocitos de cultivo primario fueron tratados por 48 horas con TNF $\alpha$  (10 ng/mL) o vehículo y posteriormente sometidos a un ensayo de herida y tratados con Thy-1-Fc-Proteína A (4,4 ug) o con Trail-R2-Fc (4,4 ug) por 24 horas. A) Cuantificación a las 24 horas de tratamiento del cierre de herida de astrocitos en presencia o ausencia de TNF $\alpha$  y estimulados con Thy-1-Fc o suero fetal bovino (FSB) al 3% usado como control positivo. B) Cuantificación a las 24 horas de tratamiento del cierre de herida de astrocitos estimulados con Thy-1 silvestre o mutado en el sitio de unión a Integrina (RLE), mutado en el sitio de unión a Síndecan-4 (AEAAA) o en ambos sitios (RLE/AEAAA) (\*\*\*)  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ ). Valores son promedio  $\pm$  error estandar obtenidos de 3 experimentos independientes.

En acuerdo con esto, el tratamiento con la citoquina proinflamatoria también permite que aumente el número de astrocitos primarios polarizados frente al estímulo de Thy-1 (Figura 22A). Este aumento requiere de la presencia del sitio de unión a Integrina intacto en Thy-1, ya que no es observado cuando se utiliza la versión de Thy-1 que tiene mutado el sitio de unión a Integrina (Figura 22B).



**Figura 22. El sitio de unión a Integrina  $\beta 3$  de Thy-1 es necesario para inducir polaridad de los astrocitos.** Se realizó ensayo de herida en astrocitos de cultivo primario tratados con TNF $\alpha$  (10 ng/mL) durante 48 horas, luego se estimularon durante 5 horas con 4,4  $\mu$ g de Thy-1-Fc-Proteína A o la versión mutada en el sitio de unión a Integrina  $\beta 3$  y se realizó inmunofluorescencia. Las células se tiñeron con anticuerpo contra Gigantina y luego con anticuerpo secundario anti IgG de conejo (verde), con Faloidina-Rodamina (rojo) y con DAPI (azul). A) Fotos representativas de astrocitos polarizados, se señala con línea segmentada el lugar donde se realizó la

herida. B) Cuantificación de número de células polarizadas. Se muestra promedio  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Para confirmar los requerimientos de la Integrina  $\beta 3$  en el aumento de la migración inducida por Thy-1, se transfectaron astrocitos de cultivo primario con una mezcla de ARNi contra Integrina  $\beta 3$  y se trataron posteriormente con TNF $\alpha$ . Se observó que TNF $\alpha$  induce aumento de Integrina  $\beta 3$  en la condición control, pero este aumento se atenúa al estar silenciada la Integrina (Figura 23A). Además, la migración de los astrocitos primarios tratados con TNF $\alpha$  y estimulados con Thy-1 se ve disminuida cuando se silencia a la Integrina  $\beta 3$  y se estimula con Thy-1 por 24 horas (Figura 23B). Aunque la disminución en el % de cierre de herida no es total, el valor obtenido para las células transfectadas con ARNi para Integrina  $\beta 3$  es significativamente distinto al obtenido en las células transfectadas con ARNi control (Figura 23B), resultado que es concordante con un silenciamiento no total de la Integrina.

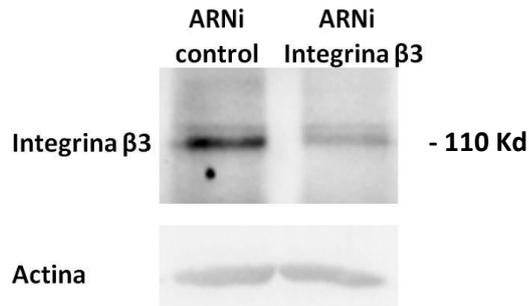
En una aproximación experimental distinta astrocitos de cultivo primario fueron transfectados con eGFP-Integrina  $\beta 3$  y estimulados 24 horas con Thy-1. Se observó que estos astrocitos no tratados con TNF $\alpha$  expresan muy poca Integrina  $\beta 3$  y sí lo hacen al ser transfectados con eGFP-Integrina  $\beta 3$  (Figura 23C). Interesantemente, aún en ausencia del tratamiento con TNF $\alpha$ , los astrocitos que expresan GFP-Integrina  $\beta 3$  responden a Thy-1, produciendo un aumento en el % de cierre de la herida en los cultivos (Figura 23D).

En resumen, los astrocitos primarios responden a Thy-1 tras ser tratados con TNF $\alpha$  y esta respuesta depende de la expresión de la Integrina  $\beta$ 3. Adicionalmente, la sola expresión de la Integrina  $\beta$ 3 es suficiente para que las células respondan a Thy-1, aún en ausencia de un estímulo pro-inflamatorio.

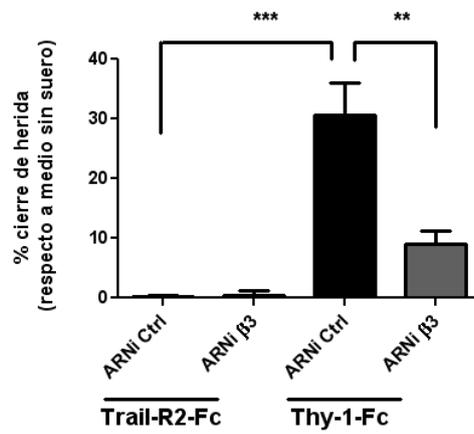
Además investigamos los eventos de señalización que Thy-1 gatilla río abajo de su unión a la Integrina. Para ello se estudió sí, al igual que en astrocitos DITNC1, la respuesta migratoria de los astrocitos primarios tratados con TNF $\alpha$  inducida por Thy-1 es inhibida por Apirasa y por el antagonista del receptor P2X7, BBG (Figura 24). Se observó que ambos tratamientos inhiben el efecto de Thy-1 sobre la migración de astrocitos pretratados con TNF $\alpha$  (Figura 24A). Asimismo, la estimulación directa del receptor P2X7 con BzATP genera un aumento en la migración de las células tratadas con TNF $\alpha$  (Figura 24A), evento que sugiere ser dependiente de la concentración de BzATP (Figura 24B y 24C) y que es atenuado por BBG (Figura 24A). Los resultados muestran que efectivamente la degradación de ATP y el bloqueo del receptor P2X7 por BBG atenúan el efecto de Thy-1 sobre la migración de los astrocitos primarios “activados”.

Estos resultados señalan que la participación de ATP extracelular y del receptor P2X7 son requeridas para la migración de astrocitos primarios tratados con TNF $\alpha$  y estimulados con Thy-1.

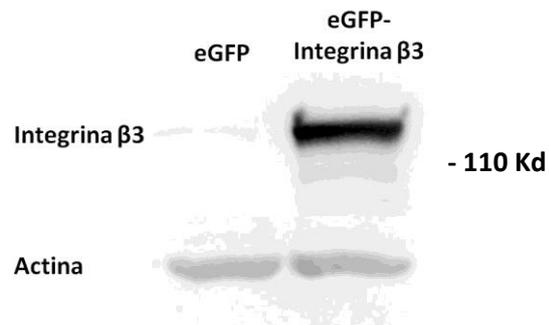
**A)**



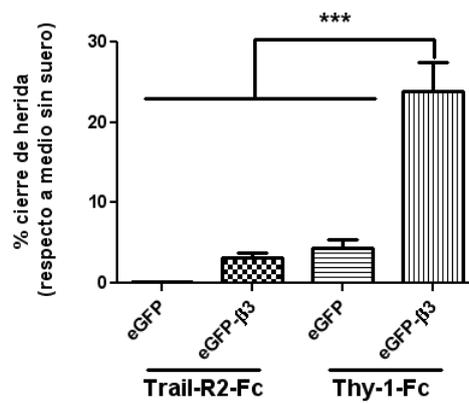
**B)**



**C)**



**D)**



**Figura 23. La expresión de Integrina  $\beta 3$  es necesaria para la migración inducida por Thy-1.** Astroцитos de cultivo primario transfectados fueron sometidos a un ensayo de herida durante 24 horas, inmediatamente después de la herida las células fueron estimuladas con 4,4  $\mu\text{g}$  de Thy-1-Fc-Proteína A o Trail-R2-Fc-Proteína A. A) Inmunowestern blot representativo contra Integrina  $\beta 3$  de astroцитos transfectados con ARNi control o ARNi contra Integrina  $\beta 3$ . B) Cuantificación de ensayo de cierre de herida de astroцитos de cultivo primario transfectados con ARNi contra la Integrina  $\beta 3$  e incubados con TNF $\alpha$  (10 ng/mL) por 48 horas y tratados con Thy-1-Fc o Trail-R2-Fc por 24 horas. C) Inmunowestern blot representativo contra Integrina  $\beta 3$  de astroцитos transfectados con eGFP o con eGFP-Integrina  $\beta 3$ . D) Cuantificación de ensayo de cierre de herida de astroцитos de cultivo primario transfectados con eGFP-Integrina  $\beta 3$  y tratados con Thy-1-Fc o Trail-R2-Fc por 24 horas. Se muestra promedio  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes (\*\* $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ ).



**Figura 24. ATP extracelular y la activación del receptor P2X7 son requeridos para la migración de astrocitos inducida por Thy-1.** Astrocitos de cultivo primario fueron sometidos a un ensayo de herida tras ser tratados 48 horas con TNF $\alpha$ . Las células fueron tratadas por 24 horas con Thy-1-Fc-Proteína A (4,4  $\mu$ g), Trail-R2-Fc-Proteína A (4,4  $\mu$ g) o diferentes concentraciones de BzATP). A) Ensayo de cierre de herida de astrocitos de cultivo primario, previo a y durante la estimulación con Thy-1, donde se señale, las células fueron tratadas por 30 minutos con BBG (1  $\mu$ M) o Apirasa (3 UI/mL). Se muestra cuantificación de cierre de herida. B) Ensayo de cierre de herida de astrocitos de cultivo primario estimulados con diferentes concentraciones de BzATP. Thy-1 fue usado como control positivo. C) Cuantificación de cierre de herida a las 24 horas de estimulación. Se muestra promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos por condición (\*\*\*)  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

En este trabajo se describe por primera vez cómo la interacción de Thy-1 con su receptor Integrina  $\beta 3$  induce la salida de ATP desde los astrocitos. La unión de Thy-1 a la integrina gatilla la salida de calcio desde el retículo endoplasmático a través de los receptores de IP3. Este aumento de calcio intracelular permite la salida de ATP por los hemicanales panexinas y conexinas. Además, se describe que el aumento de ATP extracelular, en conjunto con la activación del receptor P2X7 y la entrada de calcio extracelular son requeridos para la migración de los astrocitos DITNC<sub>1</sub>. Este efecto también se observó en astrocitos de cultivo primario, los que para responder a Thy-1 requieren de un pretratamiento con la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$  y de la expresión de Integrina  $\beta 3$ .

Las cantidades de Thy-1 utilizadas en este trabajo fueron decididas de acuerdo a los resultados obtenidos y publicados previamente en nuestro laboratorio (Leyton y cols., 2001, Avalos y cols., 2004, Hermosilla y cols., 2008, Avalos y cols., 2009, Henriquez y cols., 2011, Kong y cols., 2013). Se ha determinado que en nuestras condiciones experimentales, sembrando un número constante de células por unidades de superficie de cultivo, se requiere 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de Thy-1 para alcanzar el máximo efecto en las células (para estudios de dependencia de la cantidad y tiempo de estímulo, ver Henriquez y cols., 2011, figura suplementaria 2).

### **8.1. Aumentos extracelulares de ATP inducidos por Thy-1**

Thy-1 induce el aumento de ATP en el medio extracelular de astrocitos DITNC<sub>1</sub>, con un máximo a los 10 minutos de estimulación. Thy-1 mutado en el sitio de unión a Integrina  $\alpha\beta 3$  (Thy-1(RLE)) no generó cambios, en tanto, Thy-1 mutado en el sitio de unión a Heparina induce un aumento extracelular de ATP, pero alcanza el máximo a los 15 minutos y a un nivel menor que con Thy-1 silvestre. Estos resultados muestran que la interacción de Thy-1 e Integrina  $\alpha\beta 3$  es fundamental para que los astrocitos respondan a Thy-1 aumentando el ATP extracelular, en cambio la ausencia del sitio de interacción con Heparina no anula la respuesta, sino que la atenúa y retrasa. Esto implica que las rutas activadas río abajo de Integrina  $\alpha\beta 3$  determinan los eventos que generan la salida de ATP de manera absoluta (“todo o nada”), mientras que probablemente las rutas río abajo de Síndecan-4 regulan la cinética de salida y la cantidad de ATP liberado.

Aunque hemos acumulado suficiente evidencia del rol de Síndecan-4 en la respuesta celular inducida por Thy-1 e implicado a su sitio de unión a Heparina en ello (Avalos y cols, 2009), no existe evidencia que indique una interacción directa entre Thy-1 y Síndecan-4. Para responder esta interrogante nuestro laboratorio se encuentra actualmente desarrollando herramientas que nos permitan determinar la interacción directa a través de diferentes técnicas como coimmunoprecipitación u observación de colocalización por microscopía. Además, para probar una interacción directa podrían ser utilizadas técnicas como resonancia de plasmones superficiales

o ensayos de ligación por proximidad. Interesantemente, en los últimos meses Barker y colaboradores publicaron que Thy-1 forma un complejo trimolecular con la Integrina  $\alpha 5\beta 1$  y Síndecan-4 y que la unión sinérgica de ambos receptores ve aumentada su fuerza al aplicar tensión a los enlaces. Los autores sugieren una interacción de Thy-1 con ambos receptores; sin embargo, la interacción directa entre Thy-1 y Síndecan no se demuestra (Fiore et al., 2014).

Los efectos de la interacción de Thy-1 con sus receptores sobre la liberación de ATP resultaron sorprendentes dado los resultados previos publicados por nuestro laboratorio, donde se demostró que la ausencia de uno de los sitios de interacción de Thy-1 con sus receptores es suficiente para evitar la adhesión y migración de los astrocitos (Avalos y cols., 2009; Kong y cols., 2013). Una explicación probable es que los niveles de ATP generados en ausencia de la interacción con Síndecan-4 no son suficientes para activar al receptor P2X7 y provocar cambios en la adhesividad y motilidad de los astrocitos DITNC<sub>1</sub> en respuesta a Thy-1. A favor de esta explicación está el hecho que la mutante de Thy-1 carente del sitio de unión a Integrina pero en presencia de cantidades sub-óptimas de BzATP puede gatillar la respuesta migratoria, lo que indica que probablemente también aumente la adhesión celular, aunque esto aún debe ser demostrado. Estos resultados sugieren a Síndecan-4 como un regulador positivo de la actividad de la Integrina.

Otros autores han mostrado a Síndecan-4 cumpliendo roles similares, en particular se ha visto que Síndecan-4, en una vía dependiente de PKC $\alpha$  y

RhoG, puede aumentar la endocitosis de la Integrina  $\alpha 5\beta 1$  (Bass y cols., 2011) y en un proceso más complejo que requiere la fosforilación de Síndecan-4 por Src, es capaz de aumentar la estabilización de las adhesiones focales al disminuir los niveles de la Integrina  $\alpha 5\beta 1$  en la membrana plasmática y aumentar, concomitantemente, a la Integrina  $\alpha \nu\beta 3$  (Morgan y cols., 2013). Por lo tanto, es posible especular que Síndecan-4 regula positivamente los niveles de Integrina  $\alpha \nu\beta 3$  en la membrana de la célula, permitiendo así que responda a Thy-1 liberando suficiente ATP para gatillar adhesión y migración celular.

## **8.2. Salida de ATP a través de hemicanales**

En este estudio se demostró que ATP es liberado de las células a través de hemicanales, Para el estudio de los hemicanales se usaron diversas estrategias farmacológicas, el uso de inhibidores ampliamente descritos en la literatura, como probenecid para bloquear panexinas y heptanol para bloquear conexinas, a concentraciones que se han establecido como las adecuadas para lograr un bloqueo total de los hemicanales y no generar otros efectos inespecíficos (Suadicani y cols., 2006; Silverman y cols., 2009, Garré y cols., 2010). Dado los posibles efectos de estos inhibidores sobre actividades no relacionadas con los hemicanales, se complementó la información obtenida con experimentos con bloqueadores de hemicanales de mayor especificidad, según lo reportado en la literatura, los péptidos

inhibidores para Conexina 43, Gap26 y Gap27, y para Panexina 1, E1b y 10panx1 (Pelegri y Surprenant, 2006; Decrock y cols., 2009).

Los niveles extracelulares de ATP, liberado por los astrocitos DITNC<sub>1</sub> en respuesta a Thy-1, se vieron disminuidos cuando se estimularon astrocitos tratados previamente con bloqueadores de los hemicanales, conexinas y panexinas, mientras que inhibidores de la exocitosis no afectaron esta respuesta. La salida a niveles fisiológicos de ATP desde las células por medio de conexinas o panexinas ha sido ampliamente descrita en la literatura (Bennet y cols., 2012; Orellana y cols., 2012); no obstante, existen pocos reportes sobre salida de ATP a través de ambos hemicanales para mediar una misma respuesta. Particularmente, se ha descrito este fenómeno en respuesta a FGF en astrocitos de medula espinal, (Garré y cols., 2010); sin embargo, no se conocen antecedentes que relacionen a Thy-1 con estas vías de salida de ATP. Sí hay antecedentes que vinculen a la Conexina 43 con integrinas, particularmente con la Integrina  $\alpha 5$ . Numerosos reportes han mostrado que existe una interacción funcional entre ambas proteínas, donde la integrina, tras ser fosforilada por Akt, induce la apertura de Conexina 43, a través de una interacción física que involucra a una isoforma de la proteína 14-3-3 (Batra y cols., 2012, 2014a y 2014b). Esto podría ser relevante en nuestro modelo de estudio, dado que hemos demostrado activación de Akt río debajo de la interacción Thy-1-Integrina (Kong y cols, 2013).

Respecto a los mecanismos involucrados en la liberación de ATP, esta tesis muestra por primera vez que la salida de ATP inducida por Thy-1 ocurre a

través de hemicanales. Por ello, entender cómo Thy-1 genera la apertura de panexinas y conexinas fue el siguiente paso. Se ha descrito ampliamente en la literatura distintas vías transduccionales involucradas en este fenómeno: Calmodulina, CaM Quinasa, p38, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre otras (Bennett y cols., 2012; Orellana y cols., 2013). La mayoría de estas rutas están conectadas con la presencia del ión calcio; esto, sumado a que Thy-1 induce aumento de calcio intracelular en astrocitos DITNC<sub>1</sub>, proveniente de fuentes intracelulares (esta tesis) y extracelulares (Henriquez y cols., 2011), permite suponer la posibilidad de que aumentos iniciales en los niveles de calcio estén relacionados con la salida de ATP inducida por Thy-1.

Los experimentos mostrados sugieren que la apertura de hemicanales y la salida de ATP requieren el aumento de calcio intracelular inducido por Thy-1. Este calcio proviene del retículo endoplasmático y sale a través del canal de calcio receptor de IP3. Esto concuerda con los resultados presentados por Leyton y colaboradores donde se ve que el bloqueo del receptor de IP3 disminuye la activación de RhoA y el incremento en el área y el número de las adhesiones focales inducido por Thy-1 (Henriquez y cols., 2011). ¿Cómo este aumento de calcio lleva a la apertura de los hemicanales? es una pregunta que actualmente busca ser respondida en nuestro laboratorio.

Datos publicados por nuestro laboratorio muestran que la utilización de inhibidores farmacológicos y herramientas genéticas para disminuir la actividad de PKC $\alpha$  atenúan la respuesta a Thy-1 de los astrocitos (Avalos y

cols., 2009). Por otro lado, se ha propuesto que algunos hemicanales poseen sitios putativos para ser fosforilados por PKC $\alpha$  (Bao y cols., 2004; 2007). Dado que esta quinasa requiere de calcio para su activación, PKC $\alpha$  es una candidata para conectar los aumentos de calcio provenientes del retículo inducidos por Thy-1 con la salida de ATP a través de la fosforilación de conexinas y panexinas.

Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) también han sido relacionadas con la apertura de hemicanales (Zhang y cols., 2008). Se ha descrito en neuronas hipocampales que aumentos intracelulares de calcio aumentan la producción de especies radicalarias en forma local y controlada (Riquelme y cols., 2011); en particular enzimas productoras de superóxido como la NADPH oxidasa aumentan su actividad en presencia de cambios particulares en las cinéticas del ión calcio (Wei y cols., 2010). La producción de ROS y RNS por la mitocondria, también es regulada por calcio (Myhre y cols., 2001). De acuerdo a lo anterior, la combinación de señales de calcio junto a las señales de especies reactivas son candidatos a inducir la apertura de hemicanales ya sea por una modificación oxidativa directa o a través de proteínas intermediarias como CaM Quinasa.

Los resultados que relacionan a hemicanales con la respuesta a Thy-1 están de acuerdo con publicaciones que muestran la función de Conexina 43 en la migración y la polaridad en distintos tipos celulares (Xu y cols., 2006; Francis y cols., 2011). El aumento de los eventos migratorios requiere de la

fosforilación de Conexina 43 por parte de la vía PI3K/Akt, activada río abajo de la Integrina  $\alpha 5\beta 1$  (Kim y cols., 2010). Hay que considerar además que Conexina 43 aumenta sus niveles en condiciones inflamatorias y se ha mostrado que su bloqueo es importante en los procesos de recuperación del daño a la médula espinal (Cronin y cols., 2008) o neuroinflamación en general (Roscoe y cols., 2007). Además nuestros resultados indican que la unión de Thy-1 a la Integrina  $\alpha \nu \beta 3$ , pero no a Síndecan-4, activa la PI3K de manera dependiente de la autofosforilación de FAK. Adicionalmente, la desfosforilación de Akt ocurre más rápido cuando Thy-1 interacciona con la Integrina y Síndecán-4 que cuando interacciona sólo con Integrina (Kong y cols., 2013). Estos resultados sugieren que Síndecan-4 no afecta la fosforilación de Akt mediada por la unión de Thy-Integrina pero regula positivamente su desfosforilación. Por ello, la posibilidad que la activación de rutas río abajo de la interacción Thy-1 con Integrinas, que incluyen la vía PI3K/Akt, lleven a la apertura de hemicanales mediada por su fosforilación es una alternativa que está siendo estudiada en nuestro laboratorio.

### **8.3. Salida de Calcio por receptor de IP3**

En concordancia a los resultados que proponen al calcio, proveniente de la activación del canal de calcio receptor de IP3, como participante en la ruta que lleva a la salida de ATP, adhesión y migración de astrocitos inducidas por Thy-1, también se ha descrito a PLC $\gamma$ . Relacionado con este aspecto,

nuestros resultados indican que el inhibidor de PLC $\gamma$  U73122 inhibe la activación de RhoA, evita la formación de adhesiones focales (datos no publicados, Tesis de Alejandra Valdivia, Figura suplementaria 1) y la salida de ATP frente al estímulo con Thy-1 (datos no publicado Figura suplementaria 2). Las vías río abajo de PLC $\gamma$  también han sido relacionada con la actividad de mTORc2, un complejo multiproteico compuesto por el blanco de rapamicina de mamífero (mTOR), RICTOR y una quinasa (Razmara y cols., 2013). Este complejo ha sido asociado a la regulación del citoesqueleto, en particular de los microfilamentos de actina (He y cols., 2013). mTORc2 induce la apertura de IP3R (Betz y cols., 2013) y modula procesos migratorios a través de la supresión de la actividad de una de las RhoGDI (Agarwal y cols., 2013), proteínas que impiden el accionar de las RhoGTPasas al mantenerse unida a ellas; de esta manera al inactivarse las GDI, las RhoGTPasas quedan libres y pueden regular la migración celular. Además, mTORc2 también ha sido relacionada con aumento en la activación de Akt (Razmara y cols., 2013), evento que, de acuerdo a lo reportado en nuestro laboratorio, ocurre río abajo de la interacción de Thy-1 con la Integrina  $\alpha\beta$ 3 (Kong y cols, 2013).

De acuerdo a los antecedentes expuestos, sería interesante estudiar si mTORc2, en nuestro modelo, participa en el aumento de adhesiones focales o migración celular o más directamente en la salida de ATP, dependiente de la interacción Thy-1-Integrina  $\alpha\beta$ 3 y del calcio proveniente del receptor IP3, Esta vía contemplaría la unión de Thy-1 a la Integrina, activándose PI3K y

PLC $\gamma$ . Posteriormente con la participación de mTORc2 y la generación de IP3 se liberaría calcio desde el retículo endoplásmico, se abrirían los hemicanales y saldría el ATP. Un punto interesante sería observar si hay contribución a la migración de los astrocitos por mTORc2 dependiente o independiente de la salida de ATP y más relacionada con los efectos sobre las GTPasas pequeñas.

#### **8.4. Participación del receptor P2X7 en la formación de adhesiones focales inducida por Thy-1**

El artículo publicado por nuestro grupo describe un fenómeno de transactivación, en el cual la interacción de Thy-1 con sus receptores genera aumento extracelular de ATP, el cual activa al receptor P2X7 (Henríquez y cols., 2011). Resultados de esta tesis, que fueron parte del artículo, muestran en particular, que el receptor P2X7 y ATP extracelular son requeridos para el aumento en el número y área de las adhesiones focales inducido por Thy-1.

No obstante esto, dada la baja afinidad del receptor P2X7 por ATP, no se puede descartar la participación de otros receptores purinérgicos en las respuestas inducidas por el ATP liberado tras la estimulación con Thy-1. Por ejemplo, se ha reportado que el receptor purinérgico acoplado a proteína G, P2Y2, interacciona con la Integrina  $\alpha_v$ , siendo ambos responsables de la

respuesta de los astrocitos frente a un aumento extracelular de los ligandos para el receptor purinérgico (Bagchi y cols., 2005). Precisamente, se ha descrito en una línea celular de neuroblastoma, que la estimulación con el agonista de P2Y2R, UTP, aumenta el calcio intracelular, mediado por Gq, PLC e IP3, puede activar la ruta de las MAP quinasas y también inducir cambios en el citoesqueleto, en la actividad de RhoA, Cofilina y en la migración (Ando y cols., 2010).

Es interesante, además, destacar que la interacción de P2Y2 con la Integrina ocurre en *cis* gracias a una región Arg-Gly-Asp (RGD) presente en el receptor purinérgico (Erb y cols., 2001). Esta interacción es análoga a la que ocurre entre la región RLD presente en Thy-1 y responsable de su interacción con la Integrina  $\alpha\beta3$  (Hermosilla y cols, 2008). De acuerdo a esto, el efecto de Thy-1 sobre los astrocitos podría relacionarse también con cambios en la interacción de las Integrinas  $\alpha\beta3$  con otras moléculas como el receptor P2Y2, así como la regulación de la respuesta de los receptores a sus respectivos ligandos.

Interesantemente, la conversación cruzada de Integrina  $\alpha\beta3$  con el receptor P2Y2 puede darse no sólo en la parte extracelular. Se ha descrito que la actividad como factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) de los receptores acoplados a proteína G, que es parte importante de su señalización intracelular, depende de la actividad de otras GEFs y de proteínas activadoras de la actividad GTPásica (GAPs) (Bhattacharya y cols., 2004). Este tipo de proteínas regulan la actividad de las GTPasas

pequeñas como Rho y Rac, moléculas cuya actividad varía en astrocitos en respuesta a Thy-1, según lo descrito por nuestro laboratorio (Avalos y cols., 2004 y 2009; Kong y cols., 2013). Por lo que, las consecuencias de una posible activación de la proteína Gq del receptor P2Y2, que podrían incluir la activación de PLC $\beta$ , estarán determinadas por la intensidad y temporalidad de la actividad de las reguladoras GEFs y GAPs.

Además, en una línea celular de astrocitoma humano se ha descrito que P2Y2R puede activar señalización a través de proteínas G<sub>o</sub> y G<sub>12/13</sub>, requiriendo para ello a la Integrina  $\alpha$ v y sobretodo la presencia intacta en la Integrina del sitio de unión a la secuencia RGD del P2Y2R (Liao y cols., 2007). Particularmente, la activación de la proteína G<sub>12/13</sub> es relevante, ya que ésta ha sido relacionada con cambios en la actividad de las GTPasas pequeñas de la familia Rho (Tanabe y cols., 2004). En concordancia con esto, se demostró que vías dependientes de G<sub>12/13</sub> son responsables de la migración, fosforilación de la cadena liviana de la miosina 2 (MLC-2), la activación de Rho y la formación de fibras de estrés (Liao y cols., 2007). De acuerdo a esto, también podría ser de interés analizar la participación de esta proteína G en los eventos desencadenados por Thy-1 en astrocitos. a pesar del posible rol de P2Y2, los resultados mostrados en esta tesis usando el ARNi contra P2X7 demuestran que este receptor es necesario para la migración de astrocitos inducida por Thy-1 (Figura 15B).

## **8.5. Participación del receptor P2X7 en la migración de astrocitos inducida por Thy-1**

Considerando la participación de P2X7R en el aumento de adhesiones focales inducido por Thy-1 y que la estimulación sostenida por 24 horas con Thy-1 induce la migración de los astrocitos, se investigó si el receptor purinérgico tiene participación en esta respuesta. Los resultados muestran que efectivamente P2X7R es necesario, al igual que el ATP extracelular, para estimular la migración de los astrocitos DITNC<sub>1</sub>.

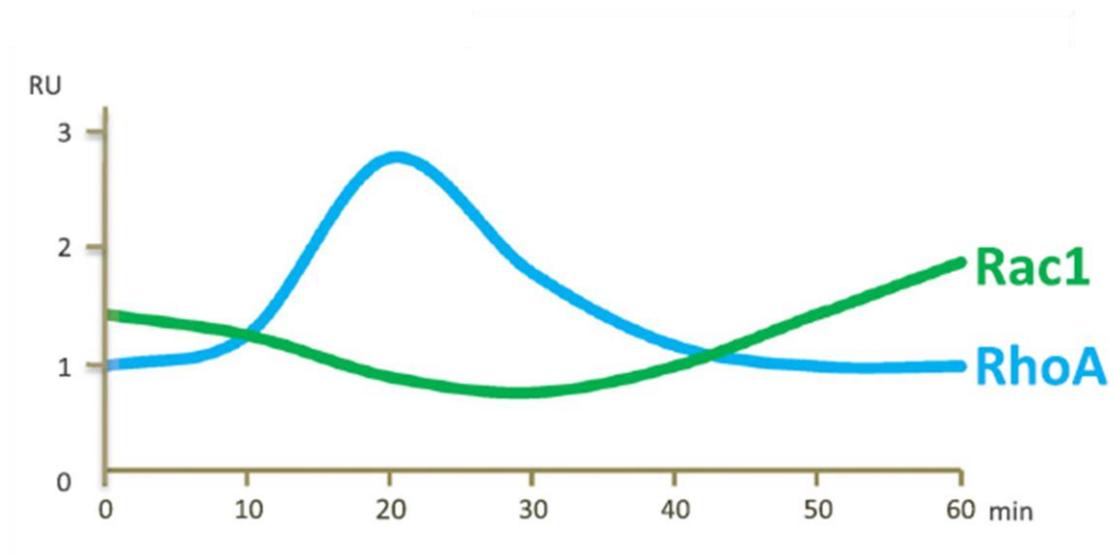
Posibles explicaciones de cómo la activación directa del receptor P2X7 por BzATP puede inducir respuestas similares a Thy-1, se basan en reportes de que el receptor P2X7 es capaz de conducir a la activación o de interactuar en su gran dominio intracelular con proteínas relacionadas con la formación de adhesiones focales, como las quinasas Src y FAK (Denlinger y cols., 2001), lo que podría derivar en la activación de rutas transduccionales que generen cambios en la adhesividad de la célula a corto plazo y cambios en la migración tras estimulaciones de larga duración.

Complementario a esta posibilidad, se ha reportado que la activación del receptor P2X7 induce un aumento en la expresión de P2Y2 (D'Alimonte y cols., 2007); además, la presencia de P2Y2 también ha sido presentado como necesario para los efectos río abajo de P2X7R (Craigie y cols, 2013). Particularmente interesantes, son los resultados que muestran que BzATP puede provocar aumentos de calcio intracelular en ausencia de calcio

extracelular y que además BzATP tiene como receptor potencial a P2Y2 (Suplat-Wypych y cols., 2010). Considerando estos antecedentes, no podemos excluir que parte de los efectos descritos en este trabajo requieran, en parte, de la participación del receptor P2Y2.

### **8.6. Cambios en los efectos sobre los astrocitos inducidos por Thy-1**

En los primeros 30 minutos, Thy-1 induce el aumento de adhesiones focales (Hermosilla y cols., 2008), en tanto estimulaciones prolongadas y sostenidas de los astrocitos con Thy-1 induce un aumento en la migración de las células (Kong y cols., 2013). ¿Cómo se produce este cambio de fuerte adhesión a migración frente a un mismo estímulo? Se ha propuesto que este cambio de comportamiento puede deberse a la regulación de la activación de distintas GTPasas pequeñas. En particular, se sabe que un aumento de la actividad de RhoA se relaciona con aumento de la adhesividad de las células, mientras que la inducción de la migración se corresponde con incrementos en la actividad de Rac1. Esta relación inversa entre Rho y Rac activos también se ve reflejada en la estimulación con Thy-1, nuestro grupo describió que un máximo de activación de RhoA ocurre tras 20 minutos de estimulación con Thy-1 seguido de una baja en los niveles de Rho activo, que coincide con un aumento de Rac1 activado (Figura 25) (Kong y cols., 2013).



**Figura 25. Cambios en los niveles de proteínas G pequeñas inducidos por Thy-1.** Los niveles de RhoA y Rac activos (unidos a GTP) cambian en forma inversamente proporcional tras estimulación sostenida de Thy-1 durante los tiempos que se señalan en el gráfico. Niveles altos de RhoA-GTP coinciden con disminución en los niveles totales de Rac1-GTP, situación inversa ocurre cuando aumenta ésta última (Kong y cols., 2013).

En particular a lo referido a Thy-1, la estimulación sostenida puede activar vías transduccionales distintas a las activadas a tiempos cortos de estimulación, por ejemplo estos cambios se podrían reflejar en la activación de los receptores Integrina  $\alpha\beta 3$  y Síndecan-4, en ellos se ha visto que cambios en la capacidad de ser fosforilados de ambos receptores afecta la capacidad de la célula para formar y renovar adhesiones focales, y en consecuencia, modificar su capacidad migratoria (Chandhokey col., 2004; Morgan y cols., 2013). La manera en que Thy-1 pueda modular este recambio de adhesiones focales, ya sea en el frente de avance o en la cola

de las células, se convertiría en un evento clave para entender esta dualidad funcional. Se sabe que adhesiones focales estables disminuyen la migración celular, en tanto que adhesiones renovadas constantemente en el frente de avance permiten que las células puedan moverse, por lo que analizar la tasa de recambio de las adhesiones focales a tiempos cortos (15 minutos) y largos (7 ó 24 horas, por ejemplo) serán experimentos claves que podrían ayudar a aclarar la dicotomía de la respuesta a Thy-1.

### **8.7. Participación del receptor P2X7 en la migración de astrocitos inducida por BzATP**

El agonista del receptor P2X7, BzATP, induce aumento en el número de células polarizadas y la migración de los astrocitos, ambos efectos son inhibidos por el antagonista del receptor, BBG. Estos resultados quedan inmersos en la controversia presente en literatura, donde se ha reportado que la activación del receptor P2X7 induce migración de células de retina (Mayo y cols., 2008; Mankus y cols., 2011), mientras que otros autores descartan este efecto en otros tipos celulares (Kumagai y cols., 2013). Por otro lado, Wei y colaboradores demostraron que concentraciones de BzATP mayores a las usadas en este trabajo aumentan la migración de células de glioma (Wei y cols., 2008).

En nuestro trabajo se observó que concentraciones altas de BzATP (100  $\mu$ M) induce cierre de herida de astrocitos DITNC<sub>1</sub>, mientras que

concentraciones menores a 10  $\mu\text{M}$  no logran inducir este efecto. No obstante, cuando los astrocitos son estimulados simultáneamente con BzATP (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) y Thy-1 mutado en el sitio de unión de a Integrina, sí se induce migración, sugiriendo que estas concentraciones menores de BzATP tienen un efecto sinérgico con la activación río abajo de Síndecan-4 sobre la migración de los astrocitos. No ocurre lo mismo al estimular concomitantemente con BzATP a bajas concentraciones y con Thy-1 mutado en el sitio de unión a Heparina. Dado que Thy-1 sólo estimula la migración de los astrocitos cuando interacciona con sus dos receptores, estos resultados estarían indicando que BzATP reemplazaría las vías río abajo de Integrina  $\alpha\beta 3$  o que estas vías confluyen en eventos que originan la salida de ATP y activación de P2X7R como principal efecto para inducir cambios en la adhesividad y migración.

Estos resultados permiten confirmar que la proposición mencionada anteriormente sobre por qué Thy-1 mutado en el sitio de unión a Heparina induce pequeños aumentos extracelulares de ATP, pero no otras respuestas en los astrocitos, está correcta. Esas concentraciones bajas de agonistas del receptor P2X7 no logran generar una respuesta de los astrocitos, requiriendo la potenciación de la señal activadora gracias a la participación de las rutas río abajo de Síndecan-4. Pero, concentraciones altas de BzATP, que son capaces de activar las rutas dependientes de P2X7R, sí consiguen inducir aumento en el número y área de las adhesiones focales en tiempos cortos, y estimulaciones prolongadas inducen migración de los astrocitos.

## 8.8. Respuesta de astrocitos primarios a Thy-1

Resultados previos no publicados de nuestro laboratorio muestran que los astrocitos de cultivo primario no responden a la estimulación con Thy-1 y tampoco son capaces de inhibir el crecimiento de las neuritas ni inducir la retracción axonal, eventos realizados por los astrocitos DITNC<sub>1</sub>. La explicación a esta situación se ha buscado ampliamente en nuestro laboratorio. Se observó que los astrocitos de cultivo primario no expresan uno de los receptores para Thy-1, la Integrina  $\beta 3$ , proteína que sí es expresada por la línea celular DITNC<sub>1</sub>. Los factores que regulan la expresión de la Integrina  $\beta 3$  no se han descrito ampliamente, en particular hay antecedentes de la literatura que describen que en situaciones inflamatorias como la isquemia post infarto del sistema nervioso central (Ellison y cols., 1999) aumentan los niveles de Integrina  $\beta 3$ . Resultados de nuestro laboratorio muestran que estímulos proinflamatorios como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (Figura suplementaria 3, Resultados no publicados de Tesis de Rodrigo Herrera-Molina) aumentan la expresión de la Integrina  $\beta 3$ .

En particular, en este trabajo mostramos que el tratamiento con TNF $\alpha$ , permite que los astrocitos primarios respondan a Thy-1, induciendo su migración. Esta respuesta es atenuada tras silenciar la expresión de Integrina  $\beta 3$  en astrocitos tratados con la citoquina, en tanto la sobreexpresión de Integrina  $\beta 3$  es suficiente para que los astrocitos respondan a Thy-1, aunque las células no hayan sido tratadas previamente

con TNF $\alpha$ . Con esto se demuestra que la capacidad de los astrocitos primarios de responder a Thy-1 depende de la presencia de Integrina  $\beta$ 3.

Se han descrito en la literatura un gran número de proteínas que cambian su expresión en astrocitos sometidos a un estrés inflamatorio, como GFAP, Nestina o Conexina 43 (Hamby y cols. 2010), pero no se ha descrito a la Integrina  $\beta$ 3 dentro de este grupo. Posibles formas de cómo TNF $\alpha$  aumenta la expresión de la Integrina, podría desprenderse de la regulación de la expresión de otras integrinas en un ambiente inflamatorio. Por ejemplo, se ha descrito que tras una herida de la médula espinal, la actividad de la quinasa de la Glicógeno Sintasa-3 es necesaria para aumentar la expresión de la Integrina  $\beta$ 1 (Renault-Minara, y cols, 2011). No obstante esto, aunque antecedentes en astrocitos son escasos, en otros tipos celulares, los datos son contradictorios. En células de condrosarcoma, la estimulación con TNF $\alpha$  aumenta la expresión de la Integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3 y la migración celular (Hou y cols., 2011). En tanto que en microglia, este mismo estímulo se ha reportado como represor de la expresión de las integrinas (Milner y cols., 2009). Lo mismo ocurre si se amplían los antecedentes a otras integrinas, en distintos tipos celulares, TNF $\alpha$  aumenta la expresión o disminuye la expresión de variadas integrinas. Incluso en el mismo tipo celular, hay aumentos de una clase de integrinas y disminución de otra, lo que apunta a mecanismos dependientes del contexto celular (Fukushima y cols., 2003).

De acuerdo a los resultados presentados, los astrocitos de cultivo primario tras ser sometido a condiciones inflamatorias, aumentan la expresión de

Integrina  $\beta 3$  y se comportan como la línea celular astrocitaria DITNC<sub>1</sub>, respecto a su respuesta a Thy-1. En estas condiciones, según resultados preliminares, los astrocitos primarios muestran liberar ATP al medio extracelular tras ser estimulados por Thy-1 (Figura suplementaria 4). De alto interés, sería analizar los niveles de Conexina 43 y Panexina 1 en nuestros astrocitos reactivos, pues, en condiciones proinflamatoria Conexina 43 aumenta sustantivamente, siendo necesario corroborar si dada esta situación se mantiene la participación compartida con la Panexina 1 en la salida de ATP desde los astrocitos o si se ve afectada por una potencial diferencia en la expresión de ambos hemicanales, asumiendo que ellos están involucrados en la liberación de ATP desde los astrocitos primarios.

Otro punto interesante para comparar las respuestas entre ambos tipos celulares es la presencia de los otros receptores de Thy-1, aunque la sobreexpresión de Integrina  $\beta 3$  parece ser suficiente para permitir a los astrocitos primarios responder a Thy-1. Sería importante saber si la expresión de Integrina  $\alpha v$  o Síndecan-4 también se ven alteradas con la sobreexpresión de Integrina  $\beta 3$  o si presentan niveles basales de ellos en ausencia de citoquinas inflamatorias suficientes para hacer la respuesta exclusivamente dependiente de los niveles de Integrina  $\beta 3$ .

El progresivo y exitoso traslado desde un modelo de línea celular a células de cultivo primario, permiten proyectar este trabajo hacia modelos aún más complejos. Dentro del estudio de daño inflamatorio, existen numerosos modelos *in vivo* de daño por trauma o por neurodegeneración donde sería

importante estudiar la participación de la interacción de Thy-1 con sus receptores en la perpetuación del daño y la incapacidad de recuperación. En particular, se sabe de modelos de rompimiento de médula espinal que el ATP liberado durante el daño y la rápida activación del receptor P2X7 son determinantes en el mal pronóstico del daño y la mala recuperación post-herida (Peng y cols., 2009). Estos efectos agudos han sido claramente determinados, a pesar de que algunos autores no han podido reproducir los resultados descritos (Marcillo y cols., 2012), pero el daño crónico por el ATP y el rol que pueda jugar Thy-1 no han sido estudiados en este tipo de modelos.

Este trabajo se centra en los efectos de Thy-1 sobre los astrocitos al interactuar con sus receptores. No obstante la proyección de este trabajo está directamente relacionada con otra línea de investigación en nuestro laboratorio enfocada en el efecto de los astrocitos sobre las neuronas, teniendo a Thy-1 como el receptor de esta interacción en las neuronas. Nuestro laboratorio ha descrito que la interacción de Thy-1 con la Integrina  $\alpha\beta 3$  conduce a la inhibición del crecimiento de las neuritas y estimula la retracción de las prolongaciones ya formadas, en un mecanismo que requiere la agrupación de diversas moléculas de Thy-1, reforzando el concepto de la bidireccionalidad de los efectos de la interacción neurona – astrocito (Herrera-Molina y cols., 2012 y 2013). Desde una perspectiva funcional de la comunicación célula – célula, es relevante conocer cómo se regula esta interacción y el rol de Síndecan-4 en la respuesta gatillada en las

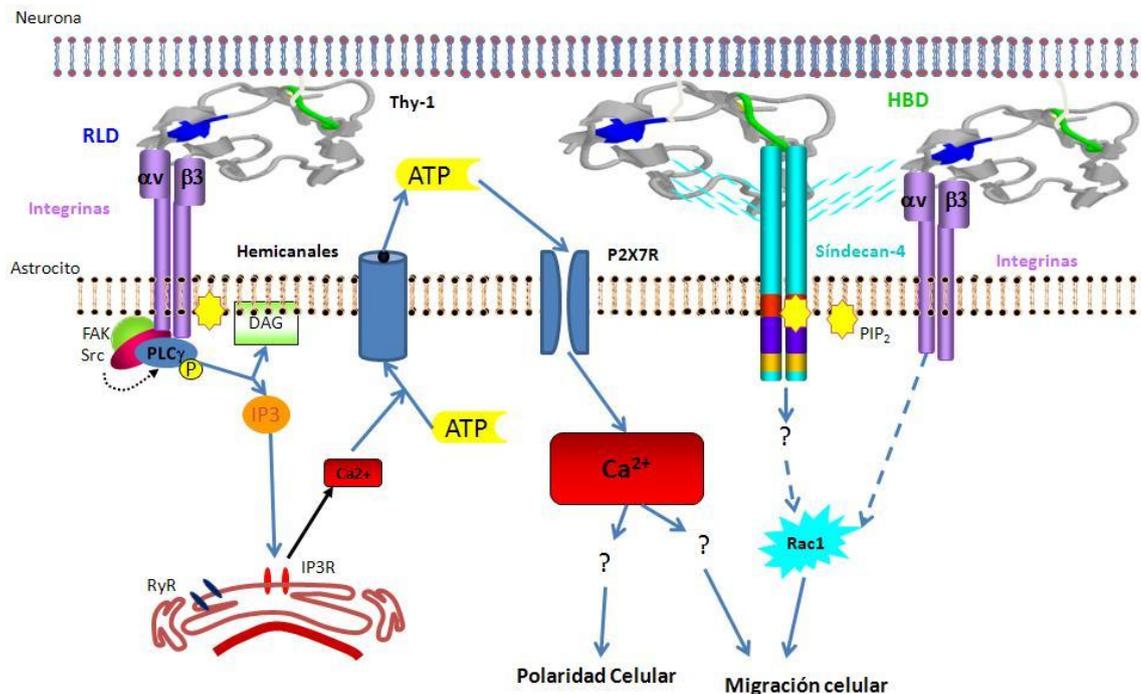
neuronas. De esa manera se podría lograr entender los mecanismos involucrados en la migración de los astrocitos y la inhibición de la regeneración axonal y con ello conseguir una posible oportunidad terapéutica.

La utilización de anticuerpos anti Integrinas  $\alpha_v$  o  $\beta_3$  u otros mecanismos que bloqueen su interacción con Thy-1 en modelos *in vivo* de daño inflamatorio, podría ser un punto de partida para clarificar la relevancia de los fenómenos descritos en esta tesis y la potencialidad terapéutica del bloqueo de los receptores de Thy-1 o sus efectos río abajo en los astrocitos. También, puede resultar clave el análisis de alguna ventana temporal donde se pueda lograr un tratamiento más efectivo para estos blancos, considerando que la interacción de la neurona con el astrocito puede permanecer un tiempo considerable, mientras el daño se vuelve crónico.

Para finalizar, se resumen los principales hallazgos descritos en este trabajo:

- La interacción de Thy-1 con la Integrina  $\alpha_v\beta_3$  genera salida de ATP desde los astrocitos, a través de los hemicanales Connexina 43 y Panexina 1. Esta salida es regulada por la interacción de Thy-1 con Síndecan-4.
- La salida de ATP inducida por Thy-1 requiere la participación de calcio intracelular proveniente del retículo endoplasmático a través del receptor de IP3.

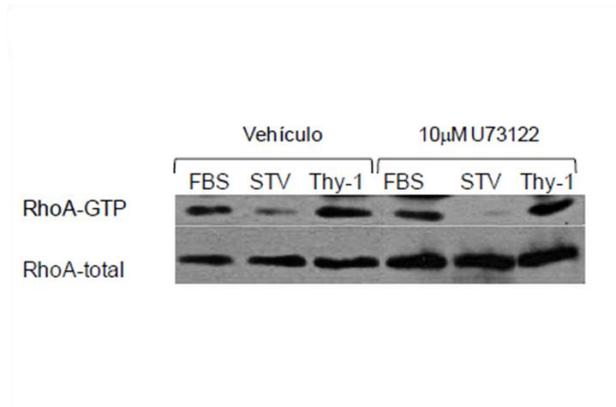
- El ATP extracelular y el receptor P2X7 están involucrados en el aumento de adhesiones focales inducido por Thy-1 en tiempos cortos de estimulación.
- El ATP extracelular y el receptor P2X7 se requieren para la migración de astrocitos DITNC<sub>1</sub> inducida por la estimulación sostenida con Thy-1.
- Los astrocitos de cultivo primario responden a Thy-1 tras ser incubados con la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$ .
- Los astrocitos de cultivo primario requieren de la expresión de la Integrina  $\beta 3$  para responder a Thy-1.
- La migración de astrocitos de cultivo primario también requiere de ATP extracelular y la activación del receptor P2X7.



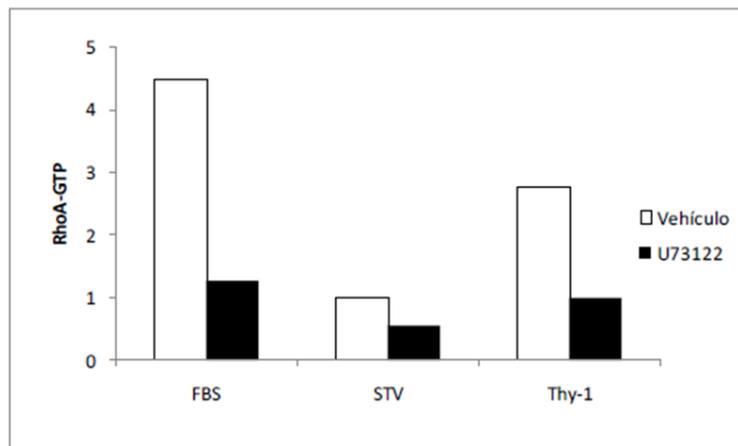
**Figura 26. Esquema propuesto.** Resumen de los resultados presentados en esta tesis: la interacción de Thy-1 con la Integrina  $\alpha\beta3$  provoca la salida de ATP a través de hemicanales, por la activación de un mecanismo que involucra la salida de calcio desde el retículo por el IP3R. El ATP extracelular activa el receptor P2X7, aumentando el calcio intracelular, eventos requeridos para la migración de los astrocitos inducida por Thy-1. El signo de interrogación (?) se muestra cuando se desconoce las posibles rutas involucradas en generar la respuesta final. Las líneas continuas corresponden a propuestas de eventos directos, mientras que las líneas segmentadas, a propuestas de varias etapas en la vía.

## 9.. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

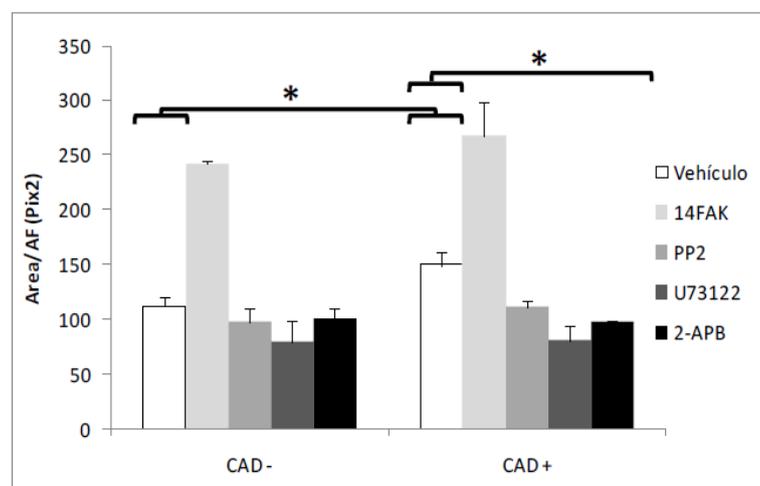
**A)**



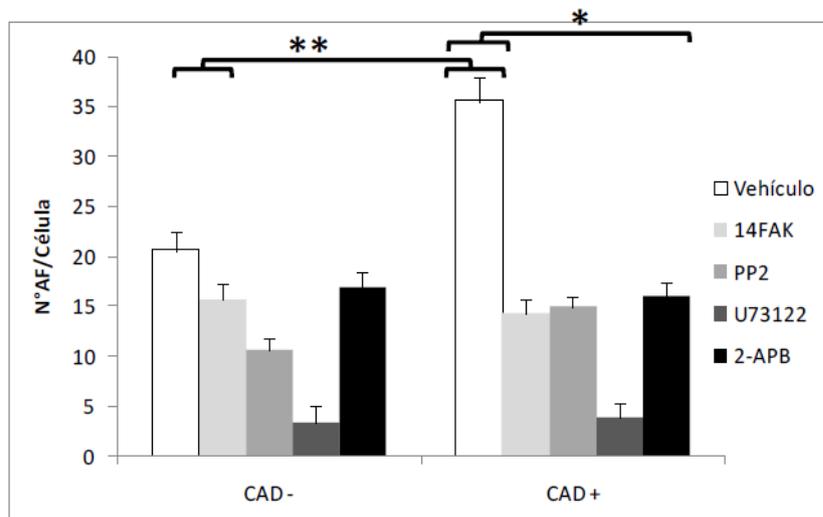
**B)**



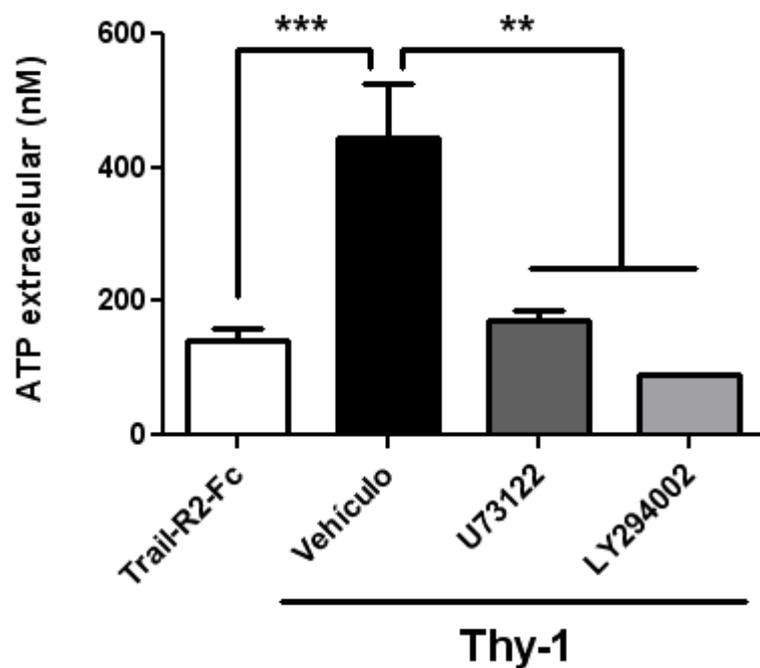
**C)**



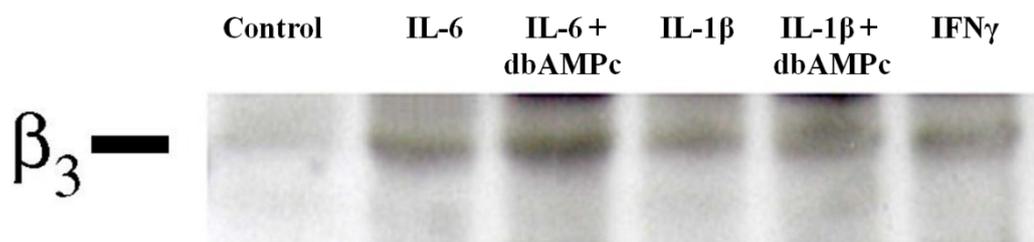
D)



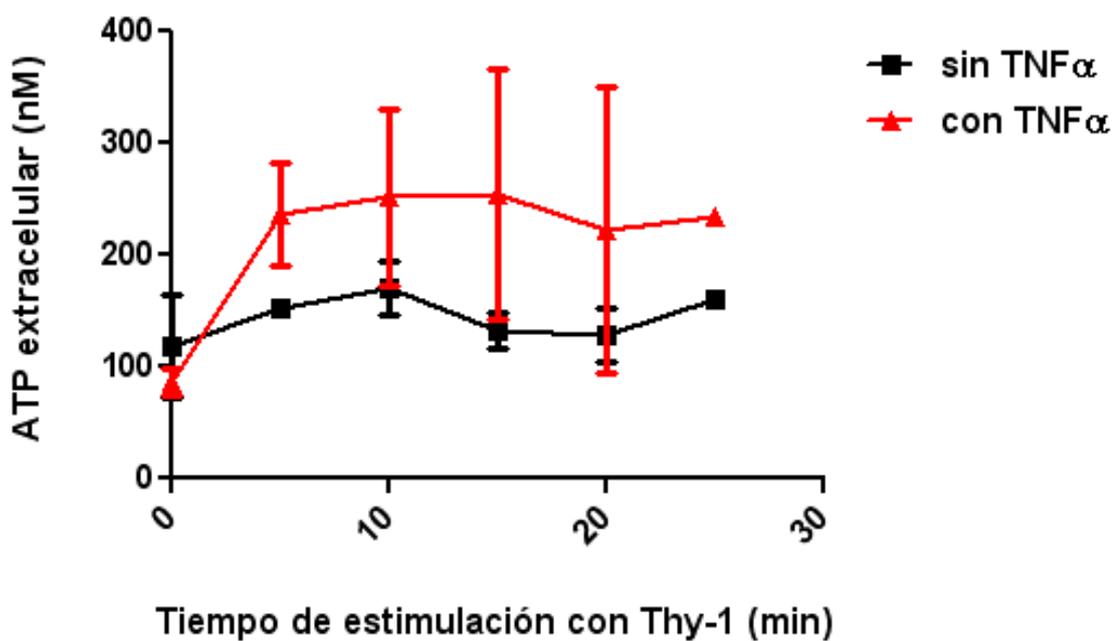
**Figura suplementaria 1. Inhibidor de PLC $\gamma$  disminuye la activación de RhoA y el aumento de área y número de adhesiones focales inducida por Thy-1.** A) Astroцитos DI-TNC<sub>1</sub>, tras ser privados de suero por 16 horas, fueron estimulados con Thy-1-Fc-Proteína A, Suero fetal de bovino (FSB) 3 % o con medio de cultivo (STV). Se realizó inmunowestern blot contra RhoA activo (unido a GTP) o RhoA total; donde se señala, las células fueron tratadas previo al estímulo con U73122. B) Cuantificación de experimento descrito en A). C) Cuantificación del área de las adhesiones focales presentes en astroцитos estimulados con células neuronales CAD, las células fueron tratadas previamente con un inhibidor de FAK, 14FAK; un inhibidor de Src, PP2, un inhibidor de PLC $\gamma$ , U73122; y un inhibidor de IP3R, 2-APB. D) Cuantificación del número de adhesiones focales por célula presente en astroцитos estimulados con células neuronales CAD, las células fueron tratadas previamente con 14FAK, PP2, U73122 y 2-APB. Figura tomada de la tesis de doctorado en Ciencias Biomédicas de la Dra. Alejandra Valdivia. (\*\* p < 0,01, \* p < 0,05).



**Figura Suplementaria 2. Inhibidor de PLC $\gamma$  e inhibidor de PI3K disminuyen el aumento de ATP extracelular inducido por Thy-1.** Se evaluó la concentración extracelular de ATP en astrocitos DI-TNC<sub>1</sub> que fueron tratados por 10 minutos con Thy-1-Fc-Proteína A (1,1  $\mu$ g por cada 50000 células); donde se señala, las células fueron tratadas previas al estímulo con el inhibidor de PLC $\gamma$ , U73122 (10  $\mu$ M), y con el inhibidor de PI3K, LY294002 (10  $\mu$ M). Se muestra el promedio más desviación estándar de 3 experimentos (\*\* $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ ).



**Figura Suplementaria 3. Aumento de expresión de Integrina  $\beta_3$  en astrocitos de cultivo primario tratados con citoquinas proinflamatorias.** Se realizó inmunowestern blot contra Integrina  $\beta_3$  en astrocitos de cultivo primario obtenido de ratas neonatas de dos días, que fueron tratados con las citoquinas proinflamatorias IL-6 (20000 U/mL), IL-1 $\beta$  (10 ng/mL), IFN $\gamma$  (10000 U/mL), donde se señala se utilizó dbAMPc (10  $\mu$ M). Figura tomada y modificada de la tesis de doctorado en Ciencias Biomédicas del Dr. Rodrigo Herrera.



**Figura Suplementaria 4. La estimulación con Thy-1 induce el aumento de ATP extracelular en astrocitos de cultivo primario.** Se evaluó la concentración de ATP en sobrenadante de astrocitos de cultivo primario estimulados a diferentes tiempos con Thy-1-Fc-Proteína A (1,1  $\mu$ g cada 50.000 células). Se muestra el promedio más desviación estándar de 3 experimentos.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Agarwal, N. K., Chen, C. H., Cho, H., Boulbes, D. R., Spooner, E. y Sarbassov, D. D. (2013). Rictor regulates cell migration by suppressing RhoGDI2. *Oncogene* 32, 2521-6.
- Ando, K., Obara, Y., Sugama, J., Kotani, A., Koike, N., Ohkubo, S. y Nakahata, N. (2010). P2Y2 receptor-Gq/11 signaling at lipid rafts is required for UTP-induced cell migration in NG 108-15 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 334, 809-19.
- Avalos, A. M., Arthur, W. T., Schneider, P., Quest, A. F., Burridge, K. y Leyton, L. (2004). Aggregation of integrins and RhoA activation are required for Thy-1-induced morphological changes in astrocytes. *J Biol Chem* 279, 39139-45.
- Avalos, A. M., Labra, C. V., Quest, A. F. y Leyton, L. (2002). Signaling triggered by Thy-1 interaction with beta 3 integrin on astrocytes is an essential step towards unraveling neuronal Thy-1 function. *Biol Res* 35, 231-8.
- Avalos, A. M., Valdivia, A. D., Munoz, N., Herrera-Molina, R., Tapia, J. C., Lavandero, S., Chiong, M., Burridge, K., Schneider, P., Quest, A. F. et al. (2009). Neuronal Thy-1 induces astrocyte adhesion by engaging syndecan-4 in a cooperative interaction with alphavbeta3 integrin that activates PKCalpha and RhoA. *J Cell Sci* 122, 3462-71.
- Bagchi, S., Liao, Z., Gonzalez, F. A., Chorna, N. E., Seye, C. I., Weisman, G. A. y Erb, L. (2005). The P2Y2 nucleotide receptor interacts with alphav integrins to activate Go and induce cell migration. *J Biol Chem* 280, 39050-7.
- Bao, Y., Chen, Y., Ledderose, C., Li, L. y Junger, W. G. (2013). Pannexin 1 channels link chemoattractant receptor signaling to local excitation and global inhibition responses at the front and back of polarized neutrophils. *J Biol Chem* 288, 22650-7.
- Barber, M. A. y Welch, H. C. (2006). PI3K and RAC signalling in leukocyte and cancer cell migration. *Bull Cancer* 93, E44-52.
- Bardehle, S., Kruger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., Snippert, H. J., Theis, F. J., Meyer-Luehmann, M., Bechmann, I. et al. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat Neurosci* 16, 580-6.
- Bass, M. D., Williamson, R. C., Nunan, R. D., Humphries, J. D., Byron, A., Morgan, M. R., Martin, P. y Humphries, M. J. (2011). A syndecan-4 hair trigger initiates wound healing through caveolin- and RhoG-regulated integrin endocytosis. *Dev Cell* 21, 681-93.
- Batra, N., Burra, S., Siller-Jackson, A. J., Gu, S., Xia, X., Weber, G. F., DeSimone, D., Bonewald, L. F., Lafer, E. M., Sprague, E. et al. Mechanical stress-activated integrin alpha5beta1 induces opening of connexin 43 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3359-64.

- Batra, N., Riquelme, M. A., Burra, S. y Jiang, J. X. 14-3-3theta facilitates plasma membrane delivery and function of mechanosensitive connexin 43 hemichannels. *J Cell Sci* 127, 137-46.
- Batra, N., Riquelme, M. A., Burra, S., Kar, R., Gu, S. y Jiang, J. X. Direct regulation of osteocytic connexin 43 hemichannels through AKT kinase activated by mechanical stimulation. *J Biol Chem* 289, 10582-91.
- Bennett, M. V., Garre, J. M., Orellana, J. A., Bukauskas, F. F., Nedergaard, M. y Saez, J. C. (2012). Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res* 1487, 3-15.
- Betz, C., Stracka, D., Prescianotto-Baschong, C., Frieden, M., Demarex, N. y Hall, M. N. (2013). Feature Article: mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12526-34.
- Bhattacharya, M., Babwah, A. V. y Ferguson, S. S. (2004). Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans* 32, 1040-4.
- Craig, W., Kay, R., Cutler, R. L. y Lansdorp, P. M. (1993). Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 177, 1331-42.
- Cronin, M., Anderson, P. N., Cook, J. E., Green, C. R. y Becker, D. L. (2008). Blocking connexin43 expression reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci* 39, 152-60.
- Chan, K. T., Bennin, D. A. y Huttenlocher, A. (2010). Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *J Biol Chem* 285, 11418-26.
- Chandhoke, S. K., Williams, M., Schaefer, E., Zorn, L. y Blystone, S. D. (2004). Beta 3 integrin phosphorylation is essential for Arp3 organization into leukocyte alpha V beta 3-vitronectin adhesion contacts. *J Cell Sci* 117, 1431-41.
- Chen, C. H., Wang, S. M., Yang, S. H. y Jeng, C. J. (2005). Role of Thy-1 in in vivo and in vitro neural development and regeneration of dorsal root ganglionic neurons. *J Cell Biochem* 94, 684-94.
- Choi, J., Leyton, L. y Nham, S. U. (2005). Characterization of alphaX I-domain binding to Thy-1. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 557-61.
- D'Alimonte, I., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Nargi, E., Buccella, S., Giuliani, P., Rathbone, M. P., Jiang, S., Caciagli, F. y Ballerini, P. (2007). Activation of P2X(7) receptors stimulates the expression of P2Y(2) receptor mRNA in astrocytes cultured from rat brain. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20, 301-16.
- Decrock, E., De Vuyst, E., Vinken, M., Van Moorhem, M., Vranckx, K., Wang, N., Van Laeken, L., De Bock, M., D'Herde, K., Lai, C. P. et al. (2009). Connexin 43 hemichannels contribute to the propagation of

- apoptotic cell death in a rat C6 glioma cell model. *Cell Death Differ* 16, 151-63.
- Denlinger, L. C., Fiset, P. L., Sommer, J. A., Watters, J. J., Prabhu, U., Dubyak, G. R., Proctor, R. A. y Bertics, P. J. (2001). Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 167, 1871-6.
- Ellison, J. A., Barone, F. C. y Feuerstein, G. Z. (1999). Matrix remodeling after stroke. De novo expression of matrix proteins and integrin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 890, 204-22.
- Erb, L., Liu, J., Ockerhausen, J., Kong, Q., Garrad, R. C., Griffin, K., Neal, C., Krugh, B., Santiago-Perez, L. I., Gonzalez, F. A. et al. (2001). An RGD sequence in the P2Y(2) receptor interacts with alpha(V)beta(3) integrins and is required for G(o)-mediated signal transduction. *J Cell Biol* 153, 491-501.
- Etienne-Manneville, S., Manneville, J. B., Nicholls, S., Ferenczi, M. A. y Hall, A. (2005). Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J Cell Biol* 170, 895-901.
- Evans, W. H. y Boitano, S. (2001). Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochem Soc Trans* 29, 606-12.
- Fitch, M. T. y Silver, J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* 209, 294-301.
- Fournier, A. E., GrandPre, T. y Strittmatter, S. M. (2001). Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409, 341-6.
- Francis, R., Xu, X., Park, H., Wei, C. J., Chang, S., Chatterjee, B. y Lo, C. (2011). Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics. *PLoS One* 6, e26379.
- Fukushima, K., Miyamoto, S., Komatsu, H., Tsukimori, K., Kobayashi, H., Seki, H., Takeda, S. y Nakano, H. (2003). TNFalpha-induced apoptosis and integrin switching in human extravillous trophoblast cell line. *Biol Reprod* 68, 1771-8.
- Ghosh, S., Kumar, A., Tripathi, R. P. y Chandna, S. (2013). Connexin-43 regulates p38-mediated cell migration and invasion induced selectively in tumour cells by low doses of gamma-radiation in an ERK-1/2-independent manner. *Carcinogenesis*.
- Grandpre, T. y Strittmatter, S. M. (2001). Nogo: a molecular determinant of axonal growth and regeneration. *Neuroscientist* 7, 377-86.
- Gregory, C. D., Rossi, A. G., Bournazou, I., Zhuang, L. y Willems, J. J. (2011). Leukocyte migratory responses to apoptosis: the attraction and the distraction. *Cell Adh Migr* 5, 293-7.
- Hamby, M. E. y Sofroniew, M. V. (2010). Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 7, 494-506.

- Hamilton, N. B. y Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* 11, 227-38.
- He, Y., Li, D., Cook, S. L., Yoon, M. S., Kapoor, A., Rao, C. V., Kenis, P. J., Chen, J. y Wang, F. (2013). Mammalian target of rapamycin and Rictor control neutrophil chemotaxis by regulating Rac/Cdc42 activity and the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 24, 3369-80.
- Henriquez, M., Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Alvarez, A., Kong, M., Munoz, N., Eisner, V., Jaimovich, E., Schneider, P., Quest, A. F. et al. (2011). ATP release due to Thy-1-integrin binding induces P2X7-mediated calcium entry required for focal adhesion formation. *J Cell Sci* 124, 1581-8.
- Hermosilla, T., Munoz, D., Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Munoz, N., Nham, S. U., Schneider, P., Burridge, K., Quest, A. F. y Leyton, L. (2008). Direct Thy-1/ $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin interaction mediates neuron to astrocyte communication. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1111-20.
- Herrera-Molina, R., Frischknecht, R., Maldonado, H., Seidenbecher, C. I., Gundelfinger, E. D., Hetz, C., Aylwin Mde, L., Schneider, P., Quest, A. F. y Leyton, L. (2012). Astrocytic  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin inhibits neurite outgrowth and promotes retraction of neuronal processes by clustering Thy-1. *PLoS One* 7, e34295.
- Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Kong, M., Alvarez, A., Cardenas, A., Quest, A. F. y Leyton, L. (2013). Thy-1-interacting molecules and cellular signaling in cis and trans. *Int Rev Cell Mol Biol* 305, 163-216.
- Hou, C. H., Yang, R. S., Hou, S. M. y Tang, C. H. (2011). TNF- $\alpha$  increases  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin expression and migration in human chondrosarcoma cells. *J Cell Physiol* 226, 792-9.
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D. C. y Scemes, E. (2009). Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels". *J Neurosci* 29, 7092-7.
- Jacques-Silva, M. C., Rodnight, R., Lenz, G., Liao, Z., Kong, Q., Tran, M., Kang, Y., Gonzalez, F. A., Weisman, G. A. y Neary, J. T. (2004). P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br J Pharmacol* 141, 1106-17.
- Jelassi, B., Anghelin, M., Chamouton, J., Cayuela, M. L., Clarysse, L., Li, J., Gore, J., Jiang, L. H. y Roger, S. (2013). Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors. *Carcinogenesis* 34, 1487-96.
- Jing, R., Wilhelmsson, U., Goodwill, W., Li, L., Pan, Y., Pekny, M. y Skalli, O. (2007). Synemin is expressed in reactive astrocytes in neurotrauma and interacts differentially with vimentin and GFAP intermediate filament networks. *J Cell Sci* 120, 1267-77.
- Kameritsch, P., Pogoda, K. y Pohl, U. (2012). Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochim Biophys Acta* 1818, 1993-2001.
- Kawamura, H., Kawamura, T., Kanda, Y., Kobayashi, T. y Abo, T. (2012). Extracellular ATP-stimulated macrophages produce

- macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration. *Immunology* 136, 448-58.
- Kim, M., Jiang, L. H., Wilson, H. L., North, R. A. y Surprenant, A. (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* 20, 6347-58.
- Kim, M. O., Lee, Y. J. y Han, H. J. (2010). Involvement of Cx43 phosphorylation in 5'-N-ethylcarboxamide-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 224, 187-94.
- Kong, M., Munoz, N., Valdivia, A., Alvarez, A., Herrera-Molina, R., Cardenas, A., Schneider, P., Burridge, K., Quest, A. F. y Leyton, L. (2013). Thy-1-mediated cell-cell contact induces astrocyte migration through the engagement of alphaVbeta3 integrin and syndecan-4. *Biochim Biophys Acta* 1833, 1409-20.
- Kumagai, S., Matsui, K., Kawaguchi, H., Yamashita, T., Mohri, T., Fujio, Y. y Nakayama, H. Cathelicidin antimicrobial peptide inhibits fibroblast migration via P2X7 receptor signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 437, 609-14.
- Leyton, L., Schneider, P., Labra, C. V., Ruegg, C., Hetz, C. A., Quest, A. F. y Bron, C. (2001). Thy-1 binds to integrin beta(3) on astrocytes and triggers formation of focal contact sites. *Curr Biol* 11, 1028-38.
- Liao, Z., Seye, C. I., Weisman, G. A. y Erb, L. (2007). The P2Y2 nucleotide receptor requires interaction with alpha v integrins to access and activate G12. *J Cell Sci* 120, 1654-62.
- Liu, X., Sun, L., Torii, M. y Rakic, P. (2012). Connexin 43 controls the multipolar phase of neuronal migration to the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8280-5.
- Mahanthappa, N. K. y Patterson, P. H. (1992). Thy-1 involvement in neurite outgrowth: perturbation by antibodies, phospholipase C, and mutation. *Dev Biol* 150, 47-59.
- Mankus, C., Rich, C., Minns, M. y Trinkaus-Randall, V. (2011). Corneal epithelium expresses a variant of P2X(7) receptor in health and disease. *PLoS One* 6, e28541.
- Marcillo, A., Frydel, B., Bramlett, H. M. y Dietrich, W. D. A reassessment of P2X7 receptor inhibition as a neuroprotective strategy in rat models of contusion injury. *Exp Neurol* 233, 687-92.
- Mayo, C., Ren, R., Rich, C., Stepp, M. A. y Trinkaus-Randall, V. (2008). Regulation by P2X7: epithelial migration and stromal organization in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 4384-91.
- Mendoza-Naranjo, A., Cormie, P., Serrano, A. E., Wang, C. M., Thrasivoulou, C., Sutcliffe, J. E., Gilmartin, D. J., Tsui, J., Serena, T. E., Phillips, A. R. et al. (2012). Overexpression of the gap junction protein Cx43 as found in diabetic foot ulcers can retard fibroblast migration. *Cell Biol Int* 36, 661-7.
- Milner, R. (2009). Microglial expression of alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins is regulated by cytokines and the extracellular matrix: beta5

- integrin null microglia show no defects in adhesion or MMP-9 expression on vitronectin. *Glia* 57, 714-23.
- Miranti, C. K. y Brugge, J. S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4, E83-90.
- Morgan, M. R., Hamidi, H., Bass, M. D., Warwood, S., Ballestrem, C. y Humphries, M. J. (2013). Syndecan-4 phosphorylation is a control point for integrin recycling. *Dev Cell* 24, 472-85.
- Morris, R. J., Tiveron, M. C. y Xue, G. P. (1992). The relation of the expression and function of the neuronal glycoprotein Thy-1 to axonal growth. *Biochem Soc Trans* 20, 401-5.
- Myhre, O. y Fonnum, F. (2001). The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria, and phospholipase A. *Biochem Pharmacol* 62, 119-28.
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82, 1013-67.
- Olk, S., Turchinovich, A., Grzendowski, M., Stuhler, K., Meyer, H. E., Zoidl, G. y Dermietzel, R. (2010). Proteomic analysis of astroglial connexin43 silencing uncovers a cytoskeletal platform involved in process formation and migration. *Glia* 58, 494-505.
- Orellana, J. A., Martinez, A. D. y Retamal, M. A. (2013). Gap junction channels and hemichannels in the CNS: Regulation by signaling molecules. *Neuropharmacology* 75, 567-82.
- Pangrsic, T., Potokar, M., Stenovec, M., Kreft, M., Fabbretti, E., Nistri, A., Pryazhnikov, E., Khiroug, L., Giniatullin, R. y Zorec, R. (2007). Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J Biol Chem* 282, 28749-58.
- Parpura, V. y Zorec, R. (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 63, 83-92.
- Pelegri, P. y Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25, 5071-82.
- Peng, W., Cotrina, M. L., Han, X., Yu, H., Bekar, L., Blum, L., Takano, T., Tian, G. F., Goldman, S. A. y Nedergaard, M. (2009). Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12489-93.
- Penuela, S., Gehi, R. y Laird, D. W. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta* 1828, 15-22.
- Pfeiffer, Z. A., Aga, M., Prabhu, U., Watters, J. J., Hall, D. J. y Bertics, P. J. (2004). The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *J Leukoc Biol* 75, 1173-82.

- Pinkstaff, J. K., Detterich, J., Lynch, G. y Gall, C. (1999). Integrin subunit gene expression is regionally differentiated in adult brain. *J Neurosci* 19, 1541-56.
- Quarles, R. H. (2009). A hypothesis about the relationship of myelin-associated glycoprotein's function in myelinated axons to its capacity to inhibit neurite outgrowth. *Neurochem Res* 34, 79-86.
- Raftopoulou, M. y Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32.
- Raymond, M. N. y Le Stunff, H. (2006). Involvement of de novo ceramide biosynthesis in macrophage death induced by activation of ATP-sensitive P2X7 receptor. *FEBS Lett* 580, 131-6.
- Razmara, M., Heldin, C. H. y Lennartsson, J. (2013). Platelet-derived growth factor-induced Akt phosphorylation requires mTOR/Rictor and phospholipase C-gamma1, whereas S6 phosphorylation depends on mTOR/Raptor and phospholipase D. *Cell Commun Signal* 11, 3.
- Ren, S., Zhang, Y., Wang, Y., Lui, Y., Wei, W., Huang, X., Mao, W. y Zuo, Y. (2010). Targeting P2X(7) receptor inhibits the metastasis of murine P388D1 lymphoid neoplasm cells to lymph nodes. *Cell Biol Int* 34, 1205-11.
- Renault-Mihara, F., Katoh, H., Ikegami, T., Iwanami, A., Mukaino, M., Yasuda, A., Nori, S., Mabuchi, Y., Tada, H., Shibata, S. et al. Beneficial compaction of spinal cord lesion by migrating astrocytes through glycogen synthase kinase-3 inhibition. *EMBO Mol Med* 3, 682-96.
- Riquelme, D., Alvarez, A., Leal, N., Adasme, T., Espinoza, I., Valdes, J. A., Troncoso, N., Hartel, S., Hidalgo, J., Hidalgo, C. et al. (2011). High-frequency field stimulation of primary neurons enhances ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release and generates hydrogen peroxide, which jointly stimulate NF-kappaB activity. *Antioxid Redox Signal* 14, 1245-59.
- Roscoe, W. A., Messersmith, E., Meyer-Franke, A., Wipke, B. y Karlik, S. J. (2007). Connexin 43 gap junction proteins are up-regulated in remyelinating spinal cord. *J Neurosci Res* 85, 945-53.
- Ryu, J. K., Jantarantotai, N., Serrano-Perez, M. C., McGeer, P. L. y McLarnon, J. G. (2011). Block of purinergic P2X7R inhibits tumor growth in a C6 glioma brain tumor animal model. *J Neuropathol Exp Neurol* 70, 13-22.
- Saalbach, A., Hausteil, U. F. y Anderegg, U. (2000). A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 115, 882-8.
- Sakisaka, T. y Takai, Y. (2005). Cell adhesion molecules in the CNS. *J Cell Sci* 118, 5407-10.
- Silverman, W. R., de Rivero Vaccari, J. P., Locovei, S., Qiu, F., Carlsson, S. K., Scemes, E., Keane, R. W. y Dahl, G. (2009). The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem* 284, 18143-51.

- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32, 638-47.
- Sofroniew, M. V. y Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7-35.
- Sperlagh, B., Vizi, E. S., Wirkner, K. y Illes, P. (2006). P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol* 78, 327-46.
- Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C. y Charles, A. C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277, 10482-8.
- Suadicani, S. O., Brosnan, C. F. y Scemes, E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Neurosci* 26, 1378-85.
- Suplat-Wypych, D., Dygas, A. y Baranska, J. 2', 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP-mediated calcium signaling in rat glioma C6 cells: role of the P2Y(2) nucleotide receptor. *Purinergic Signal* 6, 317-25.
- Takenouchi, T., Sekiyama, K., Sekigawa, A., Fujita, M., Waragai, M., Sugama, S., Iwamaru, Y., Kitani, H. y Hashimoto, M. (2010). P2X7 receptor signaling pathway as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58, 91-6.
- Tanabe, S., Kreutz, B., Suzuki, N. y Kozasa, T. (2004). Regulation of RGS-RhoGEFs by Galpha12 and Galpha13 proteins. *Methods Enzymol* 390, 285-94.
- Theodoric, N., Bechberger, J. F., Naus, C. C. y Sin, W. C. (2012). Role of gap junction protein connexin43 in astrogliosis induced by brain injury. *PLoS One* 7, e47311.
- Thompson, R. J. y Macvicar, B. A. (2008). Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels (Austin)* 2, 81-6.
- Tiveron, M. C., Barboni, E., Pliego Rivero, F. B., Gormley, A. M., Seeley, P. J., Grosveld, F. y Morris, R. (1992). Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein. *Nature* 355, 745-8.
- Wanner, I. B., Anderson, M. A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y. y Sofroniew, M. V. (2013). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J Neurosci* 33, 12870-86.
- Wei, C. C., Motl, N., Levek, K., Chen, L. Q., Yang, Y. P., Johnson, T., Hamilton, L. y Stuehr, D. J. (2010). Conformational States and kinetics of the calcium binding domain of NADPH oxidase 5. *Open Biochem J* 4, 59-67.
- Wei, W., Ryu, J. K., Choi, H. B. y McLarnon, J. G. (2008). Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 glioma cells. *Cancer Lett* 260, 79-87.
- Wiese, S., Karus, M. y Faissner, A. (2012). Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Front Pharmacol* 3, 120.

- Xie, F. y Zheng, B. (2008). White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Exp Neurol* 209, 302-12.
- Xu, X., Francis, R., Wei, C. J., Linask, K. L. y Lo, C. W. (2006). Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. *Development* 133, 3629-39.
- Yu, T., Junger, W. G., Yuan, C., Jin, A., Zhao, Y., Zheng, X., Zeng, Y. y Liu, J. (2010). Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C457-64.
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G. y Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 32, 6391-410.
- 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, 2281-91.
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X. S. y Duan, S. (2007). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* 9, 945-53.
- Zhao, J. W., Raha-Chowdhury, R., Fawcett, J. W. y Watts, C. (2009). Astrocytes and oligodendrocytes can be generated from NG2+ progenitors after acute brain injury: intracellular localization of oligodendrocyte transcription factor 2 is associated with their fate choice. *Eur J Neurosci* 29, 1853-69.
- Zucker, S. N., Bancroft, T. A., Place, D. E., Des Soye, B., Bagati, A. y Berezney, R. (2013). A dominant negative Cx43 mutant differentially affects tumorigenic and invasive properties in human metastatic melanoma cells. *J Cell Physiol* 228, 853-9.