Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Escuela de Tecnología Médica

COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN E INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PANEXINA 1 EN EL CEREBRO DE RATONES C57BL/6 ENTRE LAS ETAPAS JOVEN Y ADULTO DEL DESARROLLO.

Autor:
Nicolás Rivera Silva
18.585.170-2
974771428
nicolas-r-s@hotmail.cl

Profesor guía:
Álvaro Ardiles Araya
Bioquímico
Dr. en Neurociencia
+56 322507354
Profesor Adjunto, Universidad de Valparaíso
alvaro.ardiles@uv.cl

Profesora Co-guía:
Daniela López Espíndola
Tecnólogo Médico
Dra. en Biociencias Moleculares
+56 322603857
Profesor Auxiliar, Universidad de Valparaíso
daniela.lopez@uv.cl

ÍNDICE

1. RESUMEN 4

2. PALABRAS CLAVE 5

3. LISTA DE ACRÓNIMOS 5

4. INTRODUCCIÓN 7

5. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 16

5.1. Pregunta de investigación 16

5.2. Hipótesis 16

6. OBJETIVOS 17

6.1. Objetivo general 17

6.2. Objetivos específicos 17

7. METODOLOGÍA 18

7.1. Tipo de investigación 18

7.2. Población de estudio 18

7.3. Muestra 18

7.6. Criterios de inclusión y exclusión 19

7.7. Fuentes y métodos de recolección de datos 20

7.8. Variables 20

FIGURA 5: esquema resumen de la metodología a utilizada durante el proyecto. 22

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS 22

8.1. No maleficencia 23

8.2. Beneficencia 24

9. MATERIALES Y MÉTODOS 25

9.1. Animales 25

9.2. Recolección de muestra 25

9.2.1. Eutanasia y perfusión de los animales 25

9.2.2. Obtención del cerebro 26

9.3. Procesamiento de la muestra 26

9.3.1. Proceso de corte 26

9.3.2. Obtención del taco de parafina 27

9.4. Cortes para análisis 27

9.5. Técnica de hematoxilina-eosina 27

9.6. Técnica de Inmunohistoquímica 28

9.7. Plan de Análisis 29

9.7.1. Análisis de la presencia de Panx1 29

9.7.2. Procedimiento de captura fotográfica y análisis de imágenes. 30

9.7.3. Análisis Estadístico 33

10. RESULTADOS 34

10.1. Análisis inmunohistoquímico de Panx1 en el cerebro 34

10.1.1. Localización de Panx1 en la CR 34

10.2. Índice de densidad superficial de Panx1 en la CR e hipocampo 38

10.3. Densidad óptica de Panx1 en la CR e hipocampo 40

10.4. Índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1 en la CR e hipocampo 41

10.5. Densidad integrada de Panx1 en la CR e hipocampo 42

10.6. Comparación de la cantidad de inmunomarcaje de Panx1 43

10.7. Comparación de la intensidad del inmunomarcaje de Panx1 47

11. DISCUSION 48

11.1. Efecto del envejecimiento sobre la expresión de Panx1 en CR 48

11.2. Efecto del envejecimiento sobre la expresión de Panx1 en el hipocampo 49

12. CONCLUSIÓN 52

13. FACTIBILIDAD. 53

14. BIBLIOGRAFÍA 54

15. ANEXOS 65

1. RESUMEN

ANTECEDENTES: Existe evidencia que indica que la proteína Panexina 1 (Panx1) modifica su expresión en el cerebro murino durante momentos puntuales del desarrollo. Más aún, estudios recientes en cerebros de roedores indican que tanto la ausencia como la sobreexpresión de Panx1 llevan a alteraciones en la función y estructura neuronal, por ello cambios en su nivel de expresión serian relevantes para el correcto funcionamiento cerebral. Sin embargo, no existe claridad en cuanto a su expresión a lo largo de toda la vida del animal.

OBJETIVOS: comparar la distribución e intensidad de la expresión de Panx1 en los cerebros de ratones silvestres C57bl/6, entre las etapas del desarrollo joven y adulto.

MATERIALES Y MÉTODOS: En el presente estudio se analizaron cortes de cerebros de ratón, previamente procesados para procedimiento histológico, provenientes de hembras y machos de la cepa C57bl/6 jóvenes (2 y 3 meses de edad) y adultos (10 y 12 meses de edad). La localización célula-específica como la distribución sub-celular (membrana celular, citoplasma y núcleo) de Panx1 fue estudiada en diferentes regiones cerebrales que incluyeron la corteza retroesplenial (CR), diferentes regiones del hipocampo CA1, CA3 y giro dentado (GD) mediante la técnica de inmunohistoquímica y posterior visualización por microscopía de campo claro.

RESULTADOS: Encontramos que Panx1 se expresa tanto en la CR como en el hipocampo de animales jóvenes y adultos. Interesantemente, su expresión fue significativamente mayor en la CR del grupo adulto comparado al grupo joven, mientras que en el hipocampo no se observaron diferencias entre los dos grupos etarios.

DISCUSIÓN: es necesario continuar profundizando en el estudio de la expresión de Panx1 en cerebro de ratón, utilizando mayor cantidad de animales y el agregar un grupo etario de mayor edad con el propósito de determinar si se mantiene este aumento de la expresión de Panx1 en el tiempo, además de evaluar otras áreas cerebrales.

CONCLUSIÓN: Existe un aumento en el patrón de distribución de la expresión de Panx1 en el cerebro de ratones silvestres C57bl/6 del grupo adulto. Principalmente en la porción CR del cerebro.

2. PALABRAS CLAVE

Panexina 1, grupo etario, cerebro, ratón, localización regional, distribución celular, distribución compartimiento celular, corteza retroesplenial, CA1, CA3, giro dentado

3. LISTA DE ACRÓNIMOS

ATP: Adenosín Trifosfato

Ca^{2+}: Ion calcio

CICUAL: Comité de cuidado y uso de animales de laboratorio

CR: Corteza retroesplenial.

Cxs: Conexinas

DAB: Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate

EA: Enfermedad del Alzheimer.

FAWC: Farm Animal Welfare Committee

GD: Giro dentado

IHC: Inmunohistoquímica

Ixs: Inexinas

LTP: Potenciación a largo plazo

LTD: Depresión a largo plazo

P2X: Familia de receptores purinérgicos P2x ligados al ATP

P2Y: Familia de receptores purinérgicos P2y ligados al ATP

Panx1: Panexina 1

Panxs: Panexinas

PFA: Paraformaldehído

ROI: Región de interés

SI: Solución de incubación

SNC: Sistema nervioso central

UH: Unión en hendidura

WT: Ratones de carácter wild type

4. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es la única condición natural capaz de afectar a todos los organismos vivos pertenecientes a una misma especie. Se caracteriza por un declive progresivo en los factores asociados con la condición física de un organismo, sumado a un detrimento de los factores encargados de recuperar la homeostasis del mismo.

En el cerebro el envejecimiento tiende a manifestarse como una disminución de las capacidades cognitivas, en particular en aquellas regiones involucradas en el procesamiento y almacenamiento de la información a causa de una atrofia progresiva. Generalmente las consecuencias asociadas a estas modificaciones se manifiestan con un aumento en el riesgo de padecer diferentes patologías que afectan al sistema nervioso central, entre ellas la demencia y síndromes neurodegenerativos y neuropsiquiátricos. Al ser el envejecimiento natural un factor de riesgo para diferentes patologías, las proteínas involucradas en la patogenia de estas diversas condiciones adquieren relevancia a la hora de estudiar el envejecimiento.

Recientemente, la Panx1, una proteína de membrana que forma canales implicados en la comunicación celular y la señalización intracelular, ha destacado en este ámbito de investigación (1). Esta proteína juega un rol regulador en distintos procesos fisiológicos, como la plasticidad sináptica, la neurogénesis, y el tono vascular, todos procesos que de algún modo se ven modificados durante el envejecimiento natural (FIGURA 1).

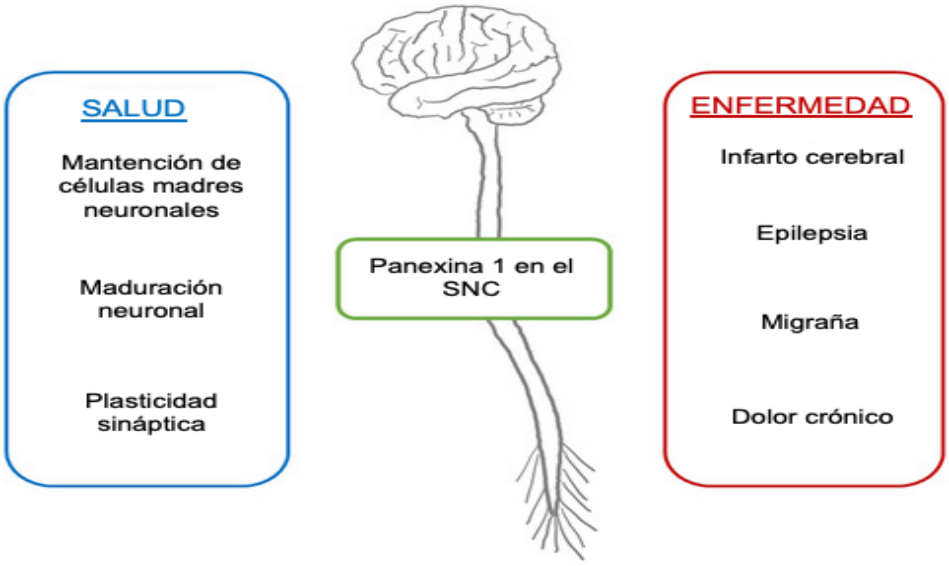


FIGURA 1: Esquema representativo de la participación de los canales de Panx1 en el sistema nervioso central. Los canales de Panx1 cumplen una función fisiológica en la regulación de la supervivencia de las células madre neural, la maduración neuronal y la plasticidad sináptica, con posible relevancia para el funcionamiento cognitivo normal. Además, un creciente cuerpo de evidencias avala la contribución de la actividad de Panx1 en diversos procesos patológicos, incluyendo convulsiones, derrames cerebrales, migraña y dolor crónico (Modificado de Yeung et al., 2020)(1).

PANEXINAS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Las Panexinas (Panxs) son una familia de proteínas formadoras de canales no selectivos, constituida por tres miembros: Panx1, Panx2 y Panx3 (2). En relación a su expresión, las Panxs han sido identificadas en varias especies (3), incluyendo el humano y el ratón, quienes presentan una alta homología entre sus secuencias (4) siendo localizadas y expresadas diferencialmente. Panx1 y Panx2 son particularmente expresadas en distintas regiones del sistema nervioso central (SNC) (5). Se ha reportado que Panx1 y Panx2 son expresadas en la mayoría de las neuronas piramidales del SNC y en algunas interneuronas GABAérgicas (6), pero en particular, Panx1 ha sido identificada en los terminales dendríticos de las neuronas piramidales del hipocampo y la corteza cerebral (7). Además, Panx1 también es expresada por otros tipos celulares no neuronales como astrocitos, microglia, oligodendrocitos y células ependimarias (8)(9).

No obstante, a nivel subcelular, Panx1 se distribuye preferencialmente en la membrana plasmática mientras que Panx2 demuestra una distribución predominante en la membrana reticular(10)(11).

En términos de estructura, las Panxs presentan 4 dominios de transmembrana, 2 asas extracelulares y una intracelular, y sus extremos carboxi y amino expuestos hacia el lado citoplasmático (11) (FIGURA 2A). Esta misma topología se observa en las Conexinas e Inexinas (11), dos familias de proteínas involucradas en la comunicación intercelular mediante la formación de uniones en hendidura (UHs) en vertebrados e invertebrados respectivamente (11). Sin embargo, a diferencia de estas, las Panxs comparten una baja homología en su secuencia aminoacídica, forman heptámeros (12–15) y además, presentan residuos glicosilados en sus asas extracelulares, lo que les confiere un impedimento para la formación de canales de UHs (16)(17).

Dentro de los miembros de las Panxs, los canales de Panx1 han concitado gran interés por su capacidad de formar canales no selectivos en la membrana plasmática mediando la comunicación directa entre el citoplasma y el medio extracelular (2,3,5,17–20). Por ejemplo, los canales de Panx1 pueden liberar Adenosín trifosfato (ATP) y otras moléculas de señalización al medio extracelular (21–23) tales como uridín trifosfato (UTP), uridín difosfato (UDP), D-serina y ion calcio (Ca^{2+})(17).

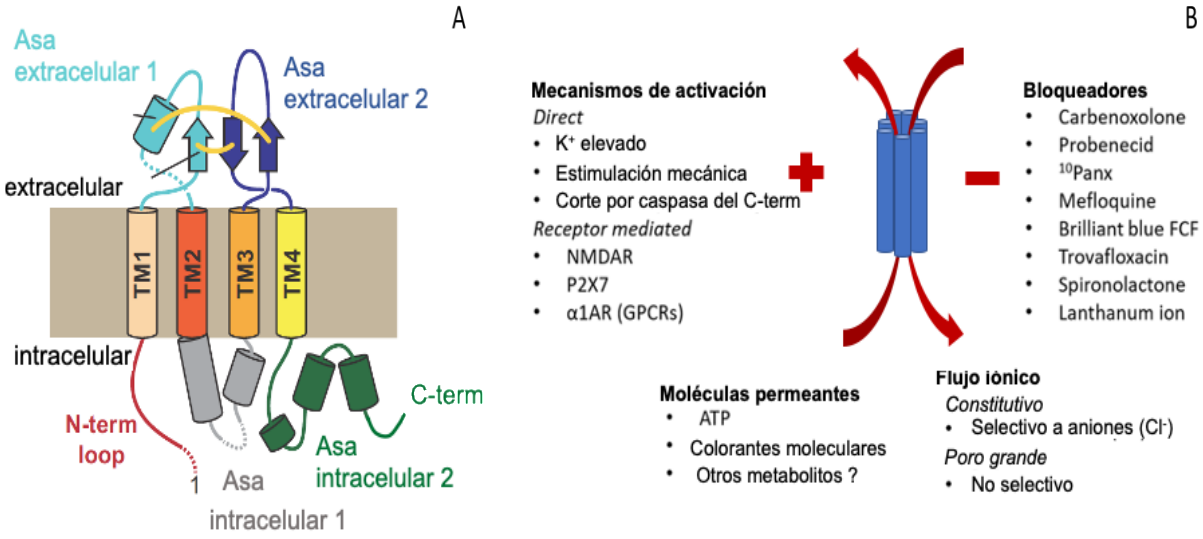


FIGURA 2: Esquema representativo de la estructura y propiedades de los canales de Panx1. Los canales de A) Panx1 presentan 4 dominios transmembrana (TM1-TM4), dos asas extracelulares, dos asas intracelulares y sus dominios amino (N-term) y carboxi (C-term) terminales hacia el lado intracelular (modificado de Michalski et al., 2020)(15). B) El canal de Panx1 funcional consiste en 7 subunidades que se ensamblan formando un poro central en la membrana plasmática. A través de ellos pueden pasar ATP, colorantes moleculares y aniones como el Cloro. Se indican diversos mecanismos de activación y bloqueadores. (Modificado de Yeung et al., 2020) (1).

Diferentes factores han demostrado la capacidad de modular la actividad de estos canales, estos van desde la estimulación mecánica (21) clivaje por caspasas (24), calcio (Ca^{2+}) citoplasmático (25) y despolarización de la membrana mediada por elevación de K^+ extracelular (26) hasta el propio ATP extracelular(27–29) (FIGURA 2B).

Por otro lado, se han identificado algunos elementos capaces de forzar el cierre de estos canales, como por ejemplo la acidificación citoplasmática mediada por CO_2 (25), una retroalimentación negativa a partir de la liberación de ATP (30), péptidos miméticos (31) y bloqueadores de canales como la carbenoxolona, el probenecid y el ácido flufenámico (32)(33) (FIGURA 2B). El hecho que el ATP permita regular tanto su salida como su entrada, a través de los canales Panx1, involucrando también la participación de los receptores purinérgicos (25), han permitido determinar que la acción de este canal para liberar ATP resulta en un mecanismo de "liberación de ATP regulado por ATP" (34)(35), lo cual, le da a la Panx1 un rol importante durante la señalización purinérgica, debido a su interacción con los receptores purinérgicos P2X y P2Y (27)(25). Esto nos permite señalar que la Panx1 se encuentra de alguna manera involucrada en un número importante de funciones fisiológicas y patológicas donde la señalización purinérgica es relevante, entre las cuales destacan el control de la

plasticidad sináptica, la neurogénesis, y la regulación del tono vascular, factores que han presentado evidencia de estar relacionados con procesos fisiopatológicos exacerbados durante el envejecimiento como lo son la demencia y las enfermedades neurodegenerativas (8,23,36–47).

PANX1 UBICACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Se ha determinado que la proteína Panx1 posee una fuerte expresión en distintas estructuras cerebrales, entre ellas la corteza y el hipocampo (5,6)(9), principalmente en los distintos grupos neuronales que los constituyen(5)(9).

CORTEZA

De las distintas estructuras estudiadas para su presencia, la corteza cerebral presenta una alta expresión de Panx1 (5,6,48) y al mismo tiempo se ha descrito como altamente susceptible a las diferentes alteraciones provocadas por la edad (49)(50). Esto en combinación con los resultados descritos en la literatura en relación a los cambios ocurridos con la actividad de Panx1 en relación al desarrollo en el cerebro (6,48,51), lo vuelven una estructura de alto interés para nuestra investigación.

Morfológicamente la corteza cerebral es una compleja estructura organizada en capas con una desconcertante variedad de neuronas, y un importante número de conexiones tanto locales como externas. Las variaciones citoarquitectónicas presentes en la corteza, subdividen a la misma en distintas regiones o áreas cerebrales con características y funciones específicas (52), Por ejemplo la mayoría de los movimientos se encuentran asociados a las zonas motoras de la corteza (FIGURA 3).

Particularmente las áreas relacionadas con el estudio de la función y expresión de Panx1 han sido la regiones corticales adyacentes al hipocampo, debido a su conexión con procesos cognitivos (6,48,51). En efecto, dentro de las diferentes porciones de la corteza, la corteza retroesplenial (CR) (FIGURA 3), además de poseer conexiones importantes con el hipocampo (53), también se ha determinado que parte de sus funciones están relacionadas con la memoria a largo plazo, la cognición espacial y el aprendizaje (54)(55)(56), funciones que a su vez han sido asociadas a la actividad de los

canales de Panx1(48)(47,57). Sin embargo, a la fecha no se ha descrito la presencia de Panx1 en la CR.

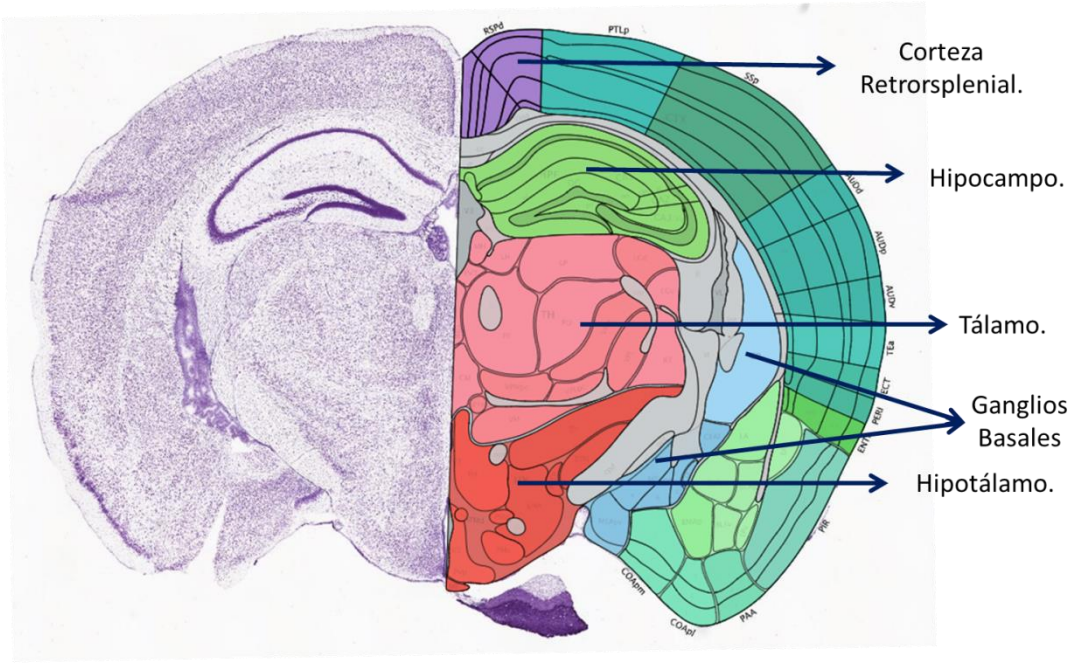


***FIGURA 3: Esquema representativo de la estructura y posición anatómica de las distintas estructuras que forman el cerebro de un ratón c57bl/6*:** Esquema general de las diferentes estructuras que conforman al cerebro de un ratón donde observamos a la corteza en diferentes tonos de verde representando distintas regiones corticales y la división de sus capas, al hipocampo debajo de esta con un color verde claro, el tálamo dividido en sus distintos núcleos con un color rosa, al hipotálamo con sus núcleos respectivos marcados con un tono rojizo, sumado a los ganglios basales con diferentes tonos de azul y los tractos fibrosos marcados con distintos tonos de gris. (modificado de http://mouse.brain-map.org/, 2020) (58). Principalmente destacamos la porción CR que se observa con un tono morado justo en la cisura interhemisférica.

HIPOCAMPO

Otra de las estructuras que presentan interés para esta línea de investigación es el hipocampo, ya que al mismo tiempo que es una de las estructuras con mayor tasa de expresión de Panx1 (5,6,9,48), también resulta ser de las más estudiadas en las diferentes investigaciones relacionadas tanto con la función como con la regulación de esta proteína (6,48,51).

El hipocampo es una estructura fundamental para funciones clave como son: la memoria, el aprendizaje y la neuroplasticidad (59). Esto último consiste en distintos mecanismos encargados de la regulación de la actividad neuronal frente a diferentes estímulos, pudiendo estos ser de carácter externo como también interno, con el objetivo

de mejorar la eficacia de distintos procesos neuronales, como son el desarrollo cerebral y el aprendizaje, a partir de la formación de nuevas redes neuronales (60)(61).

La anatomía del hipocampo consiste en 2 zonas principales: *Cornu ammonis* (CA1-CA3) y GD, cada una con sus propias capas neuronales y funciones. La porción CA1 se relaciona con procesos de asociación de patrones temporales y memoria a largo plazo, la región CA3 participa en la asociación de patrones espaciales, la memoria de corto plazo y también en la detección de sucesos y objetos, por último el GD se relaciona con el procesamiento de la información espacial. Cada porción del hipocampo se encuentra interconectada de una manera específica (62).

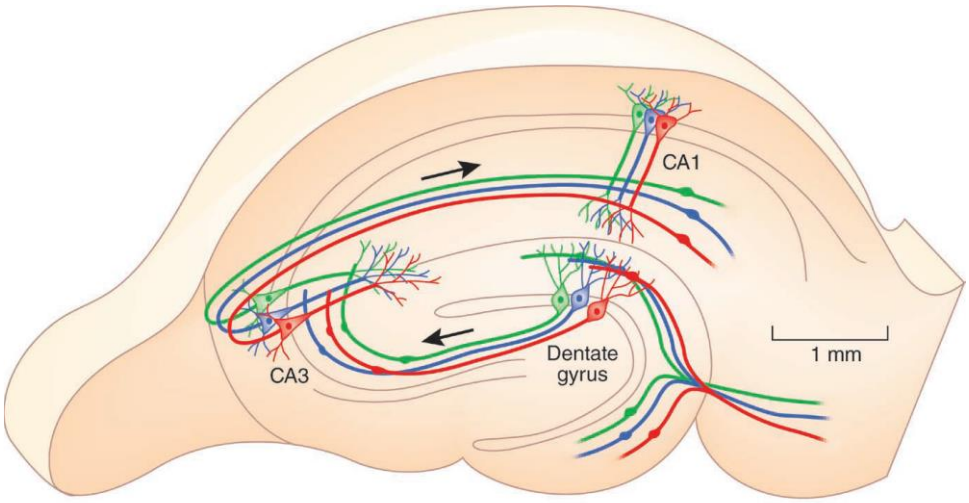


FIGURA 4: Esquema representativo de la estructura del hipocampo mostrando las vías de conexión entre las distintas subregiones. La información proveniente desde la corteza (entorrinal) ingresa por el GD, continúa hacia la región CA3 y desde allí hacia CA1 para finalmente volver a la corteza. (63).

La importancia que tiene para nosotros esta porción, se basa en la localización como también por el nivel de expresión de Panx1(5,35) en conjunto con su fragilidad frente al proceso de envejecimiento(6,9,48,51) siendo la porción CA1 la más sensible a los cambios ocurridos durante el desarrollo, a diferencia de la región CA3 y GD, los cuales presentan una mayor resistencia a los cambios producidos por la edad (59) .

ROL DE LOS CANALES DE PANX1 EN EL SNC

Diversas evidencias destacan un rol fisiológico y fisiopatológico de los canales de Panx1 en diversos procesos, tales como la propagación de ondas de Ca^{2+}, la regulación del tono muscular, apoptosis y la respuesta inmune (11). Sin embargo creciente

información relacionan su participación en procesos que ocurren en el SNC (17) (FIGURA 1). Por ejemplo, Panx1 ha sido asociada a la migración de precursores neuronales contribuyendo al proceso de neurogénesis en el cerebro de ratón (38). Más aún, se le ha atribuido una función reguladora negativa en la morfología y conectividad neuronal durante el desarrollo temprano. En este sentido, la ausencia de Panx1 o su bloqueo farmacológico induce un aumento en la formación de neuritas en precursores neuronales in vitro (39) y en la formación de espinas dendríticas en neuronas corticales de ratones en etapa embrionaria (64), ambos procesos dependientes del citoesqueleto de actina. Similarmente, en neuronas hipocampales de ratones adultos, la ausencia de Panx1 induce también cambios en la morfología dendrítica, observándose una mayor arborización y complejidad del árbol dendrítico y un mayor tamaño de las espinas dendríticas (65), estructuras especializadas que constituyen el principal lugar para la formación de sinapsis excitadora en el SNC (66).

Se ha descrito un rol estabilizador de los canales de Panx1 en la plasticidad sináptica de animales adultos. La plasticidad sináptica se refiere a una serie de modificaciones en los circuitos neuronales como respuesta a determinadas circunstancias tales como el desarrollo, la experiencia o incluso condiciones patológicas, lo que se traduce en un aumento o disminución de la actividad neuronal (61). Esta capacidad de cambio en las sinapsis, las conexiones entre las neuronas, implica tanto cambios estructurales como funcionales que se manifiestan como modificaciones en la eficacia de la transmisión sináptica, proceso por el cual los neurotransmisores contenidos en vesículas de la neurona presinaptica, son liberados desde el terminal presináptico hacia el espacio sináptico donde difunden y alcanzan sus receptores en la membrana postsináptica generando la transmisión de la información (61). Estos mecanismos han sido descritos en distintas regiones del SNC de mamíferos, tales como el hipocampo, la corteza cerebral, el cerebelo, entre otras (12). En este sentido, se ha reportado que la ausencia o el bloqueo farmacológico de Panx1 aumenta la transmisión sináptica excitadora y facilita la inducción de la potenciación de largo plazo (LTP) en animales de 3 meses de edad (47) y 9-12 meses de edad (48), mientras que reduce la inducción de la depresión de largo plazo (LTD) (48), dos formas de plasticidad sináptica propuestas como los modelos celulares de la memoria y el aprendizaje (67). Más aún la ausencia de Panx1 ha sido asociada con ansiedad y una disminución en la memoria de reconocimiento de objetos en animales de 3 meses (47) y a una alteración en la flexibilidad cognitiva y en

el re-aprendizaje espacial (57) en animales adultos de 9 a 12 meses de edad. Sin embargo, ninguno de estos cambios fueron observados en animales juveniles (48), por lo que estos antecedentes avalan un rol modulador de los canales de Panx1 en la plasticidad y aprendizaje hipocampal en animales adultos.

Junto con su función fisiológica, diversos estudios implican una función patológica de los canales de Panx1 en diversas condiciones que afectan al SNC (68)(69) (FIGURA 1). Por ejemplo, una aumentada actividad Panx1 ha sido involucrada con una desregulación de la actividad neuronal en condiciones de isquemia y daño cerebrovascular, lo que desencadena una serie de eventos que llevan a la muerte neuronal (40,70–72). También, una sobreactividad de Panx1 ha sido asociada a epilepsia (73)(74), esquizofrenia, encefalomielitis autoinmune (75), encefalopatía inducida por sepsis y esclerosis múltiple (76). En la mayoría de estos casos Panx1 ejerce un efecto pro-inflamatorio, el cual puede ser prevenido por el bloqueo farmacológico o la ablación de los canales Panx1 (70,75–80).

Antecedentes de nuestro laboratorio indican que en el tejido cerebral de un modelo de la enfermedad del Alzheimer (EA), enfermedad neurodegenerativa que aparece durante la adultez mayor y corresponde a la principal causa de demencia en la vejez, existe un aumento en la expresión y actividad de estos canales durante el envejecimiento, los cuales se asocian con el deterioro de la estructura y función sináptica y pueden ser mitigados por el bloqueo farmacológico de Panx1 (65). Consistente con ello, estudios previos indican que Panx1 juega un papel relevante en la muerte neuronal inducida por el péptido β-A, sugiriendo la participación de Panx1 en la EA (81,82). Estos antecedentes contrastan con la reportada disminución fisiológica en la expresión de Panx1 durante la adultez en el ratón silvestre (6,48), lo que sugiere que una desregulación en el patrón de expresión de esta proteína se podría asociar a esta condición neurodegenerativa. Sin embargo, existe evidencia contradictoria en cuanto a los niveles de Panx1 durante la edad adulta y envejecimiento. Algunos autores aseguran que la proteína Panx1 aumenta sus niveles con la edad (51), mientras que otros señalan que disminuye (6)(48), por lo que se desconoce si los niveles de Panx1 cambian a lo largo de la vida del animal. Por tanto, es claro que cambios en los niveles de expresión de Panx1, ya sea en condiciones de ausencia como en situaciones de su sobreexpresión, determinan una serie de alteraciones en los circuitos neuronales que llevan a una pérdida de su rol modulador sobre la actividad neuronal. Sin embargo, no es claro si es

existe una regulación diferencial de Panx1 al largo de la vida del ratón y en particular durante el envejecimiento normal.

5. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

5.1. Pregunta de investigación

¿Existen cambios en el patrón de distribución e intensidad de expresión de la proteína Panx1 entre los cerebros de ratones silvestres C57bl/6 jóvenes y adultos?

5.2. Hipótesis

El patrón de distribución e intensidad de la expresión de Panx1 varía entre los cerebros de ratones silvestres C57bl/6 jóvenes y adultos. Al mismo tiempo el patrón de distribución e intensidad sería diferente dependiendo de la región cerebral.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Comparar la distribución e intensidad de expresión de la proteína Panx1 en el cerebro de ratones silvestres C57bl/6, entre las etapas joven y adulto del desarrollo.

6.2. Objetivos específicos

1. Describir la localización regional (CR, CA1, CA3 y GD), celular y compartimiento celular de Panx1 entre los cortes histológicos del cerebro de ratones silvestres C57bl/6 jóvenes y adultos.

2. Describir el índice de densidad superficial de la señal en la expresión de la proteína Panx1 en el cerebro de ratones silvestres C57bl/6 jóvenes y adultos.

3. Describir la densidad óptica de la señal en la expresión de la proteína Panx1 en el cerebro de ratones silvestres C57bl/6 jóvenes y adultos.

4. Describir el índice de células positivas en un área determinada, de la proteína Panx1 en el cerebro de ratones silvestres C57bl/6 jóvenes y adultos.

5. Describir la densidad integrada de la señal en la expresión de la proteína Panx1 en el cerebro de ratones silvestres C57bl/6 jóvenes y adultos.

6. Comparar la cantidad (índice de densidad superficial, índice de células positivas, densidad integrada) de la señal de Panx1 entre los cerebros de ratones silvestres C57bl/6 jóvenes y adultos.

7. Comparar la intensidad (densidad óptica) de la señal de Panx1 entre los cerebros de ratones silvestres C57bl/6 jóvenes y adultos.

7. METODOLOGÍA

7.1. Tipo de investigación

Se trata de una investigación de carácter observacional analítica.

Posee un carácter observacional debido a que en ella se buscara describir lo sucedido en un proceso en el cual no efectuamos ningún tipo de influencia.

El carácter analítico proviene al establecer una comparación entre diferentes grupos de estudio.

7.2. Población de estudio

La población de estudio corresponde a ratones silvestres C57bl/6 o WT entre 2 meses, 3 meses, 10 meses y 12 meses de edad.

7.3. Muestra

La muestra de estudio corresponde a 10 ratones silvestres C57bl/6 o WT separados según su etapa de desarrollo, siendo estos definidos como jóvenes cuando poseen entre 2 meses y 3 meses de edad y como adultos con 10 meses y 12 meses de edad, la muestra se divide en 5 animales por grupo. Los animales fueron obtenidos del Bioterio de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso. (Anexo 1).

7.4. Muestreo

La obtención de la muestra fue realizada mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia, puesto a que los ratones fueron seleccionados porque presentaban características adecuadas para las observaciones posteriores.

7.5. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra (número mínimo de animales necesarios para nuestra investigación) se determinó utilizando la aproximación planteada por Dell et al., 2002 (83) en donde a partir de un experimento piloto para estimar la desviación estándar (s) y la diferencia entre las medias de una variable continua evaluada entre dos grupos experimentales (d), sumado al nivel de significancia deseado (α) y el poder del

experimento o la probabilidad de que el efecto en la variable sea detectada (β), el tamaño muestral (*n*) estará definido por la siguiente ecuación:

$$n = 1 + 2C\left(\frac{s}{d}\right)^2,$$

Donde C corresponde a una constante que depende de α y β definida en la siguiente tabla.

	α	0.05	0.01
$1-\beta$	0.8	7.85	11.68
	0.9	10.51	14.88.

Reemplazando con los datos obtenidos en experimentos previos:

n=1+2*10.51*(264.6/545.8)^2

n= (1+2*10.51*0.19)*(2= número de grupos a utilizar)

n=10.30

≈(n=10) animales en total

7.6. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

- Ratones WT de 2 meses, 3 meses, 10 meses y 12 meses de edad
- Cortes coronales de cerebro de ratón de 7µm de grosor comparables entre sí.

Criterios de exclusión

- Ratones con algún signo de daño físico
- Cerebros de ratón que presenten un procesamiento visiblemente inadecuado (mala fijación o inclusión)
- Artefactos en los cortes de tejido (melladuras, roturas, dobleces)

7.7. Fuentes y métodos de recolección de datos

- Bitácora de recolección de datos, que consiste en un registro de información sobre: edad, peso, talla y los resultados de la localización y niveles de expresión de Panx1.
- Microscopio óptico (DM500, Leica) implementado con cámara digital (ICC50W, Leica).
- Software de análisis de imagen Image J 1.8 programa desarrollado en el National Institutes of Health (USA).

7.8. Variables

- Etapa del desarrollo: (variable cualitativa ordinal) corresponde al grupo etario al que pertenecen los animales utilizados durante la investigación, determinado a partir de un rango de edad especifico, siendo de 2 a 3 meses joven y de 10 a 12 meses adulto.

- Localización regional de Panx1 en el cerebro: (variable cualitativa ordinal) corresponde a la verificación y clasificación de la presencia de Panx1 en áreas específicas de la masa cerebral, correspondientes a corteza retroesplenial y las porciones CA1, CA3 y GD del hipocampo, clasificadas en las categorías de presencia y ausencia de señal.

- Localización celular de Panx1: (variable cualitativa ordinal) corresponde a la verificación y clasificación de la presencia de Panx1 en las diferentes células que conforman las diferentes regiones cerebrales, correspondientes a células piramidales y gliales, clasificadas en las categorías de presencia y ausencia de señal.

- Localización de Panx1 en compartimientos celulares: (variable cualitativa ordinal) corresponde a la verificación de la presencia o ausencia de Panx1 en los compartimientos celulares membrana plasmática, citoplasma y núcleo, además de su clasificación de presencia y ausencia de señal.

- Intensidad de inmunomarcaje: (variable cualitativa ordinal) corresponde a la clasificación de la intensidad del inmunomarcaje de Panx1 en las regiones, células y compartimientos celulares mencionados anteriormente, en las categorías: leve, moderada e intensa.

Variables relacionadas con la cantidad de inmunomarcaje.

- Índice de la densidad superficial del inmunomarcaje de Panx1: (variable cuantitativa continua) relacionada con la cantidad de inmunomarcaje de Panx1, corresponde a la cuantificación de la cantidad de señal de Panx1 por célula, en un área determinada del tejido cerebral, esta se calcula a partir de la data extraída a partir del software de análisis ImageJ (1.8) y el cálculo corresponde a una división entre el valor promedio del valor de grises (*Gray value*) dentro de cada célula por el área ocupada por la misma célula (pulgadas^2) es decir la unidad de medida sería (Gray value/ pulg^2) (en si el objetivo de esta variable es cuantificar y presentar la cantidad de Panx1 por célula).

- Índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1: (variable cuantitativa continua) corresponde a la cantidad de células positivas a Panx1 en un área determinada del tejido cerebral, los datos para este cálculo se extrajeron mediante el software de análisis Image J (1.8) y el cálculo utilizado corresponde a N° de células positivas/área utilizada, es decir, N° de células positivas/pulg^2.

- Densidad integrada del inmunomarcaje de Panx1: (variable cuantitativa continua) cuantificación de la cantidad de señal de Panx1 presente en un área determinada del tejido cerebral. Esta se diferencia del índice de la densidad debido a la forma en que aborda los datos, donde el índice toma de forma individual los datos extraídos de cada célula y luego saca un promedio, mientras la densidad integrada aborda los datos como un todo evaluando el área total ocupada por las células inmunopositivas y luego multiplicándola por el promedio del valor de grises de las mismas. Los datos serán extraídos mediante el software de análisis Image J (1.8), el cálculo corresponde, como ya mencionamos, a la multiplicación entre el área total ocupada por la señal de Panx1 por el promedio del valor de grises (*gray value*) de todas las porciones ocupadas por la misma, es decir pulg^2*valor de grises (*gray value*) (en resumen, la densidad integrada es la cuantificación de la cantidad de Panx1 a un nivel estructural).

Variable relacionada con la intensidad del inmunomarcaje.

- Densidad óptica del inmunomarcaje de Panx1: (variable cuantitativa continua). Corresponde a la cuantificación de la intensidad de la señal de Panx1 por célula, esta se determina a partir del índice de absorbancia del inmunomarcaje, la cual indica que a un grado de absorbancia alto, mayor es la intensidad de la señal. En el caso de nuestras

observaciones la densidad óptica indicará que mientras más alto sea el resultado menos intenso será la presencia de Panx1. Nuevamente los datos necesarios para este cálculo serán extraídos a partir del software de análisis ImageJ (1.8), el cálculo corresponde a Log (valor máximo del valor de grises para una imagen de 8 bits (255) /el valor de grises entregado por la célula) el resultado de esta ecuación no posee una unidad de medida (la densidad óptica en si es la cuantificación de la intensidad de Panx1 de cada célula a partir de la concentración de la misma en cada una).

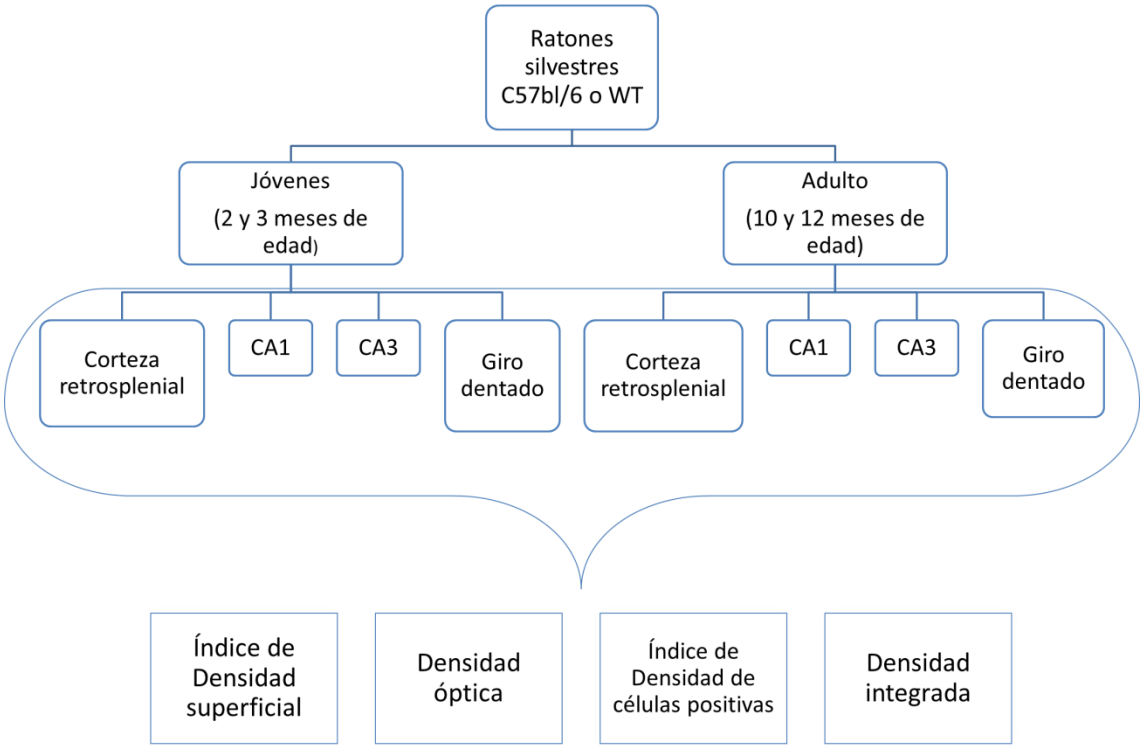


FIGURA 5: esquema resumen de la metodología a utilizada durante el proyecto.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

La manipulación de los animales fue realizada de acuerdo con el protocolo de manipulación animal aprobado por el comité de cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Universidad de Valparaíso (# BEA 064-2015).

8.1. No maleficencia

El cuidado de los animales se realizó bajo la supervisión del médico veterinario Sr. Enzo Seguel, en el Bioterio de la Universidad Valparaíso, en las instalaciones del edificio Bruno Günther de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Dentro de las instalaciones del Bioterio, el personal certificado se encarga del cuidado y manejo diario de los animales. Estos cuidados incluyen el control sobre el ciclo de luz/oscuridad, temperatura, agua y alimentación y la limpieza de las jaulas. Durante todo el proceso los animales serán monitoreados siguiendo una pauta de bienestar animal con el objetivo de mantener el resguardo y salud de los animales.

Las condiciones en el Bioterio son las establecidas por el FAWC *(Farm Animal Welfare Committee)*, conocidas como las 5 libertades, las cuales dictan:

- Los animales no padecerán ni hambre ni sed
- No sufrirán malestar físico ni dolor
- No sufrirán heridas ni enfermedades
- Se ajustarán a su comportamiento normal y esencial
- No sufrirán miedo ni angustia.

En cuanto al trabajo con los animales, se siguieron las normas ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*), del Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en Experimentación (NC3Rs). Estas normas son utilizadas por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad de Valparaíso (CICUAL-UV) (BEA064-2015).

La aplicación de las "3Rs" durante nuestro estudio, se basó en lo siguiente:

- Reemplazo: para la estandarización de los anticuerpos, utilizaremos muestras del laboratorio, las que fueron obtenidos por tesistas anteriores. Estas muestras controles, presentan las características necesarias para nuestro estudio.

- Reducción: buscaremos utilizar la menor cantidad de animales, para obtener una cantidad de muestra estadísticamente significativa.

- Refinamiento: se implementarán cambios en los protocolos establecidos dentro del laboratorio, relacionados con el manejo y procesamiento de las muestras, con el objetivo de maximizar la cantidad de muestra útil obtenida por animal.

Además de lo anterior, durante todos los procedimientos, velamos por mantener a los animales en las mejores condiciones posibles, con la intención de reducir sus niveles de estrés. Para lo anterior, los animales fueron dispuestos en un rack ventilado con control de temperatura (21±2 ºC) y humedad (60%) y minimización de ruido. Además, se procurará una alimentación equilibrada con un pellet para roedores (PROLAB RMH 3000) y agua ad libitum y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas.

Posterior al procedimiento quirúrgico de la perfusión intracardiaca, los animales fueron anestesiados con isoflurano (forane, B506, abbvie) ($C_3H_2ClF_5O$), en una cámara de anestesia, Una vez sedado el animal, se corroborará su estado mediante la prueba de reflejo verificando el estado de inconciencia del animal.

8.2. Beneficencia

El objetivo principal de nuestro estudio es aportar información, con un estudio sistemático y detallado, Acerca de la regulación de la expresión de Panx1 en distintas etapas del desarrollo (joven y adulto). Esto con el propósito de entregar información a futuras investigaciones sobre el cambio que sufriría esta proteína con la edad, además de las regiones cerebrales, células neuronales y compartimientos celulares afectados por la regulación de Panx1.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Animales

Se utilizaron ratones WT, obtenidos del Bioterio de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso. Los animales son mantenidos bajo condiciones de luz/oscuridad 12h/12h, temperatura 21-22ºC con agua y alimento a libre disposición.

9.2. Recolección de muestra

9.2.1. Eutanasia y perfusión de los animales

Una vez se ha alcanzado la edad deseada, los animales fueron escogidos para realizar el proceso de perfusión. Todo el material de perfusión fue verificado previamente, tanto el sistema de perfusión como el material de vidrio, para uso exclusivo de paraformaldehido (PFA).

Los animales fueron anestesiados con isofurano (forane, B506, abbvie) ($C_3H_2ClF_5O$), en una cámara de anestesia. Una vez sedado el animal, se corroboró su estado mediante la prueba de reflejo, verificando la ausencia de signos de conciencia. Inmovilizamos al ratón sedado sobre una bandeja quirúrgica para proceder con la perfusión. Usando pinzas quirúrgicas se levantó la piel sobre el xifoides realizando un corte en dirección paralela a la columna vertebral, revelando la pared abdominal exterior. Usando pinzas quirúrgicas se levantó el esternón exponiendo el diafragma, el cual es cortado para exponer las costillas, las cuales son seccionadas en dirección paralela a los pulmones formando un "colgajo" de pecho, este se dobla sobre la cabeza del animal sujetado por una tijera clampar dejando expuesto el corazón. En este punto todo el procedimiento tiene que hacerse de forma rápida y precisa. Se sujetó el corazón con la suficiente firmeza para permitir perforar el ventrículo izquierdo con la aguja de perfusión de calibre 19-21G. Ya perforado se sujetó la aguja con una tijera clampar pequeña para evitar su salida. Posteriormente se cortó la aurícula derecha y se continuo con el ingreso de la solución salina (NaCl 0.9%), utilizando 20 ml para sacar toda la sangre del ratón. Al terminar, se realizó la fijación con 40 ml de PFA ($OH(CH_2O)_nH$; n = 8 - 100) a través de la misma aguja de perfusión. Observando las contracciones de la porción superior e inferior del ratón nos aseguramos del correcto ingreso del fijador.

Al terminar el proceso de perfusión, se decapitó al ratón efectuando un corte en la región cervical con el uso del instrumental adecuado (guillotina para ratones), permitiendo disponer de la cabeza del ratón de forma rápida y eficiente, esta fue depositada en una capsula de Petri plástica. El resto del cuerpo del animal fue envasado y etiquetado como material biológico según los protocolos correspondientes para el tratamiento de este y su retiro posterior.

9.2.2. Obtención del cerebro

Se realizó un corte sagital en el cuero cabelludo del animal con una hoja doble filo (tipo Gillette). Con ayuda de una tijera quirúrgica se rompió y abrió el cráneo del animal y con pinzas quirúrgicas se abren las meninges dejando expuesta la masa encefálica. Con una espátula curva se extrajo el cerebro del animal, dejándolo sobre de una capsula Petri. Ya terminada esta parte del proceso, se almacenó el cerebro en un tubo falcón de 50 ml con 25 ml de PFA durante 24 horas a 4 Cº, donde luego se reemplazó el fijador por buffer fosfato salino 0,1M (PBS 1x) por otras 24 horas. De ser necesario almacenar por más tiempo, se dispondrá en alcohol 70%.

9.3. Procesamiento de la muestra

9.3.1. Proceso de corte

El cerebro fue posicionado sobre una matriz de vidrio, en la que se midieron los niveles de corte para el encéfalo, 5 milímetros desde el cerebelo en dirección rostral y 4 milímetros desde el bulbo en dirección caudal. Al terminar, se dispuso la muestra en canastillos plásticos de procesamiento histológico, los cuales se registraron mediante un código.

9.3.2. Obtención del taco de parafina

Una vez cortadas las muestras, estas fueron sometidas a un lavado con agua destilada por 30 minutos, para luego ser deshidratadas con alcoholes de graduación ascendente (50%,70%,80%,95% I, 95% II, 100%I, 100%II y 100%III), cada uno por media hora. Una vez deshidratada la muestra, esta fue sometida al proceso de aclaramiento con xilol en 3 etapas secuenciales, las 2 primeras de una duración de 15 minutos y la última dura toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se evaluó la condición del tejido y se procedió a embeber las muestras mediante 3 pasos de parafina a 60Cº por media hora cada uno. Por último, se prepararon los tacos de parafina con los moldes correspondientes y se registró la fecha y la hora del inicio y el término del procedimiento.

9.4. Cortes para análisis

Las muestras fueron cortadas a 7µm, de forma seriada y montadas sobre portas con Poly-L-lysine. Manteniendo el orden y numeración adecuada de cada muestra.

Buscando evitar daños en el tejido en procesos posteriores, los portas con muestra se dejaron secar toda la noche a 37 Cº. Al día siguiente, los cortes se secaron 60º durante media hora, para luego ser utilizados en las técnicas posteriores.

Se escogieron cortes que incluyeran la CR, CA1, CA3 y GD del hipocampo, pues son las regiones de interés por la relación funcional de estas estructuras entre sí y al rol de Panx1 en su regulación. Los cortes seleccionados son comparables entre los grupos de estudio, asegurando así tanto la semejanza como también la compatibilidad entre las imágenes obtenidas.

9.5. Técnica de hematoxilina-eosina

La técnica rutina hematoxilina-eosina (H&E) fue realizada con la intención de obtener una imagen general de la histología cerebral de los animales. La técnica de H&E tiñe los núcleos de las células de un color azul (hematoxilina de Harris) y el citoplasma de las células de un color rosa fuerte (eosina).

Los cortes fueron desparafinados en una batería de xiloles, por 10 minutos cada uno y rehidratados en alcoholes de grados descendente y posteriormente lavados en agua destilada, por 5 minutos cada uno. La tinción nuclear fue realizada con hematoxilina de Harris por 30 segundos y su viraje en agua corriente por 10 minutos. Posteriormente las muestras se lavaron en alcohol de 95% por 5 minutos y luego se tiñeron con eosina alcohólica durante 4 segundos. Finalmente se deshidrataron los cortes en alcoholes de graduación ascendente por 5 minutos cada uno, se aclararon en 3 xiloles por 10 min cada uno y se cubrieron los cortes con el medio de montaje hidrófobo Entellán (Merck, 107961).

9.6. Técnica de Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica se utilizó con el propósito de analizar cualitativa y cuantitativamente la presencia (inmunomarcaje) de la proteína Panx1 en las diversas regiones, células y compartimientos celulares presentes en las muestras de tejidos del cerebro de ratones. A continuación, se detalla el procedimiento.

Luego de desparafinar y rehidratar los tejidos, se realizó la recuperación antigénica con buffer Citrato de sodio (pH 6.0) en vaporera (Oster modelo 5711-052) a 95ºC. El buffer se precalentó en la vaporera a 95ºC por 20 minutos y luego se introdujeron los cortes de tejidos en la solución durante 20 minutos a 95ºC. Posteriormente, se dejaron enfriar las muestras durante 25 minutos en el mismo buffer fuera de la vaporera, con el objetivo que las proteínas tisulares recuperen su conformación original.

Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces en agua destilada durante 5 minutos y se procedió a bloquear la enzima peroxidasa endógena, mediante el uso de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3% durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con buffer fosfato salino 0,1M (PBS 1x) a pH 7.2, durante 5 minutos cada uno y se realizó un bloqueo de las proteínas inespecíficas, mediante el uso de Cas-block durante 30 minutos y una solución de incubación (SI) conformada por PBS1x, BSA 4% tritón 0.1% suero de cabra 5%, durante 60 minutos.

Para estudiar la distribución de la proteína Panx1 se utilizó el anticuerpo anti-Panexina 1, policlonal de conejo (ABN242, Sigma-Aldrich), a una dilución 1:200 en SI. La incubación de los tejidos con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a

4ºC. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS 1x durante 5 minutos cada uno y se incubaron las preparaciones con el anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra (Jackson inmunoresearch 111-035-003), durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda a una dilución 1:250 en la SI.

Para continuar, ser realizaron 3 lavados con PBS 1x, durante 5 minutos cada uno. Para revelar la reacción antígeno-anticuerpo, se utilizó una solución de 5 mg/ml de 3,3´-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (DAB; D5637, Sigma-Aldrich) durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron las muestras en agua destilada durante 5 minutos. Finalmente, los cortes de tejidos se deshidrataron en alcoholes a concentraciones ascendentes durante unos segundos, se aclararon en xiloles por 5 minutos cada uno y se cubrieron con el medio de montaje hidrófobo Entellán (Merck, 107961).

9.7. Plan de Análisis

9.7.1. Análisis de la presencia de Panx1

Mediante el uso de microscopio óptico (DM500, Leica) implementado con cámara digital (ICC50W, Leica), se documentó el patrón de expresión y la distribución regional, celular y de compartimiento celular de Panx1 en los periodos específicos del desarrollo del ratón correspondiente a adulto y joven. De la misma manera, se describió tanto la presencia como la ausencia de Panx1, como también los niveles de intensidad del inmunomarcaje del mismo, siendo esta categorizada como: leve, moderada e intensa. Para cuantificar la cantidad e intensidad del inmunomarcaje de Panx1, se utilizó el software ImageJ 1.8, con el cual se extrajeron los datos necesarios para determinar: densidad superficial (cantidad de señal por célula), densidad óptica (intensidad de la señal por célula), densidad integrada (cantidad de señal por área de tejido) y densidad de células positivas (número de células positivas al anticuerpo Panx1en un área determinada de tejido).

9.7.2. Procedimiento de captura fotográfica y análisis de imágenes.

Captura de imágenes

Una vez terminada la inmunohistoquímica se prosiguió con el proceso de captura fotográfico. Durante este proceso se realizó la captura de imágenes en serie de la corteza como también de las distintas porciones del hipocampo denominadas CA1, CA3 y GD correspondiente a todos los individuos de los grupos joven y adulto. Cada fotografía se obtuvo con el microscopio óptico (DM500, Leica). El software incorporado permitió la captura de estas imágenes con un aumento de 20X.

Análisis de imágenes

Las imágenes fueron procesadas mediante el software de análisis ImageJ (versión 1,8). El análisis del inmunomarcaje se realizó mediante una evaluación de escala de grises, a partir de un proceso estandarizado para cada imagen.

En primera instancia para cada uno de los tejidos cerebrales como ya mencionamos se corroboró que las imágenes tomadas de cada estructura fueran comparables entre grupos, junto con esto definimos y seleccionamos tanto las imágenes como también un área de trabajo dentro de las mismas que correspondiera a la misma zona donde realizamos los análisis posteriores en los distintos animales (FIGURA 6).

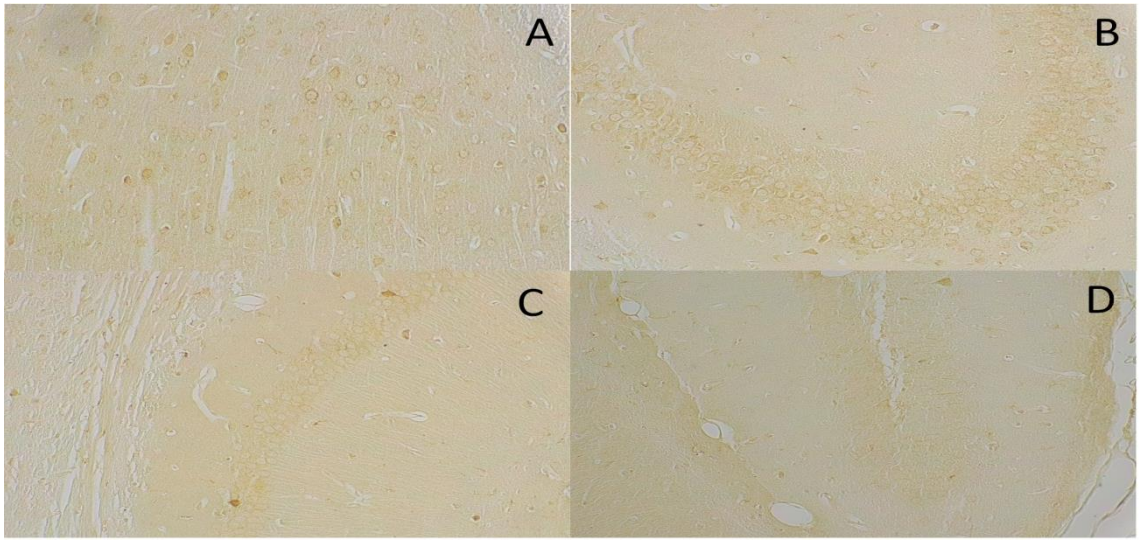


FIGURA 6: Microfotografías representativa de las distintas áreas seleccionadas para cada estructura: CR (A), CA1 (B), CA3 (C) y GD (D).

Al terminar con la selección de las imágenes y el área de trabajo de estas, realizamos la selección manual de la cada célula que presentaba una señal positiva a Panx1, esta selección consiste en rodear de forma manual el área correspondiente a la célula (FIGURA 7) definiéndola como una región de interés (ROI) para el programa. Esto fue repetido en todas las imágenes de las distintas estructuras para cada animal para su posterior análisis.

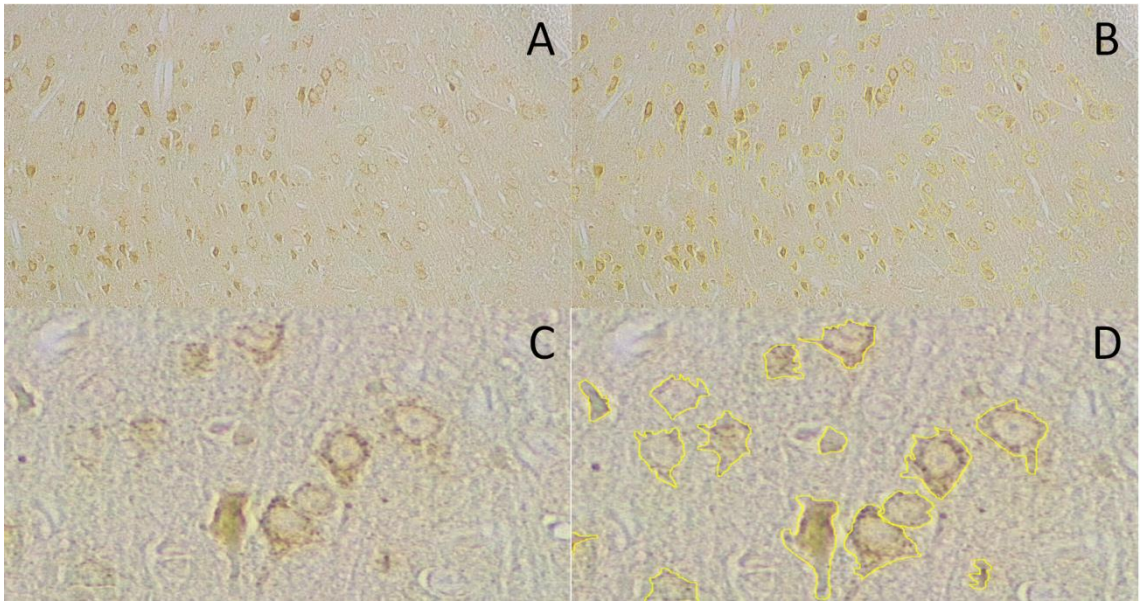


FIGURA 7: Selección manual de la región de interés para el análisis de la señal de Panx1 en células positivas al inmunomarcaje. A-B, Imágenes de la CR antes (A), y después (B) de la selección manual de las regiones de interés (ROI) en células consideradas como positivas al inmunomarcaje de Panx1. C-D, Ampliación de las regiones mostradas en A y B antes (C) y después (D) de la selección manual realizada a cada una de las células.

Ya terminado el proceso de selección de las imágenes, cada una se transformó a 8-bit, formato que asigna un valor en escala de grises (0-255) a cada pixel presente en la imagen (FIGURA 8). Esta escala asigna un valor todos los colores que existen en una imagen de 8-bits siendo negro=0 y blanco=255 (escala).

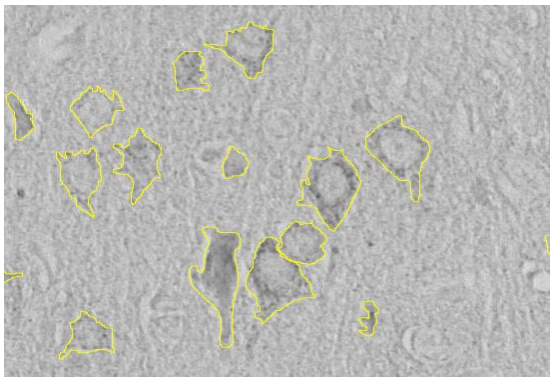


FIGURA 8: Selección manual de neuronas de la corteza retroesplenial y posterior transformación de la imagen a 8-bits.

A continuación, se invirtieron los valores de los pixeles, de esta manera la inmunomarcación presente en la imagen pasa de ser de un valor de gris oscuro a uno claro.

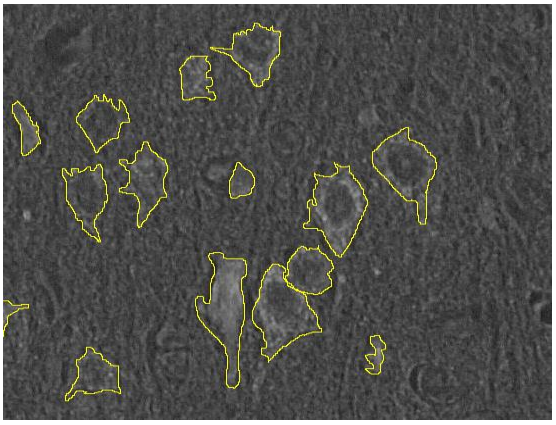
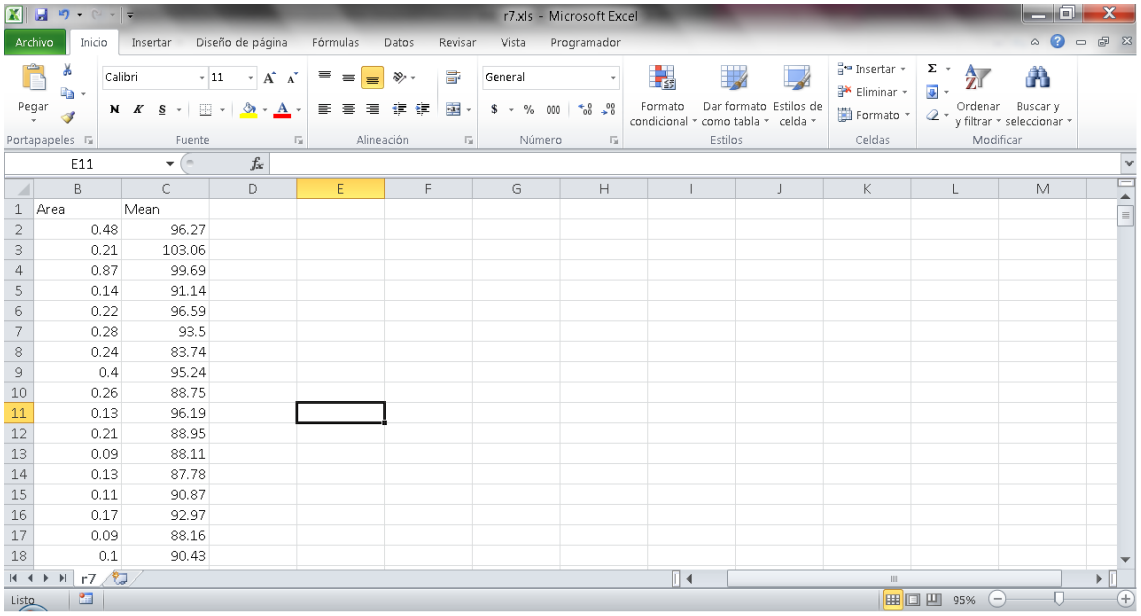


FIGURA 9: Selección manual de neuronas de la corteza retroesplenial e inversión de los colores en un formato de color de 8-bits.

Finalmente se realizó la medición de la imagen con la intención de obtener tanto los valores de grises (*gray value*) de cada célula como también el área de cada una.



	B	C
1	Area	Mean
2	0.48	96.27
3	0.21	103.06
4	0.87	99.69
5	0.14	91.14
6	0.22	96.59
7	0.28	93.5
8	0.24	83.74
9	0.4	95.24
10	0.26	88.75
11	0.13	96.19
12	0.21	88.95
13	0.09	88.11
14	0.13	87.78
15	0.11	90.87
16	0.17	92.97
17	0.09	88.16
18	0.1	90.43

FIGURA 10: Data extraída y tabulada al realizar cada medición. La columna B contiene los datos de el área de cada una de las células seleccionadas, mientras la columna C contiene los valores de la señal en pixeles promedio para cada área.

Toda la data extraída por cada imagen se evaluó con el objetivo de determinar el valor de los índices de densidad superficial, índice de densidad integrada, índice de densidad de células positivas y por último la densidad óptica promedio de cada imagen.

9.7.3. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad 6 (Graphpad Software Inc, CA, USA). Los resultados se expresarán como promedio ± error estándar y la significancia estadística fue determinada utilizando la prueba Mann-Whitney para datos no paramétricos. El nivel de significancia para los resultados fue de P=0,05.

10. RESULTADOS

10.1. Análisis inmunohistoquímico de Panx1 en el cerebro

En relación al primer objetivo de esta investigación, para cada grupo de animales (joven y Adulto) se describió, mediante inmunohistoquímica, la localización de Panx1 en la CR y en las porciones CA1, CA3 y GD del hipocampo, al mismo tiempo se evaluó la presencia de Panx1 en las diferentes células de éstas regiones y en sus compartimientos celulares.

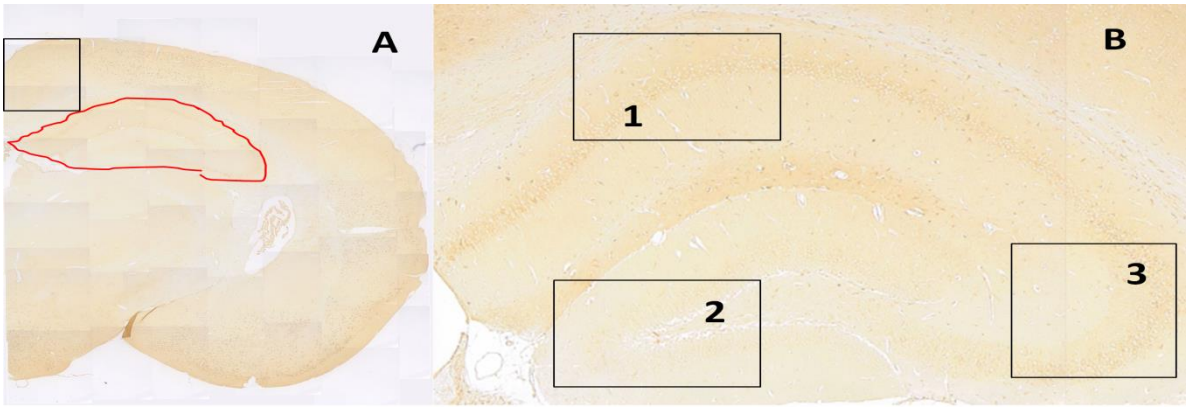


FIGURA 11: Regiones cerebrales de estudio mediante inmunohistoquímica para Panx1. (A) Reconstrucción de un hemicerebro de un ratón joven de 3 meses de edad, en el cual señala la CR (recuadro negro) y el hipocampo (delimitado en rojo). (B) Reconstrucción de un hemicerebro de un ratón joven de 2 meses de edad, en donde se señalan con recuadros el área de CA1 (1), CA3 (2) y GD (3) del hipocampo.

10.1.1. Localización de Panx1 en la CR

En la CR de los ratones de ambos grupos, se observó localización de Panx1 en la membrana plasmática, en el citoplasma y en el núcleo de las neuronas piramidales (FIGURA 12). Tanto en la membrana como en el citoplasma, la intensidad de la señal fue clasificada como moderada en los ratones jóvenes (FIGURA 12 A, A1 y A2) e intensa en los adultos (FIGURA 12 B, B1 y B2), en ambos casos con un patrón de marcaje granular (puntiforme) homogéneo.

En cuanto al inmunomarcaje de Panx1 en el núcleo, en ambos grupos de ratones el patrón de inmunomarcaje fue difuso homogéneo, sin embargo, fue clasificado como leve en los ratones jóvenes (FIGURA 12 A, A1 y A2) y moderado en los adultos (FIGURA 12 B, B1 y B2).

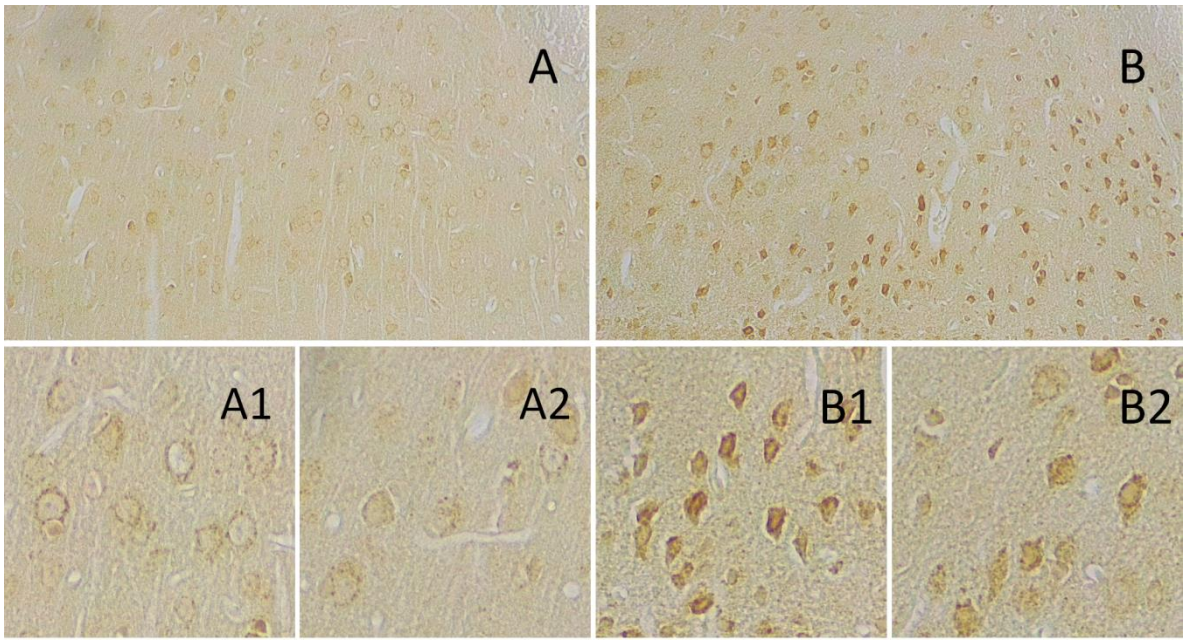


FIGURA 12: Inmunomarcación de Panx1 en la CR (20X). Se muestra la localización de Panx1 en la CR de animales jóvenes (A) y adultos (B). A1, A2, B1 y B2, corresponden a magnificaciones de las imágenes A y B, respectivamente. Nótese que Panx1 se localiza en la membrana, citoplasma, con un patrón granular homogéneo y en menor medida en el núcleo, con un patrón difuso homogéneo, de las neuronas piramidales de la corteza retroesplenial de ambos grupos de ratones, sin embargo, el inmunomarcaje es mayor en los ratones adultos (B, B1 y B2), en comparación al de los ratones jóvenes (A, A1 y A2).

10.1.2. Localización de Panx1 en el hipocampo

En el caso del hipocampo, en los ratones jóvenes y adultos se observó inmunomarcaje de Panx1 en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo (FIGURA 13, 14 y 15).

En CA1 el inmunomarcaje de Panx1 se observó en la membrana plasmática, en el citoplasma y en el núcleo de las neuronas piramidales (FIGURA 13). Tanto en la membrana como en el citoplasma, la intensidad de la señal fue clasificada como moderada en los ratones jóvenes (FIGURA 13 A, A1 y A2) y de moderada a intensa en los adultos (FIGURA 13 B, B1 y B2). El patrón de marcaje fue homogéneo en los animales jóvenes y de un carácter granular heterogéneo en los animales adultos, observándose puntos de mayor intensidad (FIGURA 13 B2).

En cuanto al inmunomarcaje de Panx1 en el núcleo, la intensidad fue leve tanto para los ratones jóvenes (FIGURA 13 A, A1 y A2) como adultos (FIGURA 13 B, B1 y B2). Además, en ambos grupos de ratones el patrón de inmunomarcaje fue puntiforme perinuclear, observándose la carioteca marcada.

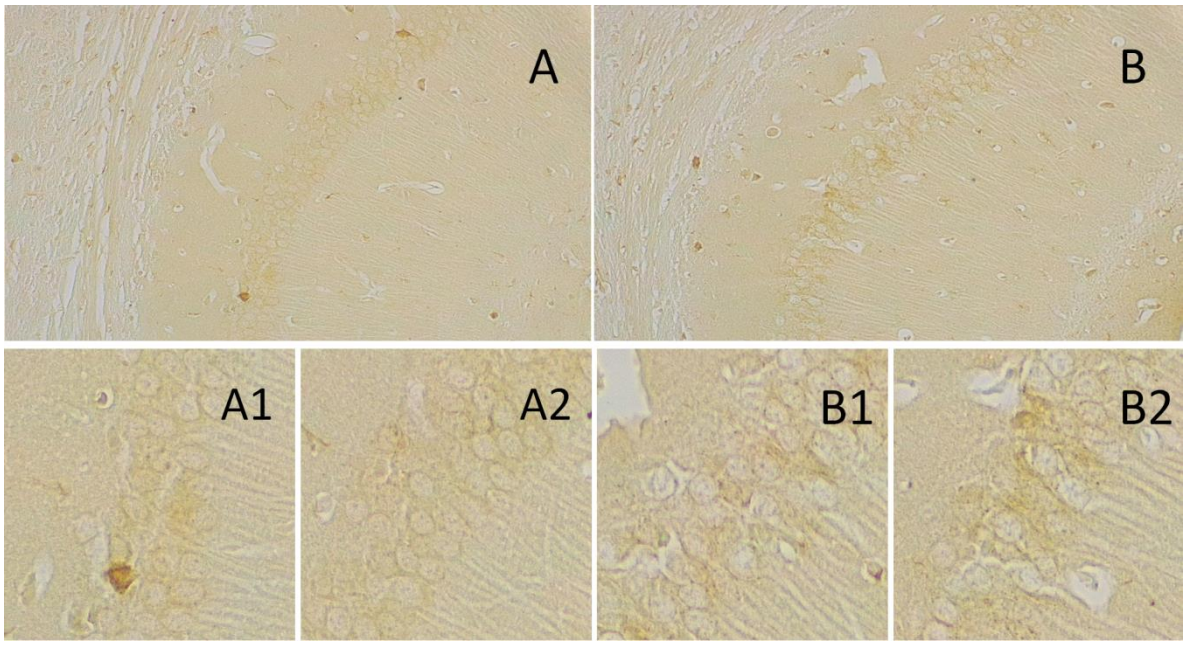


FIGURA 13: Inmunomarcación de Panx1 en la región CA1 del hipocampo (20X). Se observa la localización de Panx1 en la región CA1 del hipocampo de animales jóvenes (A) y adultos (B). A1, A2, B1 y B2, corresponden a magnificaciones de las imágenes A y B, respectivamente. Panx1 se localiza en la membrana, citoplasma y núcleo de las neuronas piramidales de la región CA1, donde se observa una distribución homogénea del inmunomarcaje en los animales jóvenes (A, A1 y A2) y en los adultos una organización heterogénea, que al mismo tiempo posee puntos de mayor intensidad de inmunomarcaje (B, B1 y B2).

Continuando con la región CA3 del hipocampo, el inmunomarcaje de Panx1 se observó con un patrón similar a la porción CA1, estando presente tanto en la membrana plasmática, el citoplasma y el núcleo de las neuronas piramidales (FIGURA 14). Tanto en la membrana como en el citoplasma, la intensidad de la señal fue clasificada como moderada en los ratones jóvenes (FIGURA 14 A, A1 y A2) y de moderada a intensa en los adultos (FIGURA 14 B, B1 y B2). Referente al patrón de inmunomarcaje este fue homogéneo en los animales jóvenes y de un carácter granular heterogéneo en los adultos, caracterizado por grupos de mayor intensidad ubicados principalmente de forma perinuclear (FIGURA 14 B2). Continuando con la señal presente en los núcleos, esta fue leve en los ratones jóvenes (FIGURA 14 A, A1 y A2) y se mantuvo leve en los ratones adultos (FIGURA 14 B, B1 y B2).

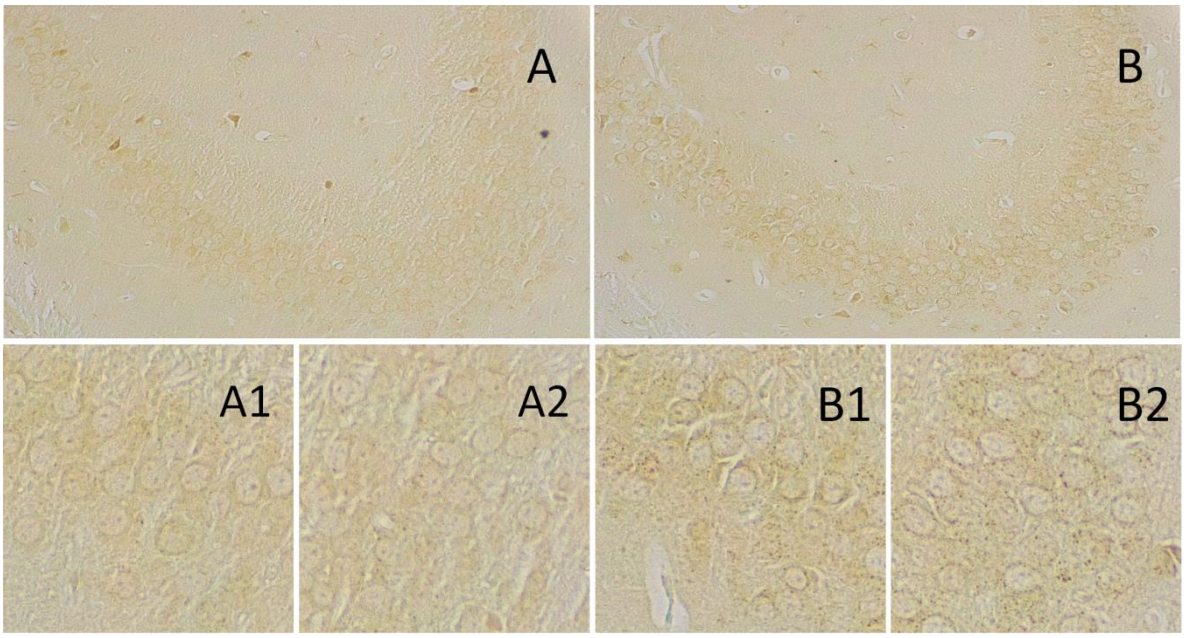


FIGURA 14: Inmunomarcación de Panx1 en la región CA3 del hipocampo (20X). Se observa la localización de Panx1 en la región CA3 del hipocampo de animales jóvenes (A) y adultos (B). A1, A2, B1 y B2, corresponden a magnificaciones de las imágenes A y B, respectivamente. Panx1 se localiza en la membrana, citoplasma y núcleo, con un patrón granular, siendo este homogéneo en los animales jóvenes (A, A1 y A2) y heterogéneo en los adultos donde la distribución adquiere una organización concentrada de forma perinuclear, que al mismo tiempo presenta un inmunomarcaje mayor (B, B1 y B2).

En el GD del hipocampo el inmunomarcaje de Panx1 se observó con un patrón similar a las porciones anteriores, estando presente tanto en la membrana plasmática, el citoplasma y el núcleo de las neuronas piramidales (FIGURA 15). Tanto en la membrana como en el citoplasma, la intensidad de la señal fue clasificada de leve a moderada en los ratones jóvenes (FIGURA 15 A, A1 y A2) y de moderada a intensa en los adultos (FIGURA 15 B, B1 y B2). En relación con el patrón de inmunomarcaje, este fue homogéneo en los animales jóvenes y de un carácter granular heterogéneo en los adultos. De forma notoria observamos grupos de mayor intensidad en donde la inmunomarcación no sólo estaba presente de forma perinuclear, sino también se extendía revelando parte de las prolongaciones neuronales (FIGURA15 B2). Continuando con la señal presente en los núcleos, esta fue leve en los ratones jóvenes (FIGURA 15 A, A1 y A2) y leve con porciones de carácter moderada en los ratones adultos (FIGURA 15 B, B1 y B2).

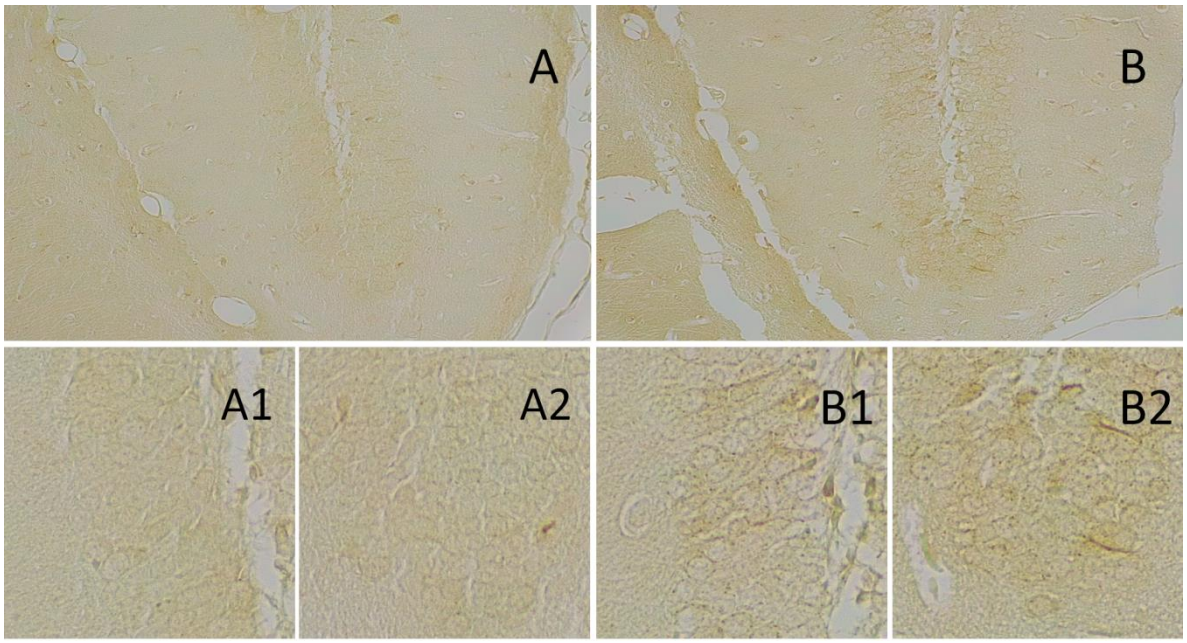


FIGURA 15: Inmunomarcación de Panx1 en el GD del hipocampo (20X). Se observa la localización de Panx1 en la región GD del hipocampo de animales jóvenes (A) y adultos (B). A1, A2, B1 y B2, corresponden a magnificaciones de las imágenes A y B, respectivamente. Panx1 se localiza en la membrana, citoplasma y núcleo, con un patrón granular, siendo este homogéneo en los animales jóvenes (A, A1 y A2) y heterogéneo en los adultos donde la distribución adquiere un inmunomarcaje más intenso en un patrón perinuclear que se extiende a las prolongaciones neuronales, (B, B1 y B2).

10.2. Índice de densidad superficial de Panx1 en la CR e hipocampo

Para la realización del segundo objetivo, y con el propósito de cuantificar la cantidad de señal de Panx1, se determinó el índice de densidad superficial del inmunomarcaje de Panx1. Esto se realizó a partir del análisis de las microfotografías descritas anteriormente, de la CR y de las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo, en los grupos de ratones jóvenes y adultos.

En concordancia con el análisis cualitativo descrito en la sección 10.1, la cantidad de señal de Panx1 fue mayor en la CR de ratones adultos en comparación a los ratones jóvenes, pues se encontró un índice de densidad superficial de 929,4 ± 74,36 en los ratones adultos y de 555,2 ± 58,82 P=0,0159* en los ratones jóvenes (FIGURA 16 A) cuyo resultado fue estadísticamente significativo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de señal de Panx1 en las regiones CA1 (joven: 572,7 ± 92,31 y adulto: 583,2 ±122,6; FIGURA 16 B), P=0,8016, CA3 (jóvenes 355,3 ±

66,98 y adultos 494,9±103,6; FIGURA 16 C), P= 0,3095 y GD (jóvenes 687,9 ± 105,2 y adultos 964,8±148,7; FIGURA 16 D), P= 0,2222 del hipocampo.

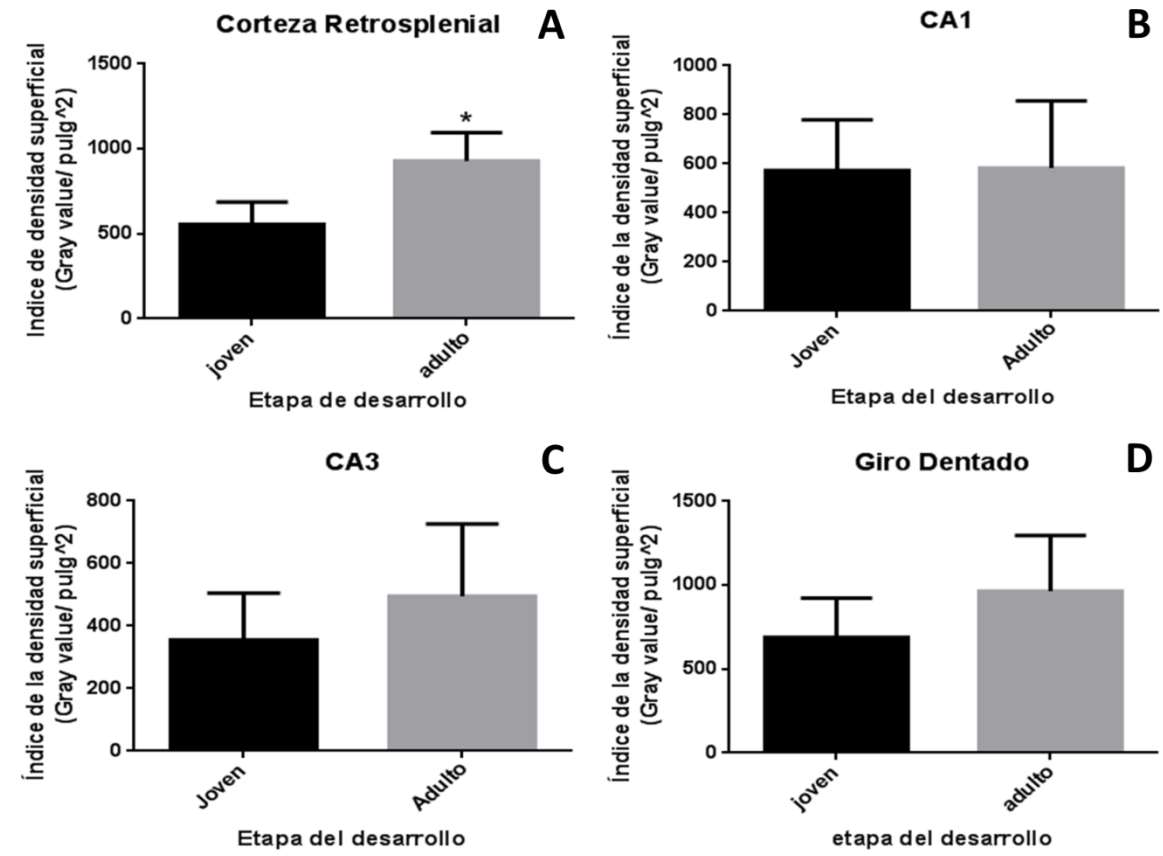


FIGURA 16: Cuantificación del índice de densidad superficial de Panx1 en la CR e hipocampo. Índice de densidad superficial de Panx1 en CR (A), CA1 (B), CA3 (C) y GD (D) del hipocampo. Los datos son expresados como promedio ± error estándar. *indica en el gráfico de la imagen A que existe una diferencia significa con respecto al grupo de animales jóvenes a $p<0,05$ evaluado mediante la prueba Mann-Whitney para datos no paramétricos.

10.3.Densidad óptica de Panx1 en la CR e hipocampo

Para completar el tercer objetivo, relacionado con la cuantificación de la intensidad de la señal de panx1, se describió la densidad óptica de la señal en la expresión de la proteína Panx1, Esto se realizó a partir del análisis de microfotografías de inmunohistoquímica, en las porciones y grupos mencionados anteriormente.

Si bien los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa descritos en la sección 10.1 indicaban un aumento de panx1 en los animales adultos, los datos obtenidos a partir de la densidad óptica, establecieron que ninguna de las estructuras estudiadas presentó cambios estadísticamente significativos CR (Joven 0,4444 ± 0,02852, Adulto 0,3599 ± 0,02572; P=0,0556; FIGURA 17 A), CA1 (joven: 0,4611 ± 0,04170, adulto: 0,4409 ± 0,05830; P=0,9444; FIGURA 17 B) CA3 (joven 0,4747 ± 0,04416 adulto 0,4373 ± 0,05500; P=0,6667; FIGURA 17 C), GD (joven: 0,4767 ± 0,04025 adulto 0,4245 ± 0,04549; P=0,4127; FIGURA 17 D).

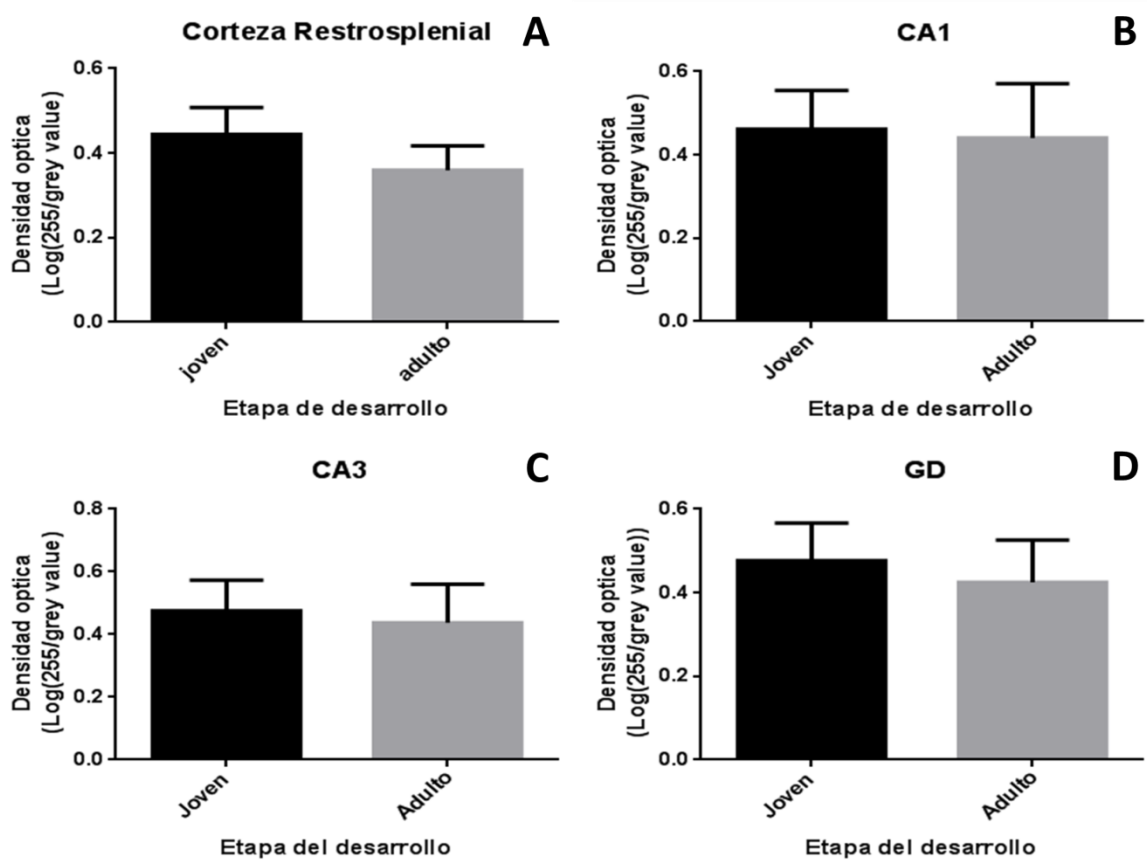


FIGURA 17: Cuantificación de la densidad óptica de Panx1 en la CR e hipocampo. Densidad óptica de la presencia de Panx1 en CR (A), CA1 (B), CA3 (C), GD (D). Estos son presentados como promedio ± error estándar. Evaluados mediante la prueba Mann-Whitney para datos no paramétricos.

10.4. Índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1 en la CR e hipocampo

Para la realización del cuarto objetivo, relacionado con la cuantificación de la cantidad de señal de panx1, se determinó el índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1, a partir del análisis de las microfotografías, en las porciones y grupos mencionados anteriormente.

Al realizar el análisis de los datos, se determinó que ninguna de las estructuras estudiadas presento cambios estadísticamente significativos CR (Joven 0,5180 ± 0,04587, Adulto 0,7620 ± 0,1060; P=0,0556; FIGURA 18 A), CA1 (joven: 0,3060 ± 0,0140, adulto: 0,2820 ± 0,01655; P=0,3333; FIGURA 18 B), CA3 (joven 0,7560 ± 0,07118 adulto 0,8540 ± 0,06306; P=0,3095; FIGURA 18 C), GD (joven: 1,006 ± 0,08858 adulto 1,204 ± 0,09282; P=0,1508; FIGURA 18 D).

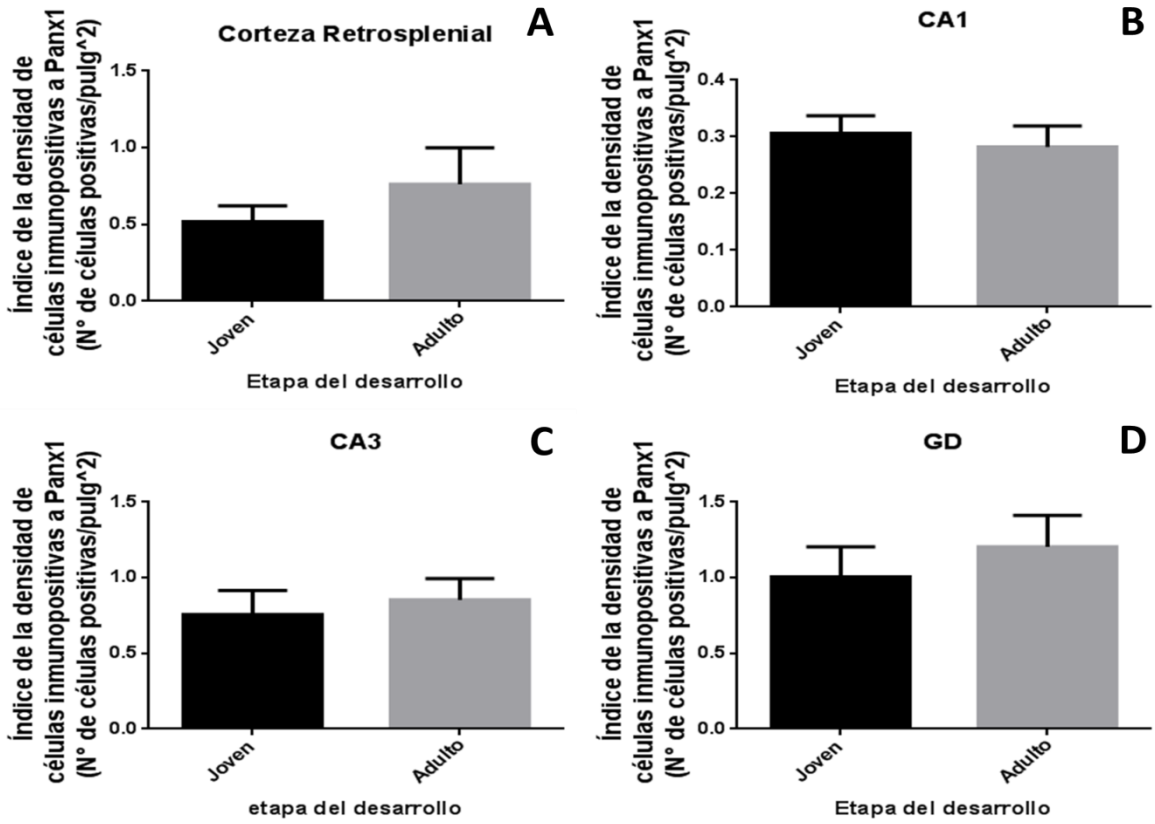


FIGURA 18: Cuantificación del índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1 en la CR e hipocampo. Índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1 en: CR (A), CA1 (B), CA3 (C), GD (D). Estos son presentados como promedio ± error estándar. Evaluados mediante la prueba Mann-Whitney para datos no paramétricos.

10.5. Densidad integrada de Panx1 en la CR e hipocampo

Para completar el quinto objetivo, relacionado con la cuantificación de la cantidad de señal de Panx1, se determinó la densidad integrada del inmunomarcaje, el cual a diferencia del índice de densidad superficial, que considera los datos célula a célula, la densidad integrada aborda los datos provenientes de todas las células al mismo tiempo, estimando la sumatoria de todas las áreas ROI definidas para cada células multiplicado por el promedio del valor de grises *(gray value)* de todas las células, Esto se realizó a partir del análisis de las microfotografías, porciones y grupos mencionados anteriormente.

No se observaron cambios estadísticamente significativos dependientes de la edad en ninguna de las estructuras estudiadas, así la CR (Joven 4630 ± 540,6, Adulto 5811 ± 881,0; P=0,0556 FIGURA 19 A), CA1 (joven: 3157 ± 265,0, adulto: 3172 ± 388,8; P=0,9444; FIGURA 19 B), CA3 (joven 8958 ± 600,1 adulto 9522 ± 870,8; P=0,6667

; FIGURA 19 C), GD (joven: 5766 ± 732,1 adulto 6470 ± 916,4; P=0,6667; FIGURA 19 D) mostraron valores similares.

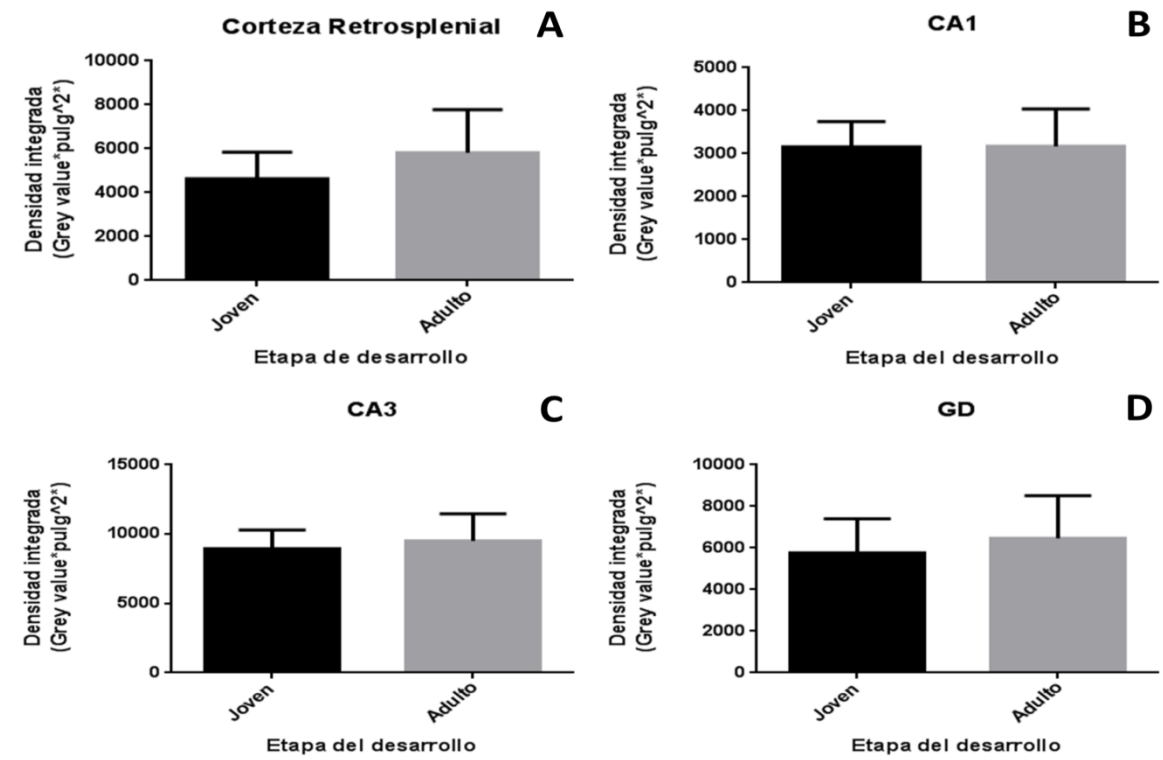


FIGURA 19: Cuantificación de la densidad integrada de la presencia de Panx1 en la CR e hipocampo. Densidad integrada de Panx1 en CR (A), CA1 (B), CA3 (C), GD (D). Estos son presentados como promedio ± error estándar. Evaluados mediante la prueba Mann-Whitney para datos no paramétricos

10.6. Comparación de la cantidad de inmunomarcaje de Panx1

Para realizar el objetivo número 6, se compararon las distintas variables medidas, es decir, índice de densidad superficial, densidad integrada e índice de la densidad de células positivas a Panx1, todas relacionadas con la cantidad de señal de Panx1 presente en: CR (TABLA 1), CA1 (TABLA 2), CA3 (TABLA 3) y GD (TABLA 4), entre los ratones jóvenes y adultos.

Tal como describimos en las secciones anteriores, al realizar la comparación de estas variables, sólo la medición del índice de densidad superficial en la CR mostró resultados estadísticamente significativos (P= 0,0159*, TABLA 1), mientras que, el resto de las mediciones en la CR, Índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1 y la densidad integrada, no presentaron resultados estadísticamente significativos (P=0,0556, TABLA 1). Pese a esto existe una tendencia donde la cantidad de Panx1 es mayor en los ratones adultos como se muestra en las FIGURAS 16 A, 18 A y 19 A.

Variables CR	Grupo joven (2 a 3 meses) n:5		Grupo adulto (10 a 12 meses) n:5		P-value (*Mann-Whitney)
	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	
Índice de densidad superficial	555,2	58,82	929,4	74,36	0,0159*
Densidad integrada	4630	540,6	5811	881,0	0,0556
Índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1	0,5180	0,04587	0,7620	0,1060	0,0556

Tabla 1: Cuadro comparativo de la cantidad de inmunomarcaje de Panx1 en la CR del cerebro. Se muestra una comparación de los valores del índice de densidad superficial, densidad integrada e índice de la densidad de células positivas a Panx1, en CR por grupo etario. Los valores corresponden a valor promedio ± erros estándar, además del P-value de cada una de las variables. * diferencias estadísticamente significativas (Mann-Whitney)

En el caso de la región CA1, ninguna de las mediciones otorgó resultados estadísticamente significativos (índice de densidad superficial P= 0,8016, densidad integrada P= 0,9444 e índice de la densidad de células inmunopositivas P= 0,3333, TABLA 2). Sin embargo, existe una tendencia donde la cantidad de Panx1 es mayor en los ratones adultos como se muestra en las FIGURAS 16 B y 19 B. Por el contrario, la FIGURA 18 B muestra una tendencia a una mayor cantidad de Panx1 en los animales jóvenes.

Variables CA1	Grupo joven (2 a 3 meses) n:5		Grupo adulto (10 a 12 meses) n:5		P-value
	$\bar{x}$	SE	$\bar{x}$	SE	
Índice de densidad superficial	572,7	92,31	583,2	122,6	0,8016
Densidad integrada	3157	265,0	3172	388,8	0,9444
Índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1	0,3060	0,0140	0,2820	0,01655	0,3333

Tabla 2: Cuadro comparativo de la cantidad de inmunomarcaje de Panx1 en CA1 de hipocampo. Se muestra una comparación de los valores del índice de densidad superficial, densidad integrada e índice de la densidad de células positivas a Panx1, en CA1 por grupo etario. Los valores corresponden a valor promedio ± erros estándar, además del P-value de cada una de las variables.

Para la región de CA3, ninguna de las mediciones otorgó resultados estadísticamente significativos (índice de densidad superficial P= 0,3095; densidad integrada P= 0,6667 e índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1 P= 0,3095; TABLA 3). Sin embargo, existe una tendencia donde la cantidad de Panx1 medida a través de estas variables es mayor en los ratones adultos como se muestra en las FIGURAS 16 C, 18 C y 19 C.

Variables CA3	Grupo joven (2 a 3 meses) n:5		Grupo adulto (10 a 12 meses) n:5		P-value
	$\bar{x}$	SE	$\bar{x}$	SE	
Índice de densidad superficial	355,3	66,98	494,9	103,6	0,3095
Densidad integrada	8958	600,1	9522	870,8	0,6667
Índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1	0,7560	0,07118	0,8540	0,06306	0,3095

Tabla 3: Cuadro comparativo de la cantidad de inmunomarcaje de Panx1 en CA3 de hipocampo. Se muestra una comparación de los valores del índice de densidad superficial, densidad integrada e índice de la densidad de células positivas a Panx1, en CA3 por grupo etario. Los valores corresponden a valor promedio ± erros estándar, además del P-value de cada una de las variables.

Finalmente, en el caso del GD, ninguna de las mediciones mostró resultados estadísticamente significativos (índice de densidad superficial P= 0,2222; densidad integrada P= 0,6667 e índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1 P= 0,1508; TABLA 4). Sin embargo, existe una tendencia a mayores valores en los ratones adultos como se muestra en las FIGURAS 16 D, 18 D y 19 D.

Variables GD	Grupo joven (2 a 3 meses) n:5		Grupo adulto (10 a 12 meses) n:5		P-value
	$\bar{x}$	SE	$\bar{x}$	SE	
Índice de densidad superficial	687,9	105,2	964,8	148,7	0,2222
Densidad integrada	5766	732,1	6470	916,4	0,6667
Índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1	1,006	0,08858	1,204	0,09282	0,1508

Tabla 4: Cuadro comparativo de la cantidad de inmunomarcaje de Panx1 en GD de hipocampo. Se muestra una comparación de los valores del índice de densidad superficial, densidad integrada e índice de la densidad de células positivas a Panx1, en GD por grupo etario. Los valores corresponden a valor promedio ± erros estándar, además del P-value de cada una de las variables.

10.7.Comparación de la intensidad del inmunomarcaje de Panx1

Para completar el objetivo número 7, se comparó la intensidad del inmunomarcaje de Panx1 (densidad óptica), en CR, CA1, CA3 y GD (TABLA 5), entre los animales jóvenes y adultos.

Al realizar la comparación de la densidad óptica, ninguna de las mediciones en las diferentes estructuras entrego resultados estadísticamente significativos, CR (P= 0,0556), CA1 (P=0,9444), CA3 (P= 0,6667) y GD (P= 0,4127) (TABLA 5). Pese a esto existe una tendencia donde la intensidad de Panx1 es mayor en los ratones adultos como se muestra en la FIGURA 17.

Variables	Grupo joven (2 a 3 meses) n:5		Grupo adulto (10 a 12 meses) n:5		P-value
	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	
Densidad óptica (CR)	0,4444	0,02852	0,3599	0,02572	0,0556
Densidad óptica (CA1)	0,4611	0,04170	0,4409	0,05830	0,9444
Densidad óptica (CA3)	0,4747	0,04416	0,4373	0,05500	0,6667
Densidad óptica (GD)	0,4767	0,04025	0,4245	0,04549	0,4127

Tabla 5: Cuadro comparativo de la densidad óptica de Panx1 en la CR e hipocampo. Se muestra una comparación de la densidad óptica, en CR, CA1, CA3 y GD por grupo etario. Los valores corresponden a valor promedio ± erros estándar, además del P-value de cada una de las variables.

11. DISCUSION

11.1. Efecto del envejecimiento sobre la expresión de Panx1 en CR

La proteína Panx1 es una proteína que no solo permite la comunicación entre el medio interno y externo de la célula (5,32), también permite el paso a diferentes moléculas (5,17,21,23,44), las cuales cumplen distintas funciones dependiendo del órgano donde se encuentren. Existe evidencia que relaciona a la Panx1 con la regulación del SNC, esta tendría influencia tanto en la formación como en el desarrollo del mismo (38,39,64,66) y a su vez participaría en la modulación de funciones cognitivas importantes como son la memoria espacial (57) el aprendizaje (47) el reconocimiento de objetos y también en algunos de los mecanismos encargados de la plasticidad sináptica (LPD y LTD) (47,48,57). Por otro lado se ha demostrado que Panx1 exacerba los efectos adversos de diferentes condiciones patológicas en el SNC, como son por ejemplo las enfermedades neurodegenerativas y condiciones inflamatorias especificas (40,70–76,82,84).

Escogimos analizar la CR junto al hipocampo, debido a la relación que existe entre ellos, tanto estructural como también funcional, que determina su papel en procesos cognitivos superiores como la navegación espacial (55) evaluados a menudo en modelos animales a través de pruebas que asocian la memoria espacial y la memoria de reconocimiento. Estos mismos procesos han sido mostrados para ser modulados por la expresión de Panx1, en particular en el hipocampo de ratón (47,48,57), Sin embargo, a la fecha no existe evidencia de la expresión de Panx1 en la CR. Por otro lado, tanto el hipocampo como la CR han sido identificadas como unas de las estructuras más susceptibles frente al proceso del envejecimiento (49,62,85), por lo que nos hace inferir que los cambios sufridos por Panx1 con la edad, podrían visualizarse en estas estructuras.

Los resultados de nuestra investigación permitieron establecer y determinar la presencia de Panx1 en distintos grupos etarios de ratones, tanto en CR y las diferentes porciones del hipocampo (CA1, CA3 y GD). La presencia de Panx1 en estas estructuras concuerda con lo reportado en investigaciones anteriores, en donde se evaluó la presencia de Panx1 a un nivel de estructura más general, considerando la corteza cerebral como un todo sin hacer distinción de las distintas divisiones que conformaban esta estructura (5,6,9,11,35,48,51,86). A pesar de que nuestros resultados coinciden en cuanto a la localización tipográfica de Panx1 con todos los estudios publicados de Panx1, existe

controversia en la literatura en cuanto a la intensidad del inmunomarcaje de Panx1 a lo largo de la vida del animal.

En esta tesis hemos descrito un aumento del inmunomarcaje de Panx1 con la edad de los ratones, principalmente en las neuronas piramidales de la CR. Además, los resultados cualitativos presentaron una correlación con el índice de densidad superficial, donde el aumento de Panx1 resulta consistente con algunos estudios publicados (51), pero discordante con otros (6,48).

Si bien los resultados de las otras mediciones de cantidad e intensidad de inmunomarcaje (densidad integrada, Índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1 y densidad óptica) no presentaron resultados estadísticamente significativos, la cercanía de estos con el límite establecido para ser considerados significativos, además de la tendencia de los resultados a presentar un aumento de inmunomarcaje en los animales adultos, nos sugiere que para obtener diferencias significativas a futuro se requeriría un número mayor de animales en cada grupo etario. No obstante, esta investigación puede representar la primera descripción de la presencia de Panx1 en neuronas de la CR.

11.2.Efecto del envejecimiento sobre la expresión de Panx1 en el hipocampo

El hipocampo ha sido y sigue siendo un objetivo de estudio sumamente importante para distintas investigaciones, esto se debe a las diferentes funciones que regula durante desarrollo cognitivo (48,62,85,87,88), las interconexiones que presenta (53,87) y los cambios que experimenta durante el desarrollo (48,59,62,85,89). A estas evidencias se suman las investigaciones que relacionan el desarrollo del hipocampo con la expresión Panx1, las cuales señalan diferentes comportamientos en cuanto a los niveles de expresión de esta proteína en relación con la edad aumentando en ciertos casos (51) y disminuyendo su expresión en otros (6,48).

Directamente los resultados de nuestra investigación determinaron que no existen cambios de Panx1, estadísticamente significativos, en ninguna de las estructuras estudiadas del hipocampo (CA1, CA3 y GD), esto fue observado tanto en las mediciones de cantidad como también de intensidad del inmunomarcaje. Si bien los resultados fueron no significativos, observamos una tendencia a un aumento en el grupo de animales adultos, excepto en el Índice de la densidad de células inmunopositivas a

Panx1 en CA1, siendo consistente con la literatura (51) y discordante con otras investigaciones (6,48). Por su parte, en el caso del índice de la densidad de células inmunopositivas a Panx1 en CA1, estas mostraron una tendencia mayor en el grupo de animales jóvenes, consistente con investigaciones anteriores (6,48) y contrario con otras (51).

La falta de diferencias estadísticamente significativas en las distintas estruFcturas del hipocampo, en comparación con los resultados obtenidos en la CR, sumado a la mínima diferencia observada, podría deberse a la mayor sensibilidad de esta estructura a los efectos del envejecimientos en comparación a la CR (53,62,87,90) sin embargo se requieren estudios complementarios para afirmar esta observación.

Finalmente los resultados obtenidos en esta investigación complementan los resultados de investigaciones anteriores en las cuales demuestran que existe un tipo de relación entre el envejecimiento y la presencia de Panx1 (6,48,51). El problema de estas investigaciones surge cuando se comparan los métodos utilizados en las mismas. Todas muestran el uso de técnicas distintas para la evaluación y comparación de Panx1 entre los grupos etarios establecidos (northern blot, western blot e inmunofluorescencia). Sumado a esto existe una diferencia clave en todos los experimentos, pues la edad de los animales es diferente en cada una de estas investigaciones y no existe un consenso para determinar cuándo un animal es considerado viejo. Vogt et al. (grupos etarios que van desde embriones de 14 días hasta adultos de 12 meses)(6), Ardiles et al. (grupos etarios que van desde animales de 1 mes hasta 12 meses)(48) y Mawhinney et al. (grupos etarios se dividen en animales de 3 y 18 meses) (51). Nuestros datos tuvieron una fuerte relación con los obtenidos por Mawhinney et al (51) en los cuales se determinó que existe un aumento de la expresión de Panx1 en los animales adultos, siendo en su caso animales de 18 meses de edad(animal considerado viejo bajo los estándares de investigación (91)). La semejanza de nuestros resultados y la obtención de resultados significativos en la CR, nos permite sugerir que tanto un aumento de la edad o el agregar un tercer grupo etario más longevo al estudio nos permitiría complementar aún más los objetivos de esta investigación. Al mismo tiempo la contradicción de nuestros resultados al compararlos con otras investigaciones (6,48) donde se observa una disminución de la Panx1en los grupos de animales adultos, pese a las similitudes entre las edades de los animales utilizados, puede deberse a la evaluación a un nivel más general de las estructuras en estas investigaciones.

Sumado a estos hallazgos y debido a las interconexiones existentes entre la CR y otras estructuras cerebrales como el tálamo (92) y la corteza visual, que contribuyen también a la navegación espacial, sería interesante verificar si el proceso de envejecimiento actúa sobre la expresión de Panx1 en estas estructuras y soporta de esta manera el declive cognitivo asociado a la memoria espacial observado durante el envejecimiento. En efecto, la observación de la mayor presencia de Panx1 en la corteza retroesplenial de animales adultos en comparación a los animales jóvenes, que no se observa en el hipocampo de estos animales, podría implicar por un lado un menor impacto del envejecimiento en términos de la expresión de Panx1 en esta estructura cortical y por otro un mecanismo que preserva la conectividad de la corteza retroesplenial con el hipocampo, de manera de que la presencia de Panx1 puede ser importante para la información que comparten estas dos estructuras. Esta observación puede ser relevante para el funcionamiento de este circuito, en particular en relación con la navegación y memoria espacial, lo que podría significar un mecanismo para preservar esta función durante el envejecimiento

12. CONCLUSIÓN

- A partir del estudio inmunohistoquímico, se logró describir y comparar la localización de Panx1 en diferentes estructuras celulares y compartimientos sub-celulares de la CR y las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo. Al comparar las distintas observaciones estas sugieren un aumento de la presencia de Panx1 en el grupo de ratones adultos en todas las estructuras cerebrales.
- Mediante la evaluación a través de la escala de grises (*gray value*) pudimos determinar que existe un aumento significativo de la cantidad de presencia de Panx1 en la CR en animales adultos a partir de la medición y evaluación de la variable índice de densidad superficial. No obstante, las estructuras del hipocampo no presentaron resultados estadísticamente significativos.
- Ninguna de las estructuras presentó resultados estadísticamente significativos, en relación a la medición de: la densidad óptica, índice de células positivas en un área determinada y densidad integrada. Pese a esto la CR fue la única estructura cerca de obtener resultados estadísticamente significativos.
- La comparación de los resultados de la intensidad de la señal de Panx1 entre los cerebros de ratones silvestres C57bl/6 jóvenes y adultos, ninguna de las estructuras presentó diferencias estadísticamente significativas, pese a esto los resultados obtenidos en la CR sugieren un aumento de la intensidad de esta proteína en animales adultos.
- La variación en el patrón de distribución de la expresión de la proteína Panx1 entre los cerebros de ratones silvestres C57bl/6 jóvenes y adultos en la porción retroesplenial de la corteza cerebral representa la primera descripción de la presencia de Panx1 en esta estructura.

13. FACTIBILIDAD.

La factibilidad de este proyecto fue posible gracias a proyecto Fondecyt Iniciación Nº11150776, PAI Nº79150045 y la Beca de apoyo otorgada por la Universidad Valparaíso con el registro DIUV CIDI número 8 del Centro Interdisciplinario de Estudios en Salud (CIESAL).

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Yeung AK, Patil CS. Pannexin-1 in the CNS : Emerging concepts in health and disease. 2020;(March):1–18.

2. Panchina Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules [2]. Curr Biol. 2000;10(13):473–4.

3. Yen MR, Saier MH. Gap junctional proteins of animals: The innexin/pannexin superfamily. Prog Biophys Mol Biol. 2007;94(1–2):5–14.

4. Penuela S, Bhalla R, Nag K, Laird DW. Glycosylation Regulates Pannexin Intermixing and Cellular Localization. Gilmore R, editor. Mol Biol Cell [Internet]. 15 de octubre de 2009;20(20):4313–23. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2762227/

5. Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2003;100(23):13644–9. Disponible en: http://www.pnas.org/content/100/23/13644.abstract

6. Vogt A, Hormuzdi SG, Monyer H. Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. Mol Brain Res. 2005;141(1):113–20.

7. Zoidl G, Petrasch-Parwez E, Ray A, Meier C, Bunse S, Habbes HW, et al. Localization of the pannexin1 protein at postsynaptic sites in the cerebral cortex and hippocampus. Neuroscience. 2007;146(1):9–16.

8. Huang Y, Grinspan JB, Abrams CK, Scherer SS. Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional gap junctions. Glia [Internet]. 1 de enero de 2007;55(1):46–56. Disponible en: https://doi.org/10.1002/glia.20435

9. Ray A, Zoidl G, Weickert S, Wahle P, Dermietzel R. Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. 2005;21(March):3277–90.

10. Swayne LA, Sorbara CD, Bennett SAL. Pannexin 2 is expressed by postnatal hippocampal neural progenitors and modulates neuronal commitment. J Biol

Chem. 2010;285(32):24977–86.

11. Penuela S, Laird DW. The cellular life of pannexins. Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal. 2012;1(5):621–32.

12. To L, Editor THE. Cryo-EM structure of human heptameric Pannexin 1 channel. 2020;1–3.

13. Deng Z, He Z, Maksaev G, Bitter RM, Rau M, Fitzpatrick JAJ, et al. Cryo-EM structures of the ATP release channel pannexin 1. 2020;27(April).

14. To L, Editor THE. Structural basis for gating mechanism of Pannexin 1 channel. 2020;(March):2–4.

15. Michalski K, Syrjanen JL, Henze E, Kumpf J. The Cryo-EM structure of pannexin 1 reveals unique motifs for ion selection and inhibition. 2020;1–14.

16. Penuela S, Bhalla R, Gong X-Q, Cowan KN, Celetti SJ, Cowan BJ, et al. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. J Cell Sci [Internet]. 1 de noviembre de 2007;120(21):3772 LP – 3783. Disponible en: http://jcs.biologists.org/content/120/21/3772.abstract

17. MacVicar BA, Thompson RJ. Non-junction functions of pannexin-1 channels. Trends Neurosci [Internet]. 2010;33(2):93–102. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2009.11.007

18. Huang Y, Grinspan JB, Abrams CK, Scherer SS. Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional gap junctions. Glia [Internet]. 2006;55(1):46–56. Disponible en: https://doi.org/10.1002/glia.20435

19. Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, et al. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. Channels [Internet]. 5 de abril de 2011;5(3):193–7. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3704572/

20. Scemes E, Spray DC, Meda P. Connexins, pannexins, innexins: Novel roles of “hemi-channels”. Pflugers Arch Eur J Physiol. 2009;457(6):1207–26.

21. Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. FEBS Lett. 2004;572(1–3):65–8.

22. Lohman AW, Isakson BE. Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. FEBS Lett [Internet]. 17 de abril de 2014;588(8):1379–88. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3996918/

23. Seminario-Vidal L, Okada SF, Sesma JI, Kreda SM, Van Heusden CA, Zhu Y, et al. Rho signaling regulates pannexin 1-mediated ATP release from airway epithelia. J Biol Chem. 2011;286(30):26277–86.

24. Sandilos JK, Chiu Y-H, Chekeni FB, Armstrong AJ, Walk SF, Ravichandran KS, et al. Pannexin 1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region. J Biol Chem [Internet]. 2012/02/06. 30 de marzo de 2012;287(14):11303–11. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311983

25. Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. FEBS Lett. 2006;580(1):239–44.

26. Silverman WR, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E, et al. The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. J Biol Chem [Internet]. 2009/05/05. 3 de julio de 2009;284(27):18143–51. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19416975

27. Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, et al. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. Sci Signal. 2008;1(39):3–8.

28. Reigada D, Lu W, Zhang M, Mitchell CH. Elevated pressure triggers a physiological release of ATP from the retina: Possible role for pannexin hemichannels. Neuroscience [Internet]. 2008;157(2):396–404. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.08.036

29. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1β release by the ATP-gated P2X7 receptor. EMBO J [Internet].

2006/10/12. 1 de noviembre de 2006;25(21):5071–82. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17036048

30. Qiu F, Dahl G. A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. Am J Physiol Physiol [Internet]. 2008/10/22. febrero de 2008;296(2):C250–5. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945939

31. Wang J, Ma M, Locovei S, Keane RW, Dahl G. Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides: size matters. Am J Physiol Physiol [Internet]. 1 de septiembre de 2007;293(3):C1112–9. Disponible en: https://doi.org/10.1152/ajpcell.00097.2007

32. Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R. Cell-Cell Communication Beyond Connexins: The Pannexin Channels. Physiology [Internet]. 1 de abril de 2006;21(2):103–14. Disponible en: https://doi.org/10.1152/physiol.00048.2005

33. Dando R, Roper SD. Cell-to-cell communication in intact taste buds through ATP signalling from pannexin 1 gap junction hemichannels. J Physiol [Internet]. 2009/11/02. 15 de diciembre de 2009;587(Pt 24):5899–906. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19884319

34. Penuela S, Gehi R, Laird DW. The biochemistry and function of pannexin channels. Biochim Biophys Acta - Biomembr [Internet]. 2013;1828(1):15–22. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.017

35. Cone AC, Ambrosi C, Scemes E, Martone ME, Sosinsky GE. A comparative antibody analysis of pannexin1 expression in four rat brain regions reveals varying subcellular localizations. Front Pharmacol. 2013;4 FEB(February):1–19.

36. Talaverón R, Fernández P, Escamilla R, Pastor AM, Matarredona ER, Sáez JC. Neural progenitor cells isolated from the subventricular zone present hemichannel activity and form functional gap junctions with glial cells. Front Cell Neurosci [Internet]. 2015;9(October):1–10. Disponible en: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00411/abstract

37. Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin Y V., Baranova A V., et al. Functional implications of calcium permeability of the channel formed

by pannexin 1. J Cell Biol. 2006;174(4):535–46.

38. Wicki-Stordeur LE, Dzugalo AD, Swansburg RM, Suits JM, Swayne LA. Pannexin 1 regulates postnatal neural stem and progenitor cell proliferation. Neural Dev [Internet]. 2012;7(1):11. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22458943

39. Wicki-Stordeur LE, Swayne LA. Panx1 regulates neural stem and progenitor cell behaviours associated with cytoskeletal dynamics and interacts with multiple cytoskeletal elements. Cell Commun Signal. 2013;11(1):1–8.

40. Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, Rungta RL, Hines DJ, Beazely MA, et al. Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. Science (80-). 2008;322(5907):1555–9.

41. Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. FEBS Lett [Internet]. 9 de enero de 2006;580(1):239–44. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.004

42. Celetti SJ, Cowan KN, Penuela S, Shao Q, Churko J, Laird DW. Implications of pannexin 1 and pannexin 3 for keratinocyte differentiation. J Cell Sci [Internet]. 15 de abril de 2010;123(8):1363–72. Disponible en: http://jcs.biologists.org/content/123/8/1363.abstract

43. Dahl G, Locovei S. Pannexin: To gap or not to gap, is that a question? IUBMB Life [Internet]. 1 de julio de 2006;58(7):409–19. Disponible en: https://doi.org/10.1080/15216540600794526

44. Billaud M, Lohman AW, Straub AC, Looft-Wilson R, Johnstone SR, Araj CA, et al. Pannexin1 regulates α1-adrenergic receptor- mediated vasoconstriction. Circ Res. 2011;109(1):80–5.

45. Cavaliere F, Donno C, Dâ€™Ambrosi N. Purinergic signaling: a common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation. Front Cell Neurosci [Internet]. 2015;9(June):1–8. Disponible en: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00211/abstract

46. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER,

et al. Pannexin 1 channels mediate ‘find-me’ signal release and membrane permeability during apoptosis. Nature [Internet]. 13 de octubre de 2010;467:863. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nature09413

47. Prochnow N, Abdulazim A, Kurtenbach S, Wildförster V, Dvoriantchikova G, Hanske J, et al. Pannexin1 Stabilizes Synaptic Plasticity and Is Needed for Learning. PLoS One. 2012;7(12).

48. Ardiles AO, Flores-MuÃ±oz C, Toro-Ayala G, CÃ¡rdenas AM, Palacios AG, MuÃ±oz P, et al. Pannexin 1 regulates bidirectional hippocampal synaptic plasticity in adult mice. Front Cell Neurosci [Internet]. 2014;8(October):1–11. Disponible en: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00326/abstract

49. Yankner BA, Lu T, Loerch P. The Aging Brain. Annu Rev Pathol Mech Dis [Internet]. 30 de enero de 2008;3(1):41–66. Disponible en: https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.092044

50. Jack Jr CR, Shiung MM, Weigand SD, O’Brien PC, Gunter JL, Boeve BF, et al. Brain atrophy rates predict subsequent clinical conversion in normal elderly and amnestic MCI. Neurology [Internet]. 25 de octubre de 2005;65(8):1227–31. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16247049

51. Mawhinney LJ, de Rivero Vaccari JP, Dale GA, Keane RW, Bramlett HM. Heightened inflammasome activation is linked to age-related cognitive impairment in Fischer 344 rats. BMC Neurosci [Internet]. 1 de diciembre de 2011;12:123. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133203

52. Judaš M, Cepanec M, Sedmak G. Brodmann’s map of the human cerebral cortex - Or Brodmann’s maps? Transl Neurosci. 2012;3(1):67–74.

53. Wyss JM, Groen T Van. Connections Between the Retroesplenial Cortex and the Hippocampal Formation in the Rat: A Review. Hippocampus. 1992;2(1):1–12.

54. Todd TP, Bucci DJ. Retroesplenial Cortex and Long-Term Memory: Molecules to Behavior. Medina JH, editor. Neural Plast [Internet]. 2015;2015:414173. Disponible en: https://doi.org/10.1155/2015/414173

55. Mitchell AS, Czajkowski R, Zhang N, Jeffery K, Nelson AJD. Retroesplenial cortex and its role in spatial cognition. Brain Neurosci Adv [Internet]. 19 de marzo de 2018;2:2398212818757098–2398212818757098. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30221204

56. Todd TP, Fournier DI, Bucci DJ. Retroesplenial cortex and its role in cue-specific learning and memory. Neurosci Biobehav Rev [Internet]. 2019;107:713–28. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763418306742

57. Gajardo I, Salazar CS, Lopez-Espíndola D, Estay C, Flores-Muñoz C, Elgueta C, et al. Lack of Pannexin 1 Alters Synaptic GluN2 Subunit Composition and Spatial Reversal Learning in Mice. Front Mol Neurosci [Internet]. 10 de abril de 2018;11:114. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29692709

58. Sunkin SM, Ng L, Lau C, Dolbeare T, Gilbert TL, Thompson CL, et al. Allen Brain Atlas: an integrated spatio-temporal portal for exploring the central nervous system. Nucleic Acids Res [Internet]. 2012/11/28. enero de 2013;41(Database issue):D996–1008. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23193282

59. Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. Neuroscience [Internet]. 2015;309(August):1–16. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084

60. Burke SN, Barnes CA. Neural plasticity in the ageing brain. Nat Rev Neurosci [Internet]. 1 de enero de 2006;7:30. Disponible en: https://doi.org/10.1038/nrn1809

61. Citri A, Malenka RC. Synaptic Plasticity : Multiple Forms , Functions , and Mechanisms. 2008;18–41.

62. Miller DB, O'Callaghan JP. Aging, stress and the hippocampus. Ageing Res Rev [Internet]. 2005;4(2):123–40. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163705000036

63. Moser EI. The multi-laned hippocampus. Nat Publ Gr [Internet]. 2011;14(4):407–8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nn.2783

64. Sanchez-Arias JC, Liu M, Choi CSW, Ebert SN, Brown CE, Swayne LA. Pannexin 1 regulates network ensembles and dendritic spine development in cortical neurons. eneuro [Internet]. 22 de mayo de 2019;ENEURO.0503-18.2019. Disponible en: http://www.eneuro.org/content/early/2019/05/22/ENEURO.0503-18.2019.abstract

65. Flores-Muñoz C, Gómez B, Mery E, Mujica P, Gajardo I, Córdova C, et al. Acute Pannexin 1 Blockade Mitigates Early Synaptic Plasticity Defects in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. Front Cell Neurosci [Internet]. 2020;14:46. Disponible en: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2020.00046

66. Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. Structure and Function of Dendritic Spines. Annu Rev Physiol [Internet]. 1 de marzo de 2002;64(1):313–53. Disponible en: https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008

67. Morris RGM. Long-term potentiation and memory. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci [Internet]. 29 de abril de 2003;358(1432):643–7. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740109

68. Shestopalov VI, Slepak VZ. Molecular pathways of pannexin1-mediated neurotoxicity. Front Physiol [Internet]. 11 de febrero de 2014;5:23. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24575045

69. Decrock E, De Bock M, Wang N, Bultynck G, Giaume C, Naus CC, et al. Connexin and pannexin signaling pathways, an architectural blueprint for CNS physiology and pathology? Cell Mol Life Sci. 2015;72(15):2823–51.

70. Lopatář J, Dale N, Frenguelli BG. Pannexin-1-mediated ATP release from area CA3 drives mGlu5-dependent neuronal oscillations. Neuropharmacology [Internet]. 2015;93:219–28. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390815000301

71. Weilinger NL, Tang PL, Thompson RJ. Anoxia-Induced NMDA Receptor Activation Opens Pannexin Channels via Src Family Kinases. J Neurosci [Internet]. 5 de septiembre de 2012;32(36):12579 LP – 12588. Disponible en: http://www.jneurosci.org/content/32/36/12579.abstract

72. Weilinger NL, Maslieieva V, Bialecki J, Sridharan SS, Tang PL, Thompson RJ. Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. Acta Pharmacol Sin [Internet]. 2012/08/06. enero de 2013;34(1):39–48. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22864302

73. Aquilino MS, Whyte-Fagundes P, Zoidl G, Carlen PL. Pannexin-1 channels in epilepsy. Neurosci Lett [Internet]. 2019;695:71–5. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394017307383

74. Li S, Zang Z, He J, Chen X, Yu S, Pei Y, et al. Expression of pannexin 1 and 2 in cortical lesions from intractable epilepsy patients with focal cortical dysplasia. Oncotarget [Internet]. 24 de enero de 2017;8(4):6883–95. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28036289

75. Hainz N, Wolf S, Tschernig T, Meier C. Probenecid Application Prevents Clinical Symptoms and Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. 2015;1–6.

76. Hainz N, Wolf S, Beck A, Wagenpfeil S, Tschernig T. Probenecid arrests the progression of pronounced clinical symptoms in a mouse model of multiple sclerosis. Sci Rep [Internet]. 2017;1–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-17517-5

77. Dvoriantchikova G, Ivanov D, Barakat D, Grinberg A, Wen R, Slepak VZ, et al. Genetic Ablation of Pannexin1 Protects Retinal Neurons from Ischemic Injury. PLoS One [Internet]. 23 de febrero de 2012;7(2):e31991. Disponible en: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031991

78. Freitas-andrade M, Bechberger JF, Macvicar BA, Viau V, Naus CC. Pannexin1 knockout and blockade reduces ischemic stroke injury in female , but not in male mice. 2017;8(23):36973–83.

79. Zhang Z, Lei Y, Yan C, Mei X, Jiang T, Ma Z, et al. Probenecid Relieves Cerebral Dysfunction of Sepsis by Inhibiting Pannexin 1-Dependent ATP Release. 2019;

80. Wei R, Wang J, Xu Y, Yin B, He F, Du Y, et al. Probenecid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting lysosomal and inflammatory

damage in rats. Neuroscience [Internet]. 2015;301:168–77. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452215005217

81. Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, et al. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. J Neurochem [Internet]. 2011/03/07. septiembre de 2011;118(5):826–40. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21294731

82. Orellana JA, Shoji KF, Abudara V, Ezan P, Amigou E, Sáez PJ, et al. Amyloid β-Induced Death in Neurons Involves Glial and Neuronal Hemichannels. J Neurosci [Internet]. 30 de marzo de 2011;31(13):4962 LP – 4977. Disponible en: http://www.jneurosci.org/content/31/13/4962.abstract

83. Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sampel Size Determination. Ilar J. 2002;43(4):207–13.

84. Orellana JA, Retamal MA, Moraga-Amaro R, Stehberg J. Role of Astroglial Hemichannels and Pannexons in Memory and Neurodegenerative Diseases. Front Integr Neurosci [Internet]. 20 de julio de 2016;10:26. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27489539

85. Barnes CA, McNaughton BL. An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. Behav Neurosci. 1985;99(6):1040–8.

86. Penuela S, Gehi R, Laird DW. The biochemistry and function of pannexin channels. Biochim Biophys Acta - Biomembr [Internet]. 2013;1828(1):15–22. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.017

87. Preston AR, Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. Curr Biol [Internet]. 9 de septiembre de 2013;23(17):R764–73. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24028960

88. Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature [Internet]. 1982;297(5868):681–3. Disponible en: https://doi.org/10.1038/297681a0

89. Shetty AK, Hattiangady B, Rao MS, Shuai B. Neurogenesis Response of Middle-Aged Hippocampus to Acute Seizure Activity. PLoS One [Internet]. 17 de agosto de 2012;7(8):e43286. Disponible en: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043286

90. Samson RD, Barnes CA. Impact of aging brain circuits on cognition. Eur J Neurosci [Internet]. junio de 2013;37(12):1903–15. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23773059

91. Flurkey K, Currer J, Harrison D. The Mouse in Aging Research. Mouse Biomed Res. 31 de diciembre de 2007;3.

92. Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA. What does the retroesplenial cortex do? Nat Rev Neurosci [Internet]. 2009;10(11):792–802. Disponible en: https://doi.org/10.1038/nrn2733

15. ANEXOS

ANEXO Nº 1: ANIMALES

Código asignado	Edad	Género
WT-C1	2 meses	Macho
WT-C2	2 meses	Macho
WT-R2	12 meses	Macho
WT-R3	3 meses	Macho
WT-R4	3 meses	Macho
WT-R5	10 meses	Hembra
WT-R7	10 meses	Hembra
WT-R9	3 meses	Macho
WT-R10	12 meses	Hembra
WT-R11	12 meses	Hembra

ANEXO Nº2: ANTICUERPOS UTILIZADOS

TABLA DEL ANTICUERPO: nos especifica el anticuerpo utilizado, la marca del mismo y la ficha técnica del anticuerpo

anticuerpo	**símbolo**	**marca**	**Epítope**	**Isotipo y origen**	**dilución**	**Anticuerpo Secundario**
Anti-Pannexin-1/PANX1 Antibody ABN242	**Panx1**	**Sigma-Aldrich**	**Cadena c-terminal**	**IgG Anticuerpo policlonal de conejo**	**1:200 (solución de incubación)**	**IgG de cabra, anti-conejo. Conjugado en HRP 1:250**

ANEXO Nº3: PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

DÍA Nº1:

1) DESHIDRATACIÓN

- Alcohol 50% 30 min
- Alcohol 70% 30 min
- Alcohol 80% 30 min
- Alcohol 95% I 30 min
- Alcohol 95% II 30 min
- Alcohol 100% I 30 min
- Alcohol 100% II 30 min
- Alcohol 100% III 30 min

2) ACLARAMIENTO

- Xilol I 15 min
- Xilol II 15 min
- Xilol III toda la noche

DÍA Nº2:

3) IMPREGNACIÓN

- Parafina I 30 min
- Parafina II 30 min
- Parafina III 30 min

ANEXO Nº4: PROTOCOLO HEMATOXILINA – EOSINA

1) DESPARAFINACIÓN:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)
- Xilol III (10 min)

2) REHIDRATACIÓN:

- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol 95% (5 min)
- Alcohol 70% (5 min)

3) lavado en agua destilada durante (5 min).

4) coloración con hematoxilina de harris (30 seg)

5) viraje en agua corriente (10 min)

6) preparación para la eosina alcohólica en alcohol 95% (5 min)

7) eosina alcohólica (4 seg) (dipping)

8) DESHIDRATACIÓN:

- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol /Xilol (5min)

9) ACLARAMIENTO:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)

10) Cubrir con medio de montaje Entellan.

ANEXO Nº5: PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA

DÍA Nº1

1) Desparafinación:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)
- Xilol III (10 min)

2) Rehidratación:

- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol 95% (5 min)
- Alcohol 70% (5 min)

3) Lavado en agua destilada (5 min)

4) Recuperación antigénica

- Precalentar la vaporera (5 min)
- Precalentar el buffer citrato (PH: 6.0) en la vaporera (20 min)
- Placas en el buffer citrato (PH: 6.0) en vaporera (20 min)
- Enfriar placas (25 min)

5) 3 lavados de agua destilada (5 min C/U)

6) Soluciones de bloqueo:

- Bloqueo de peroxidasa endógena con h2o2 (30%) al 3% en pbs. a temperatura ambiente, durante (30 min).
- 3 cambios en PBS 1X, (5 min C/U).
- Bloqueo Cas – Block a temperatura ambiente durante (30 min).
- Bloqueo mediante solución de incubación (SI) a temperatura ambiente durante (60 min)
    - Preparación solución de incubación (solución de 30 ml):
        - Suero de cabra 5% = 1.5 ml.
        - Tritón x100 0,1% = 30 µl.
        - BSA 4% = 1.2 grs.
        - PBS 1X = 30 ml – 1,530 ml = 28,470 ml.

7) Incubación del anticuerpo primario:

Anticuerpo en la concentración apropiada de disuelto en SI, en oscuridad durante (toda la noche a 4º C.)

DÍA Nº 2

8) 3 cambios en PBS, (5 min c/u).

9) Incubación del anticuerpo secundario:

- Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con HRP, diluido 1:250 en SI, a temperatura ambiente en oscuridad Durante (1 hora).

10) 3 cambios en PBS, 5 min C/u.

11) Revelado cromogénico con DAB, en oscuridad durante (5 min)

- Preparación DAB (solución 5 ml)
  - 0.5 ml solución madre DAB
  - 0.5 ml PBS 10X
  - 4 ml agua destilada
  - Al momento de uso agregar 1,5 µl de H_2O_2 30% .

12) Lavar en agua destilada durante 5 min.

13) Contraste nuclear:

- Teñir brevemente con hematoxilina. (30 seg)
- Virar hematoxilina en agua corriente durante 10 min.

14) Deshidratación:

- Alcohol 95% (5 min)
- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol/Xilol (5 min)

15) Aclaramiento:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)
-

16) Cubrir con medio de montaje Entellan.