



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN
BIOLOGÍA O QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN POR VOLTAJE DE
CANALES DE PANEXINA-1 EN CÉLULAS GANGLIONARES DE
RETINA DE RATÓN**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA**

JOAQUÍN VALDÉS BIZE

**DIRECTOR
DR. OLIVER SCHMACHTENBERG**

Valparaíso, Chile

2013

Agradecimientos

Agradezco a mi profesor tutor Oliver Schmachtenberg por darme la posibilidad de iniciar mi etapa de científico en un laboratorio donde he participado en buenas discusiones y he conocido grandes personas. También le agradezco por las correcciones al manuscrito y por darse el tiempo de enseñar.

Agradezco a los actuales miembros del Laboratorio de Fisiología Sensorial: Alex Vielma, por toda la ayuda con el diseño experimental y las correcciones al manuscrito. A Jesús Olivares, por esforzarse por incluirme en el laboratorio, iniciarme en la vida científica y todo el resto de consejos sobre la vida. A Adolfo Agurto, por correcciones al manuscrito y ser un aporte constante en las discusiones en el laboratorio. A Daniela Ponce, por tomar el proyecto del sudor humano y continuar con los experimentos. También agradezco a los antiguos miembros del laboratorio: Alejandra Bazáes y Daniel Tapia por también por toda el apoyo en mi primera etapa en el laboratorio.

Agradezco a Victoria Devia por tomarse el tiempo para ayudarme con las inmunos y las fotografías en el confocal.

Agradezco también toda las personas de otros laboratorios que de alguna forma ayudaron a desarrollar esta tesis: A Alvaro Ardiles, por permitirme usar los ratones y facilitar los anticuerpos. A Jaime Maripillán por la ayuda con los cultivos de células HeLa. A Carolina Flores por estar disponible para preguntas y facilitar los anticuerpos. A Oscar Jara por hacerme las primeras clases de patch clamp.

Agradezco a los profesores de mi comisión: Eduardo Couve y Agustín Martínez por abrir las puertas de sus laboratorios y estar disponibles para resolver dudas.

Por último agradezco a toda mi familia por quererme tanto y estar siempre disponibles para conversar y guiarme en la vida.

Resumen

Las panexinas son una familia de proteínas de tres miembros descubiertas recientemente que forman canales de membrana. Aunque son estructuralmente similares a las conexinas se diferencian de estas al no compartir homología en sus secuencias. En varios tipos celulares, se ha descubierto que la Panexina-1 (Panx1) cumple funciones de mecanosensor, liberación de ATP, entre otras. Al demostrarse que están asociados a receptores P2X₇ se ha relacionado la actividad de los canales de Panx1 con la formación de complejos proteicos asociados a respuestas inmunológicas. En la retina se ha demostrado una marcada expresión de Panx1 en la mayoría de sus capas, en particular en células ganglionares de la retina (CGR) donde se han relacionado con procesos patofisiológicos asociados con isquemia y glaucoma. En esta tesis, se propuso estudiar la expresión de Panx1 mediante inmunomarcaje con microscopía confocal y su función en la modulación de respuestas eléctricas en CGR. Se utilizó un protocolo propuesto de voltage clamp que por medio de rampas preconditionantes permitiría diferenciar corrientes de Panx1. Como controles para la inmunohistoquímica de retina se usaron ratones KO de Panx1. Para los registros electrofisiológicos se utilizaron ratones WT, bloqueadores de canales de Panx1 (carbenoxelona 5 μ M y probenecida 200 μ M) y células HeLa transfectadas con Panx1 como controles positivos. En la inmunohistoquímica se observó una marcación específica de Panx1 en la retina de ratones WT en la capa de células ganglionares (CCG) y la capa plexiforme interna (CPI). De manera controversial, se observó marcación específica de Panx1 en el ratón KO en las mismas capas del WT. Esto se puede atribuir a que la línea del ratón KO presenta un fenotipo hipomórfico de Panx1 (aprox. 50% de expresión) y no un KO global.

En células HeLa y CGR el protocolo de voltage clamp no permitió observar corrientes específicas de Panx1. Sin embargo, al aplicar los bloqueadores de Panx1, se observaron leves variaciones en las corrientes evocadas a potenciales despolarizados en células HeLa y diferencias significativas solo en algunas condiciones al registrar CGR.

En conclusión, los resultados de esta tesis indican que existe expresión de Panx1 en capas internas de la retina y que existe una leve modulación mediada por los canales de Panx1 de las respuestas eléctricas de CGR.

Contenido

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	3
Lista de Figuras	5
Lista de Tablas.....	6
Introducción	7
Comunicación celular.	7
Panexina-1: Descubrimiento, expresión y funciones.....	8
Expresión y funciones conocidas de la Panx1 en la retina.....	10
Hipótesis	14
Objetivo General.....	14
Objetivos específicos	14
Materiales y métodos.....	15
Cultivo de células HeLa Panx1 YFP.....	15
Animales	15
Preparación de la retina	16
Electrofisiología.....	18
Inmunohistoquímica de retina	21
Análisis	23
Resultados.....	24
Inmunohistoquímica	24
Registros electrofisiológicos en células HeLa Panx1 YFP.	26
Registros electrofisiológicos en células ganglionares de la retina.	34
Discusión	41
Inmunohistoquímica en retina	41
Electrofisiología en células HeLa Panx1 YFP.....	42
Electrofisiología en células ganglionares de la retina.....	43
Conclusión	46
Referencias	47
Anexos	53

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema del protocolo propuesto para diferenciar las corrientes de Panx1.....	20
Figura 2. Inmunoquímica realizada en retinas de ratón C56 BL/6 WT y KO de Panx1, y en una rata Sprague-Dawley.	25
Figura 3. Registros en 7 células HeLa Panx1 YFP.....	28
Figura 4. Registros en 3 células HeLa Panx1 YFP.....	30
Figura 5. Promedio de los registros en 10 células HeLa Panx1 YFP.....	33
Figura 6. Registros en 3 CGR con solución extracelular tamponada con HEPES y solución intracelular sin bloqueadores.	36
Figura 7. Registros en 10 CGR de 5 ratones C57 BL/6 en solución extracelular tamponada con carbonato y con bloqueadores de Kv en la solución intracelular.....	38

Lista de Tablas

Tabla 1. Composición PBS.....	15
Tabla 2. Composición solución intracelular (SIC).	16
Tabla 3. Composición solución extracelular (SEC).	17
Tabla 4. Composición solución extracelular con HEPES como tampón.....	17
Tabla 5. Composición solución intracelular con bloqueadores de canales de potasio.	20
Tabla 6. Diferencia normalizada en 7 células HeLa Panx1 YFP.	27
Tabla 7. Diferencia normalizada en 3 células HeLa Panx1 YFP	30
Tabla 8. Diferencia normalizada en 10 células HeLa Panx1 YFP.	32
Tabla 9. Análisis de 3 registros en solución tamponada con HEPES.....	37
Tabla 10. Análisis de 10 registros en solución extracelular tamponeada con carbonato y con bloqueadores de Kv en la solución interna.	40

Introducción

Comunicación celular.

La comunicación celular es una característica fundamental de organismos multicelulares, permitiendo por medio de moléculas señalizadores regular y coordinar la actividad de células con distintos motivos (e.g. respuesta inmune, mantención de la homeostasis). Estas moléculas señalizadores pueden ser liberadas al medio extracelular por canales presentes en la membrana plasmática de las células y pueden generar una respuesta en la misma célula donde son liberadas (señalización autocrina), en células cercanas del mismo tejido (señalización paracrina) o en células más alejadas (señalización endocrina).

Paralelamente, moléculas señalizadoras pueden ser transportadas a células adyacentes por conexiones intercelulares llamadas uniones en hendidura (en inglés: gap junctions, GJ). En vertebrados las GJ están formadas por una familia de proteínas llamadas conexinas (Cxs). Las Cxs están formadas por cuatro dominios transmembrana, dos *loops* extracelulares, un *loop* intracelular y tienen sus regiones terminales amino y carboxilo en el citoplasma (Matsuuchi y Naus, 2013). Seis de estas proteínas forman un hemicanal y si se ensamblan dos hemicanales de células adyacentes se forma la conexión intercelular. Las GJ son permeables a iones metabolitos de hasta 1 kDa (Nielsen et al., 2012). De mayor importancia en el sistema nervioso es su permeabilidad a IP_3 y Ca^{2+} permitiéndoles formar sinapsis eléctricas que están involucradas en la propagación de ondas de Ca^{2+} y en la sincronización neuronal (Saez et al., 1989; Bennett and Zukin, 2004).

Los hemicanales de Cxs pueden ser abiertos por una baja concentración de Ca^{2+} extracelular y cerrados por La^{3+} , y varios bloqueadores de GJ como octanol, heptanol, carboxelona, entre otros. Algunas de las funciones de los hemicanales de Cxs son regular el volumen celular y participar en una retroalimentación negativa entre células horizontales y conos en la retina de vertebrados. (Kamermans et al., 2001; Saez et al., 2003; Sáez et al., 2005; Bennett et al., 2012; Vroman et al., 2013).

Panexina-1: Descubrimiento, expresión y funciones.

En invertebrados existe una familia de proteínas formadora de GJ que no comparte homología con las Cxs, las que son llamadas inexinas. Panchin y cols. (2000) buscando secuencias homólogas con las inexinas en el genoma humano identificaron una familia formada por tres proteínas y las llamaron panexinas, las que se abrevian como Panx1, Panx2 y Panx3 (Panchin et al., 2000; Panchin, 2005; Penuela et al., 2013). Se predice que las panexinas y las inexinas comparten la topología estructural de las Cxs aunque no tengan homología en sus secuencias (Barbe et al., 2006; Sosinsky et al., 2011). Boassa y cols. (2007) demostraron: (1) que la proteína Panx1 está glicosilada en el residuo Asn-254 de uno de sus *loops* extracelulares; (2) que la glicosilación es un paso importante para que la proteína realice un correcto tráfico celular; (3) que prevenir la glicosilación induce retención en el retículo endoplásmico e inhibe expresión de Panx1 en la superficie de la célula; y (4) que el canal de Panx1 es formado por un hexámero de Panx1.

Bruzzone y cols. (2003) expresaron Panx1 en oocitos de *Xenopus* y observaron una robusta corriente de salida activada por voltaje sobre -20 mV. Además, la conductancia de un canal de Panx1 expresado exógenamente fue determinada ser entre 470 y 540 pS con varios niveles de conductancia intermedia (Bao et al., 2004; Kurtenbach et al., 2013). Actualmente existe controversia sobre si las panexinas forman GJ o no. Las conductancias de acoplamiento observadas en oocitos pareados expresando Panx1 son mínimas comparadas a las observadas en oocitos aislados indicando una mayor actividad de hemicanales de Panx1 que de GJ (Bruzzone et al., 2003). Así mismo, evidencias en contra de la función de GJ de Panx1 según Dahl y Keane (2012) incluyen: (1) no se ha observado la tinción típica de GJ en estudios de inmunohistoquímica y microscopía electrónica, observando distancias de 20 a 50 nm en las células con Panx1 marcada (Boassa et al., 2007; Sosinsky et al., 2011); (2) su expresión en células aisladas como eritrocitos (Locovei et al., 2006) que no forman GJ; (3) su expresión en la zona apical de células polarizadas del epitelio de las vías aéreas, a diferencia de las conexinas que se expresan en la zona basolateral formando GJ (Ransford et al., 2009); (4) en neuronas del hipocampo se ha encontrado expresión de Panx1 solo en la membrana postsináptica (Zoidl et al., 2007); y (5) la presencia del árbol glicosilado impide la formación de GJ por

interacciones estéricas, es decir, aumenta la formación de GJ de Panx1 al escindir el árbol glicosilado (Boassa et al., 2008).

Se ha determinado que los canales formados por Panx1 son permeables a cationes (e.g. K^+) y aniones (e.g. ATP^{3-}) (Bao et al., 2004). Mayor evidencia de que el canal de Panx1 puede liberar ATP se ha observado en experimentos con ensayos de absorción y liberación de colorantes (Bao et al., 2004; Locovei et al., 2006; Silverman et al., 2008; Ransford et al., 2009). Esta liberación puede ser inhibida por altos niveles de ATP lo que permitiría formar un circuito de retroalimentación negativa. El ATP cumple muchas funciones de señalización paracrina en el sistema nervioso mediada por receptores ionotrópicos $P2X_7$ y metabotrópicos $P2Y$ (Burnstock, 2006; Baroja-Mazo et al., 2013). Los receptores de purinas $P2X_7R$, un tipo de canales iónicos especiales que dejan pasar pequeños cationes como Ca^{2+} y moléculas de hasta 900 Da cuando son expuestos a constante estimulación de agonistas. La apertura de estos poros de gran conductancia y poco selectivos provocaría una liberación de metabolitos e iones que conduciría a la célula a apoptosis, siendo en consecuencia, el ATP una molécula tóxica en concentraciones altas. Al observar una absorción de colorantes y corrientes por activación de $P2X_7R$ suprimibles por bloqueadores de GJ se demostró que existía una asociación entre $P2X_7R$ y canales de Panx1 (Pelegriin y Surprenant, 2006; Locovei et al., 2007). La apertura de este poro de permeabilización se ha asociado con la formación del inflammasoma, complejo proteico que media respuestas inmune que pueden terminar en muerte celular al mediar la activación de caspasas-1 (Silverman et al., 2009; Dvorientchikova et al., 2012). Otras vías de activación de los canales de Panx1 incluyen estiramientos de la membrana celular (Bao et al., 2004; Reigada et al., 2008) y alto K^+ extracelular (Santiago et al., 2011).

Las corrientes dependientes de voltaje de Panx1 han podido ser aisladas al ocupar diferentes bloqueadores de GJ que a concentraciones específicas han demostrado ser bloqueadores específicos de Panx1. Entre ellos se encuentra carbenoxelona (CBX) con un $IC_{50} = 5 \mu M$ para bloquear reversiblemente los canales de Panx1 (Bruzzzone et al., 2003, 2005) y probenecida (PBN) con IC_{50} reportados entre $150 \mu M$ (Silverman et al., 2008) y $352 \mu M$ (Ma et al., 2009). Otros bloqueadores incluyen péptidos miméticos como $^{10}Panx$ y el colorante Brilliant Blue (Thompson et al., 2006, 2008; Wang et al., 2013).

Por otra parte, análisis en ratones de expresión de mRNA por RT-PCR reveló expresión de Panx1 en distintas áreas del sistema nervioso de ratón, incluyendo: la corteza, el cerebelo, el bulbo olfatorio, el tallo cerebral, la espina dorsal y la retina (Bruzzone et al., 2003; Baranova et al., 2004; Ray et al., 2005; Vogt et al., 2005). Fuera del sistema nervioso central se ha encontrado expresión de Panx1 por RT-PCR en el pulmón y el bazo y menor expresión en el corazón, los riñones y los testículos (Ray et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, existe expresión de Panx1 en la retina pero existen pocos estudios que hayan investigado sus posibles funciones en ese tejido. A continuación se explicará muy brevemente la anatomía y fisiología de la retina y luego la evidencia que existe hasta el momento de la expresión y posibles funciones de los canales de Panx1 en la retina.

Expresión y funciones conocidas de la Panx1 en la retina

La retina de vertebrados está compuesta principalmente de 5 capas que forman el circuito encargado de recibir y procesar la información visual. La capa más externa de la retina, o capa nuclear exterior (CNE), es donde se agrupan densamente los fotorreceptores: conos y bastones. Los bastones participan mayoritariamente en la transducción visual cuando existen condiciones de muy poca iluminación (condiciones escotópicas) y los conos participan cuando existe mayor cantidad de luz como durante el día (condiciones fotópicas). La siguiente capa de la retina, llamada capa plexiforme externa (CPE), representa la sinapsis que ocurre entre fotorreceptores, células horizontales y células bipolares. A continuación viene la capa nuclear interna (CPI) donde se agrupan los somas de las células bipolares y amacrinas, además de procesos de células horizontales. La siguiente capa es la capa plexiforme interna (CPI) donde hacen sinapsis células bipolares y amacrinas con las células ganglionares ubicadas en la capa de células ganglionares (CCG). Protegiendo a las células en la parte interna de la CCG se encuentran los "pies" de las células de Müller formando una membrana basal. La luz es captada por los fotorreceptores que convierten esta señal a una eléctrica, la que es transmitida a las CGR. Se han clasificado las respuestas a luz observadas en células de la retina como: ON, aumento de la actividad neuronal frente al aumento de la intensidad de luz; OFF aumento

de la actividad neuronal al disminuir la intensidad de luz; y ON-OFF al combinarse ambas situaciones.

Los axones de las células ganglionares de la retina (CGR) forman el nervio óptico que es el encargado de transmitir la información procesada en la retina hacia áreas superiores del cerebro. Se han identificado 22 CGR en ratón en base a características morfológicas como son el diámetro de su soma, el diámetro de su árbol dendrítico, y su estratificación en la CPI. El diámetro de sus somas varía entre 10 a 25 μm y el de su árbol dendrítico desde 130 a 400 μm (Sun et al., 2002; Badea y Nathans, 2004; Coombs et al., 2006; Völgyi et al., 2009). El gran tamaño del diámetro de las CGR permite diferenciarlas en la CCG de células amacrinas desplazadas que poseen un diámetro de soma no mayor a 10 μm (Pérez De Sevilla Müller et al., 2007).

En la retina se expresa una gran cantidad de Cxs en forma de GJ y de hemicanales (Sohl et al., 2005). En particular, en células horizontales de la retina se ha observado expresión del hemicanal de Cx26. Se ha propuesto que la apertura de estos hemicanales llevaría a una despolarización de las dendritas de células horizontales permitiendo modular por un mecanismo de retroalimentación negativa la actividad de canales de Ca^{2+} , y en consecuencia, la liberación de glutamato desde los conos (Kamermans et al., 2001; Vroman et al., 2013).

Varios laboratorios han estudiado la expresión de Panx1 en la retina pero no todos coinciden en los resultados. Aún así, sí existe concordancia respecto a una disminución de la expresión de Panx1 en la retina de ratones durante el desarrollo (Ray et al., 2005; Dvorientchikova et al., 2006a). Estudios de hibridación *in situ* y inmunohistoquímica han encontrado expresión de Panx1 en la capa de CCG, CPI, CNI y CPE (Ray et al., 2005; Dvorientchikova et al., 2006, 2012; Kranz et al., 2013). Las células marcadas en la CPE se identificaron como células horizontales y las marcadas en la CNI como células bipolares tipo 3a OFF (Kranz et al., 2013). Al ocupar una tinción retrógrada inyectada en el colículo de ratas, se observó colocalización de Panx1 con la tinción retrógrada en el soma y en las dendritas de CGR (Dvorientchikova et al., 2006). Sin embargo, todavía queda por confirmarse si existe expresión de Panx1 en las células amacrinas.

Dvorientchikova y cols. (2012) generaron una línea de ratones KO de Panx1 y verificaron por medio del electroretinograma (ERG) la presencia de las ondas a y b, indicando que la

actividad de fotorreceptores (onda a) y células bipolares de tipo ON (onda b) no se vio afectada con la delección de los canales de Panx1. Kranz y cols. (2013) en otra línea de ratones KO de Panx1 midieron en el ERG un aumento la amplitud de las ondas a y b en condiciones escotópicas, especialmente al estimular con mayores intensidades de luz (Kranz et al., 2013). No observaron diferencias en la propiedades temporales de la transmisión de la señal. Los autores atribuyen las diferencias observadas con el estudio de Dvorientchikova y cols. (2012) a que estos últimos ocuparon intensidades menores de estimulación con luz. Para asegurarse de que sus resultados eran correctos realizaron ERG *in vitro* y observaron también mayores amplitudes de la respuesta, confirmando la alteración en las respuestas causadas por la deficiencia de Panx1 (Kranz et al., 2013). Kranz y cols. proponen en su discusión que los canales de Panx1 expresadas en células bipolares 3a OFF y en células horizontales generarían una disminución de las corrientes extracelulares, y por lo tanto, (como fue observado) un ratón KO de Panx1 presentaría ondas a y b mayores.

Por otra parte, los receptores P2X₇ están expresados en distintas capas de la retina y en particular en la CGR (Reigada et al., 2008; Mitchell et al., 2009). Se ha observado un aumento en la liberación de ATP al aumentar la presión retinal suprimible por bloqueadores de Panx1 (Reigada et al., 2008; Dvorientchikova et al., 2012; Xia et al., 2012). Además, se encontró que la supresión de la expresión de Panx1 protege a las CGR de la muerte celular en un modelo de isquemia de deprivación de glucosa y oxígeno (Dvorientchikova et al., 2012). Esta relación de los canales de Panx1 con glaucoma y isquemia retinal, dos causas importantes de ceguera en el mundo, hacen que su estudio sea importante y que sea necesario avanzar en conocer sus formas de activación y funciones en la retina.

En esta tesis se aportan resultados sobre la expresión, activación y modulación de respuestas eléctricas de los canales de Panx1 en las CGR. Por una parte, se realizaron estudios inmunohistoquímicos para comprobar la expresión de Panx1 observada en las CGR. Además, se estudió en células HeLa transfectadas con Panx1 la posibilidad de ocupar un protocolo de patch clamp propuesto para la disección de las corrientes de Panx1 (Gründken et al., 2011) ocupando carbenoxelona y probenecida como bloqueadores relativamente específicos de Panx1. Este protocolo se basa en rampas preconditionantes despolarizantes que abrirían canales de Panx1 observadas como

aumento en las corrientes de salida y de entrada junto a aumento en las corrientes de las colas y constantes de tiempo, τ (Gründken et al., 2011). Por último, se aplicó este protocolo en la retina como un primer acercamiento al estudio de las corrientes voltaje-dependientes de los canales de Panx1 expresados en CGR.

Hipótesis

Los canales de Panx1 presentes en células ganglionares de la retina están involucrados en la modulación de respuestas eléctricas de estas células.

Objetivo General

Estudiar la expresión de Panx1 en la retina y analizar si los canales de Panx1 modulan las propiedades eléctricas de células ganglionares de la retina.

Objetivos específicos

1. Observar la expresión de Panx1 en la retina de ratón por medio de inmunohistoquímica utilizando ratones KO de Panx1 como controles negativos.
2. Verificar que el protocolo propuesto permite diferenciar corrientes de Panx1 en células HeLa transfectadas con Panx1.
3. Analizar si los canales de Panx1 modulan respuestas eléctricas de células ganglionares de la retina, utilizando bloqueadores de canales de Panx1.

Materiales y métodos

Cultivo de células HeLa Panx1 YFP

La línea celular HeLa Panx1-YFP ya transfectada fue facilitada por el Dr. Agustín Martínez (Universidad de Valparaíso) y el Dr. Juan Carlos Saez (Pontificia Universidad Católica de Chile). Estas células fueron cultivadas a 37 °C en medio HAM-F12 con el pH ajustado a 7.2. Antes de realizar los registros electrofisiológicos fueron lavadas con PBS 1X (Tabla 1), despegadas utilizando tripsina y transferidas a cubre objetos de vidrio redondos. Se dejaron mínimo 3 horas en el medio HAM-F12 y en la estufa a 37 °C para asegurarse que se adhirieran a los cubre objetos.

Tabla 1. Composición PBS.

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	137
KCl	2.7
Na ₂ HPO ₄	10
KH ₂ PO ₄	2

Animales

Ratones C57/BL6 wild type (WT) y Knock-Out (KO) de Panx1, de 3 a 6 meses de edad, fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso en ciclos de 12 horas de día y 12 horas de noche. El ratón KO fue creado por el "Knock-Out Mouse Project" (www.komp.org) y se ha determinado que la disminución de mRNA de Panx1 corresponde a aproximadamente el 50% del WT, por lo que solo representaría un fenotipo hipomórfico (Hanstein et al., 2013). La eutanasia de los ratones se realizó de acuerdo a un protocolo de acuerdo con el comité de bioética de la Universidad de Valparaíso anestesiándolos profundamente con Halotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoroetano, Sigma) y luego decapitándolos.

Preparación de la retina

Después de la decapitación del animal, los ojos fueron extraídos cortando el nervio óptico y colocados en solución extracelular (SEC, composición en la Tabla 3) burbujeada con 95% O₂ y 5% CO₂. Los ojos se cortaron en copa y se extrajo la retina cuidadosamente para ser trozada en cuadrados de 2-5 mm². Los ratones utilizados para registros electrofisiológicos fueron adaptados a la oscuridad durante 20 minutos. La disección de las retinas y los registros de CGR se realizaron en condiciones escotópicas bajo luz roja.

Una sección central de la retina se colocó con las CGR hacia arriba en la cámara de registro con SEC burbujeada (Tabla 3) o en SEC con HEPES como tampón (Tabla 4) y fue estabilizada con un ancla de platino con hilos de nylon. Los registros en SEC con HEPES fueron los primeros en realizarse en un momento donde no existía en el montaje del set-up un cilindro de oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂) que permitiera fijar el pH de la solución extracelular con carbonato. Debido a que en la parte interna de la retina la capa de los pies de las células de Müller (CPCM) protege a las CGR, es necesario romper pequeñas áreas de esta capa para acceder a las células. Se despejó con una pipeta de la misma resistencia utilizada para registrar y llenada con solución intracelular (SIC, Tabla 2). Con leve presión positiva se atravesó la CPCM y se aumentó la presión positiva hasta observar una onda expansiva que evidencia la separación de las células con los pies de las células de Müller. Moviendo la pipeta cuidadosamente en dirección horizontal sin dañar los somas de células que se observan se aumenta la separación. Para exponer los somas de las células de la CCG se movió bruscamente hacia arriba la pipeta.

Tabla 2. Composición solución intracelular (SIC).

Compuesto	Concentración (mM)
Gluconato de potasio	125
KCl	10
HEPES	10
EGTA	2
Na ₂ -ATP	2

Tabla 3. Composición solución extracelular (SEC). * Estos compuestos fueron agregados cada día de experimentos. El resto se almacenó a 4 °C.

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	119
NaHCO ₃	23
NaH ₂ PO ₄	1.25
KCl	2.5
CaCl ₂ *	2.5
MgSO ₄ *	1.5
Glucosa anhidra*	20
Ácido pirúvico sal de sodio*	2

Tabla 4. Composición solución extracelular con HEPES como tampón. La solución se almacenó alicuotada a -20 °C.

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	119
HEPES	24
NaH ₂ PO ₄	1.25
KCl	2.5
CaCl ₂	2.5
MgSO ₄	1.5
Glucosa anhidra	20
Ácido pirúvico sal de sodio	2

Electrofisiología

Pipetas de parche con una punta de resistencia de 6-12 M Ω fueron hechas en un puller (Sutter Instruments) a partir de capilares de borosilicato de 1 mm de grosor externo, 0.75 mm de grosor interno y 4 pulgadas de largo (WPI, Florida, USA).

Los registros en modo whole-cell de patch clamp fueron hechos con un amplificador A-M Systems modelo 2400. Se utilizó un filtro de paso bajo de 5 kiloHertz (kHz) y los datos fueron digitalizados a 10 kHz por una Digidata 1440A (Molecular Devices) antes de ser almacenados en un computador para analizarlos utilizando Clampex 10.3 (Molecular Devices). Utilizando un micromanipulador MP-225 (Sutter Instrument) se realizaron sellos de alta resistencia al mover cuidadosamente el electrodo de parche sobre la membrana de la célula, aplicar una succión leve y fijar el voltaje a -60 mV. Las corrientes transientes causadas por la resistencia en serie (R_s) y la capacitancia de la membrana (C_m) se compensaron electrónicamente por el circuito del amplificador A-M Systems modelo 2400. Al aplicar una succión un poco más fuerte se abrieron los sellos permitiendo el contacto de la solución intracelular (SIC) del electrodo de parche con el citoplasma de la célula. Fueron descartados aquellos sellos con una resistencia de sello menor a 1 G Ω . Se utilizó el circuito de compensación whole-cell del amplificador para compensar hasta 80% la R_s y la C_m , para compensar mejor las corrientes transientes.

Se esperó mínimo 3 minutos antes de comenzar a registrar para asegurarse de la formación de un buen sello y evitar sesgos en las corrientes debido a la evidencia de que los canales de Panx1 se abren con estrés mecánico de la membrana celular (Bao et al., 2004; Reigada et al., 2008).

Para registrar células HeLa se colocó un cubre objeto con células en la cámara de registro con medio HAM F-12 recirculando constantemente por gravedad. Se buscaron células fluorescentes y desacopladas. Para fotografiar y registrar las células se observaron en la pantalla de un computador utilizando una cámara digital (Nikon DS-Qi1Mc) conectada a un microscopio Olympus BX51 con un objetivo de inmersión 40x utilizando microscopía Nomarski. Se eligieron aquellas células que presentaban fluorescencia, un citoplasma poco granulado y aisladas para evitar posibles conexiones en hendidura formadas por la Panx1 (ejemplo en Fig. 3A). Las pipetas de parche fueron llenadas con SIC (Tabla 2).

Los registros de patch clamp en modo whole cell en CGR se realizaron ocupando las mismas pipetas, amplificadores, filtros y procedimientos que en los registros electrofisiológicos de células HeLa. En los registros en que se ocupó SEC con HEPES se utilizó la SIC sin bloqueadores (Tabla 2). En los registros en SEC con carbonato como tampón se utilizó una solución interna (Tabla 5) de las pipetas de parche con los bloqueadores metanosulfonato de cesio (125 mM) y cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl, 15 mM) que permiten bloquear canales de potasio activados por voltaje en especial aquellos de rectificación lenta (Hille, 1967; Hille, 1991; Armstrong, 1971). De esta manera, se pueden aislar levemente las corrientes de Panx1. La solución con bloqueadores de canales de potasio fue ocupada solo en los registros con SEC tamponada con carbonato.

Ácido p-(dipropilsulfamoil)benzoico (Probenecida. PBN, 200 μ M, Sigma) preparado en NaOH 1 M y ácido 3 β -Hidroxi-11-oxoolean-12-en-30-oico 3-hemisuccinato (Carbenoxolona, CBX, 5 μ M, Sigma) fueron disueltos el mismo día de los experimentos en la solución extracelular utilizada y administradas durante 10 minutos utilizando el sistema de perfusión por gravedad. Para intercambiar entre las soluciones del baño y de drogas se utilizó el mismo sistema de perfusión por gravedad (Bioscience Tools).

Se ha determinado que la carbenoxelona (CBX) bloquea con un IC₅₀ de 3 μ M los hemicanales de Cx43, valor levemente inferior a los 5 μ M usados en este trabajo (Ye et al., 2009). Se ha encontrado expresión de Cx43 solo en las células Müller (Kihara et al., 2006) por lo que el efecto de la CBX sobre la Cx43 no sería de importancia a nivel de las CGR. También se ha encontrado que bloquea otras Cxs con concentraciones de IC₅₀ sobre los 20 μ M (D'hondt et al., 2009) y canales de Ca²⁺ activados por voltaje presentes en la retina con un IC₅₀ de 48 μ M (Vessey et al., 2004). En células piramidales del hipocampo aisladas se ha observado una inhibición de los receptores de NMDA por la CBX con un IC₅₀ de 104 μ M (Chepkova et al., 2008).

Tabla 5. Composición solución intracelular con bloqueadores de canales de potasio.

Compuesto	Concentración (mM)
Metanosulfonato de Cesio	125
HEPES	10
EGTA	5
Na-ATP	6
MgSO ₄	1
TEA-Cl	15

El protocolo utilizado para estudiar la activación por voltaje de los canales de Panx1 se creó en Clampex 10.3 y fue dividido en 3 protocolos distintos: (1) pasos de voltaje "I" de -80 a +50 mV de 250 ms; (2) 3 rampas de voltaje precondicionadoras de -80 a 50 mV y 10 s de duración cada una; y (3) pasos de voltaje "II" con las mismas características que el 1 (Gründken et al., 2011). Cada etapa del protocolo fue programada para activarse en secuencia y el voltaje fijado entre cada etapa fue -60 mV. Un trabajo publicado recientemente imitó parte del protocolo y logro observar aumentos en las corrientes de salida en Panx1 de ratón y pez cebra expresadas en células de neuroblastoma (N2a) (Kurtenbach et al., 2013), al igual que lo observado previamente por Gründken y cols. (2011).

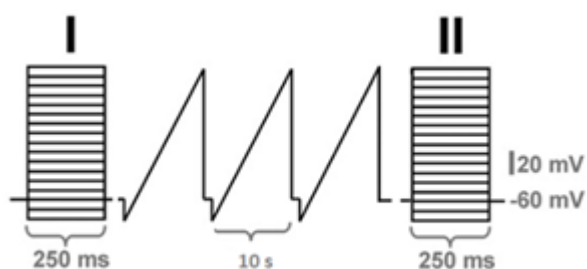


Figura 1. Esquema del protocolo propuesto por Gründken et al. (2011) para activar las corrientes de Panx1. Figura modificada de Gründken et al. (2011).

Para poder observar la morfología de las células parchadas se agregó a la solución interna de bloqueo Lucifer Yellow (1 ug/mL) o Alexa Fluor 594 hidrazida, sal de sodio (10 uL/1mL). Se descartaron aquellas que células que no presentaran un árbol dendrítico y que el diametro de su soma fuera menor a 10 μ m para evitar registrar células amacrinas desplazadas (Pérez De Sevilla Müller et al., 2007). Se tomaron fotografías con la cámara digital montada en el microscopio (Nikon DS-Qi1Mc) y se realizó una fusión con el programa EZ-C1 Gold Version 3.90 (Nikon) entre las distintas imagenes ya que muchas veces el árbol dendritico estuvo fuera del alcance del sensor de la cámara o las dendritas estratificaban muy profundo en la capa plexiforme interna.

Al terminar los registros en una retina esta se retiró de la cámara de perfusión y se fijó en PFA al 4% durante 20 minutos. Luego de la fijación se lavó 3 veces con PBS y guardó a 4 °C en PBS. Para poder obtener mejor resolución de las células registradas, las retinas se llevaron a un microscopio confocal Eclipse C1 80i Nikon fabricado en Japón para poder observar las células marcadas. Para evitar que la retina fuera aplastada al colocar un cubre objeto se colocó en un porta objeto dos cubre objetos de 22x22 mm en cada extremo pegados con vaselina para crear un pequeño canal donde se colocó la retina (capa de células ganglionares hacia arriba) sobre el que se apoyó un cubre objetos de 50x24 mm.

Inmunohistoquímica de retina

Una rata Sprague-Dawley de 28 días, anestesiada profundamente por inhalación con Halotano, fue fijada mediante perfusión intracardiaca con PFA al 4%. Paralelamente, se extrajo la retina de un ratón C57 BL/6 WT (3 meses, hembra) y de un KO (2 meses, hembra), previamente anestesiados profundamente con Halotano y decapitados. Las retinas de rata y de ratón se mantuvieron durante 1 a 2 horas en PFA al 4%. Luego se lavaron 3 veces con PBS (Tabla 1) ajustado a pH 7.4. Las retinas fueron incubadas toda la noche a temperatura ambiente con sacarosa al 30% (diluida en PBS). Posteriormente, las retinas fueron embebidas con OCT (Tissue-Tek) en la tapa de un tubo eppendorf de 1.5 mL y congeladas a -20 °C en un criostato. Criosecciones de 18-20 μ M se colocaron en

cubre objetos, tratados el día anterior con una solución de poli-lisina (Sigma-Aldrich) y tritón X-100 (Amresco) al 0.1%, almacenados a 4 °C.

Para realizar la incubación con los anticuerpos las criosecciones de retina se rehidrataron con PBT (PBS + 0.2% tritón X-100). Se lavaron 3 veces durante 15 minutos con PBS y luego se aplicó solución de bloqueo (PBT + 1% BSA + suero de caballo) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario usado fue el RbCT-395 que es monoclonal de conejo y tiene su epítipo entre los residuos aminoacídicos 395 y 409 (QRVEFKDLDSSEAA) de la Panx1 de ratón, cerca del final del carboxi-terminal. Este se diluyó 1:100 en la solución de bloqueo. Se agregó 100 µL del anticuerpo diluido a cada porta objeto con las criosecciones y se dejó incubando por 24 horas a 4 °C en un contenedor cerrado y humedecido.

Luego del periodo de incubación las criosecciones fueron lavadas 4 veces con PBT durante 20 minutos para luego agregar 100 µL del anticuerpo secundario Rabbit CY3, diluido 1:800 en PBT a cada portaobjeto. Se dejó incubando por 2 horas a temperatura ambiente bajo oscuridad en un contenedor cerrado. Las criosecciones fueron lavadas nuevamente 4 veces por 20 minutos con PBT para aplicar por 10 minutos, 100 µL del intercalante de ADN, DAPI (0.25 µg/mL, 4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich), a cada portaobjeto. Luego se lavó 3 veces por 10 minutos con PBS, se agregó el medio de montaje para muestras fluorescentes DAKO junto con los cubreobjetos. Las criosecciones se mantuvieron a 4 °C durante 2 horas antes de fotografiar. Se fotografiaron las criosecciones con un microscopio confocal Eclipse C1 80i Nikon. Se utilizaron 2 láser de excitación: diodo violeta 408nm y He-Ne 543nm, con filtros de emisión: 450/35 y 605/75.

Análisis

Las corrientes para realizar curvas de corriente-voltaje fueron medidas y promediadas utilizando Clampfit 10.3 (Molecular Devices) entre los 230 y 249 ms de los 250 milisegundos (ms) que duraban los pasos de voltaje del protocolo para la caracterización de corrientes de Panx-1 (Fig. 1). Los datos de las corrientes fueron luego pasados a Microsoft Office Excel para agrupar registros de varias células, calcular promedios y realizar normalizaciones. El promedio de las corrientes voltaje-dependientes se realizó con mínimo 3 registros de cada condición. Para estudiar las corrientes de salida separada de las de entrada se restaron las corrientes obtenidas a -80 mV a las obtenidas a 0 mV y las medidas a 0 mV a aquellas obtenidas a +50 mV. Estos datos se normalizaron respecto al paso I de voltaje (Fig. 1). Utilizando Prism 6 (GraphPad Software, Inc) se realizó un ANOVA de una dirección de los datos normalizados y un post-test de Bonferroni para encontrar diferencias significativas entre las distintas condiciones. Las comparaciones realizadas fueron: I vs II; I vs I + CBX + PBN y II vs II + CBX + PBN.

Los registros representativos fueron importados a Origin 8.5.0 SR1 (OriginLab Corporation) para ser graficados a la misma escala. Las figuras fueron editadas en Adobe Photoshop CS5 V12.0 (Adobe Systems Incorporated).

Resultados

Inmunohistoquímica

Para estudiar la expresión de Panx1 en la retina se realizó una inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico para la Panx1 de ratón C57 BL/6 WT y KO. Como controles negativos se realizaron ensayos sin el anticuerpo primario, además de una inmunohistoquímica en rata Sprague-Dawley para determinar la especificidad inter-especie del anticuerpo. En la Fig. 2 se muestran las fotografías tomadas con el microscopio confocal de la inmunohistoquímica realizada en criosecciones de retinas. En azul se observan los núcleos marcados con DAPI y en rojo las Panx-1 expresadas. En el ratón WT se observa una marcación específica de células solo en aquellas ubicadas en la capa de células ganglionares (CCG) e incluso se marcaron algunos procesos de las neuronas que extienden sus procesos hacia la capa plexiforme interna (CPI) (Fig. 2A, B). En el ratón KO se observa una marca muy similar a la observada en el ratón WT que parece ser específica (Fig. 2A, C). Incluso en algunas criosecciones se observó más marcación de Panx1 en la capa plexiforme interna que en el ratón WT. Como era esperado, en rata no se observó marcaje específico del anticuerpo de Panx1 (Fig. 2E). Esto se puede deber a que el anticuerpo fue creado a partir de una secuencia de la proteína Panx1 expresada en ratón que podría presentar diferencias en su secuencia aminoacídica a la expresada en ratas Sprague-Dawley. Los controles negativos sin el anticuerpo primario demostraron que la marcación observada en rata y en algunas zonas de las criosecciones de ratón corresponden a marcación no específica (Fig. 3F, ratón; Fig. 3G, rata).

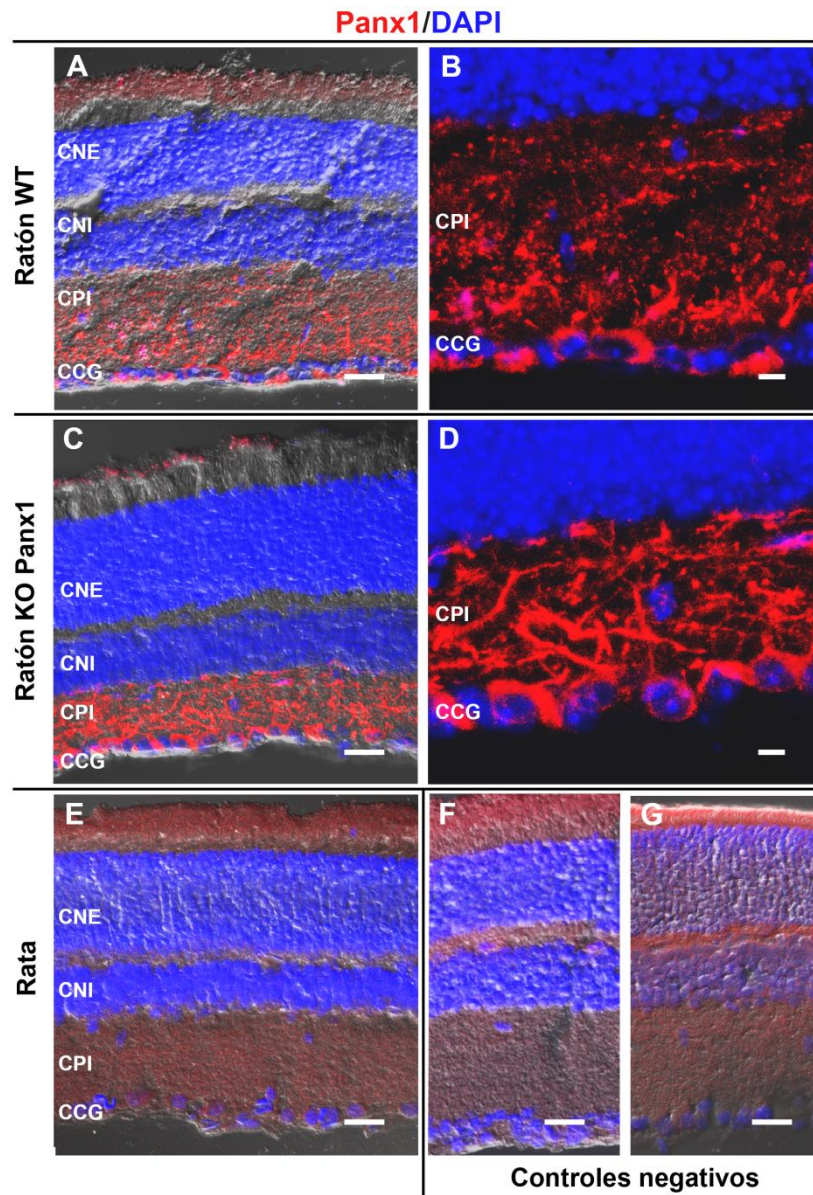


Figura 2. Micrografías confocales de la inmunohistoquímica realizada en retinas de ratón C56 BL/6 WT (A, B, F) y KO de Panx1 (C, D), y en una rata Sprague-Dawley (E, G). En rojo el anticuerpo RbCT-395 para Panx1 de ratón y en azul el marcador de núcleos DAPI. (A) Sección de la retina completa de un ratón WT. (B) Zoom de la misma micrografía de (A) sin la imagen de transmisión. (C) Retina completa de un ratón KO de Panx1 con su zoom (D) a la derecha. (E) Retina de rata. (F) y (G) corresponden a los controles negativos sin anticuerpo primario de ratón y rata, respectivamente. Barras de escala, 20 μm en (A, C, E-G) y 10 μm en (B, D). CNE = capa nuclear externa; CNI = capa nuclear interna; CPI = capa plexiforme interna; CCG = capa de células ganglionares.

Registros electrofisiológicos en células HeLa Panx1 YFP.

Se registraron en total 10 células HeLa Panx1 YFP no acopladas e identificadas por su fluorescencia (Fig. 3A). Para activar y poder diferenciar los canales de Panx1 expresados se utilizó el protocolo propuesto por Gründken et al, (2011) de 3 rampas consecutivas de -80 a +50 mV de 10 s de duración cada una; precedidas y anteceditas por pasos de voltaje ("I" y "II") de la misma diferencia de potencial y de 250 ms de duración cada una (Fig. 3B). Este protocolo se sustenta en la evidencia de que los canales de Panx1 se abren frente a despolarizaciones del potencial de membrana (Bruzzone et al., 2003) y que la inactivación de estos canales sería lenta (Gründken et al., 2011), similar a lo observado en hemicanales de Cx46 (Trexler et al., 1996). De esta manera, las rampas preconditionantes permitirían observar corrientes residuales de canales de Panx1 al ocurrir la hiperpolarización desde +50 mV a -80 mV antes del segundo paso de voltaje. Se ocuparon drogas que a las concentraciones utilizadas, son considerados bloqueadores bastante específicos de Panx1 (carbenoxelona, CBX, 5 μ M y probenecida, PBN, 200 μ M)

Del total de células registradas se observó en 7 células una disminución de las corrientes de salida al administrar los bloqueadores de Panx1 (Fig. 3) y en 3 células se observó un aumento de las corrientes de salida al aplicar la misma concentración de drogas (Fig. 4). En la Fig. 5 se hace un promedio de todas las células HeLa Panx1 YFP registradas.

Para analizar las respuestas de corriente dependientes del voltaje se utilizaron gráficos de relaciones corriente-voltaje al medir las corrientes entre los 230 y 249 ms de los pasos de voltaje (Fig. 3C). Se realizaron curvas de las diferencias a cada potencial estudiado entre los pasos de voltaje antes y después de las rampas preconditionantes, y antes y después de aplicar las drogas. Así, al realizar las restas se puede observar con mayor claridad la diferencia de corrientes dependientes de voltaje afectadas por el protocolo o las drogas utilizadas (Fig. 3D). Para comparar estadísticamente las corrientes a potenciales de membrana hiperpolarizados, se le restó a las corrientes medidas a 0 mV, aquellas medidas a -80 mV. Para comparar las corrientes a potenciales de membrana despolarizados se le restó a las corrientes obtenidas a +50 mV, aquellas obtenidas a 0 mV.

Para poder encontrar las células en forma esférica y no estirada típica de las células HeLa, se transfirieron las células a los cubre objetos 3 o 18 horas antes de realizar los registros. En células redondas y de poco tamaño es más fácil fijar el voltaje ya que la corriente inyectada para fijar el voltaje en una célula va disminuyendo con la distancia que recorre. En las Fig. 3-4A se muestran ejemplos de células registradas.

En la Fig. 3B se muestra un registro representativo de los obtenidos en el modo whole-cell con el voltaje fijado a -60 mV en las 7 células mencionadas previamente. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los pasos de voltaje I y II en las corrientes hiperpolarizadas y despolarizadas (Fig. 3E; Tabla 6; $p > 0.1$).

Tabla 6. Normalización respecto al paso de voltaje I de la diferencia entre las corrientes registradas a potenciales hiperpolarizados (0 - -80 mV) y a potenciales despolarizados (+50 - 0 mV) de 7 células HeLa mPanx1 YFP en condiciones sin drogas y con 10 minutos de CBX 5 μ M y PBN 200 μ M. DS = desviación estándar; SEM = error estándar de la media; IC = intervalo de confianza.

	Corriente (% de I)					
	-80 a 0 mV			0 a +50 mV		
	I + Drogas	II	II + Drogas	I + Drogas	II	II + Drogas
Promedio	88	99	88	76	99	76
DS	10	5.0	10	16	7.5	16
SEM	2.0	1.0	2.1	3.3	1.5	3.3
IC 95% inferior	84	97	84	69	95	69
IC 95% superior	92	101	92	83	102	83

La aplicación por 10 minutos de los bloqueadores de Panx1 CBX (5 μm) y PBN (200 μm) produjo una reducción en las corrientes de salida que se observa en la curvas de corriente-voltaje (Fig. 3C, círculos blancos), en las curvas de diferencias (Fig. 3D, triángulos) y en los gráficos con valores normalizados (Fig. 3E). Para las corrientes evocadas por hiperpolarización se registraron diferencias significativas entre el paso los pasos I y I + CBX + PBN ($p < 0.05$) y II vs II + CBX + PBN ($p < 0.0001$; Fig. 3E) evidenciando una disminución de las corrientes de entrada al aplicar las drogas. En el caso de las corrientes evocadas por despolarización diferencias significativas son reflejadas en una disminución de las corrientes de salida solo luego de la perfusión de los bloqueadores de Panx1 ($p < 0.005$ para I vs I + CBX + PBN; $p < 0.0001$ para II vs II + CBX + PBN) (Fig. 3E; Tabla 6). Este efecto de disminución de las corrientes de salida al aplicar los bloqueadores de Panx1 1 CBX (5 μm) y PBN (200 μm). No se observaron diferencias al realizar un lavado de los bloqueadores aplicados sobre las corrientes observadas (datos no mostrados). Mayor información sobre las corrientes registradas a cada potencial y las diferencias entre cada paso de voltaje se pueden encontrar en las Tablas 1-3 de la sección Anexos.

Figura 3. Registros en 7 células HeLa Panx1 YFP. (A) Fotografía de una célula HeLa Panx1 YFP en que se registró. Notese que se encuentra alejada de otras células cercanas para evitar acoplamiento eléctrico. Barra de escala = 20 μm . (B) Arriba se muestra el protocolo utilizado y abajo un ejemplo de los registros obtenidos en las distintas condiciones. (C) Relación corriente-voltaje del promedio de las 7 células en las distintas condiciones estudiadas. (D) Curvas de las diferencias entre los distintos pasos de voltaje. (E) Valores normalizados respecto a I y separados en corrientes evocadas por hiperpolarización restando las obtenidas a -80 mV de las obtenidas a 0 mV y las evocadas por despolarización restando las medidas a 0 mV de la medidas a +50 mV. Valores de $p < 0.05$ (*); $p < 0.005$ (**); $p < 0.0001$ (***)

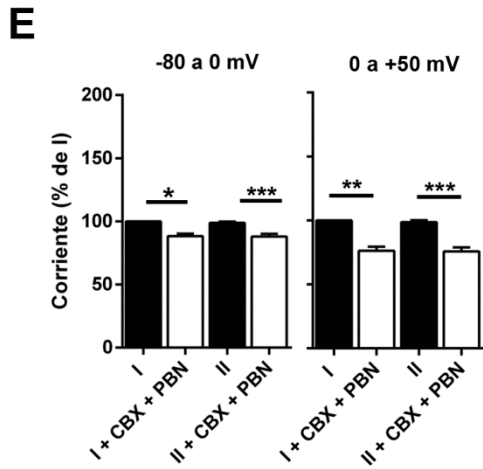
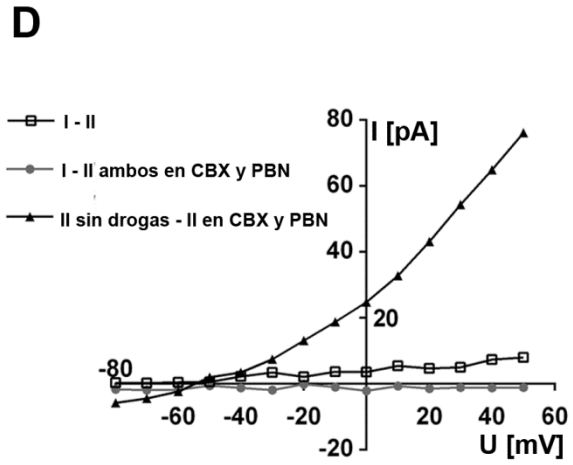
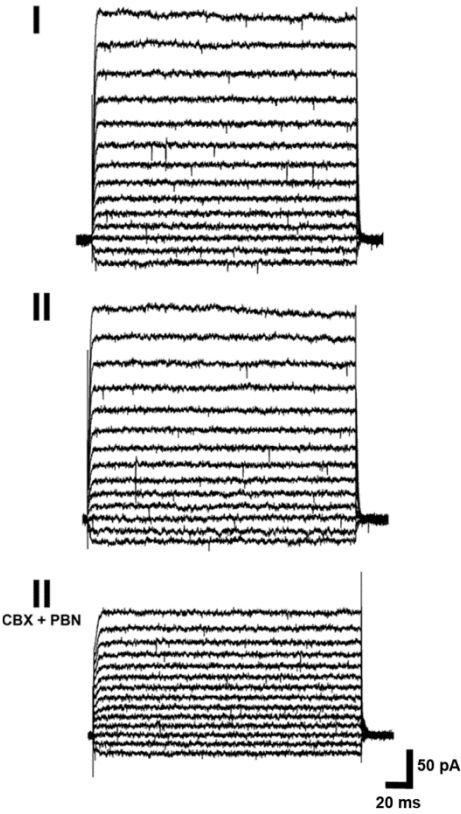
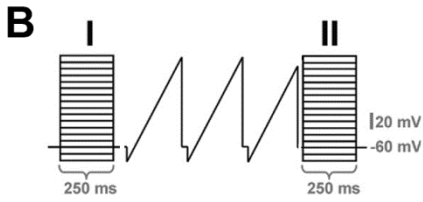
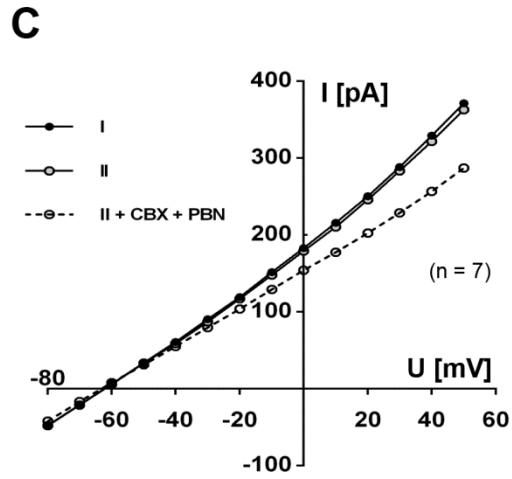
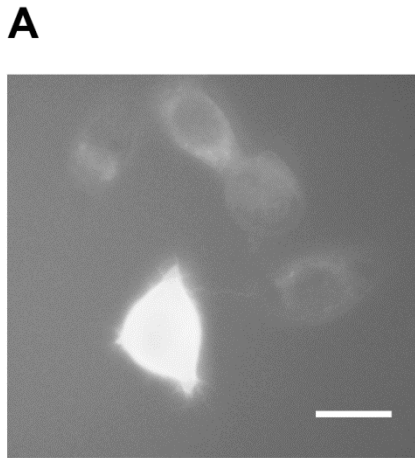


Fig. 3

En las 3 células restantes (registro ejemplo en Fig. 4B) tampoco se observaron diferencias significativas entre los pasos de voltaje antes (I) y después (II) de las rampas de preconditionamiento (Fig. 4C-E; Tabla 7). Con la aplicación por 10 minutos de los bloqueadores de Panx1 CBX y PBN se observó un aumento significativo de las corrientes a potenciales de membrana hiperpolarizados al compararlas con los valores obtenidos sin drogas ($p < 0.0001$ para I vs I + CBX + PBN y II vs II + CBX + PBN; Fig. 4C-E; Tabla 7). En las tablas 4-6 de la sección de anexos se encuentra un detalle de los promedios y los datos de las curvas de diferencia realizadas.

Tabla 7. Diferencia normalizada en 3 células HeLa Panx1 YFP respecto al paso de voltaje I entre las corrientes registradas a potenciales hiperpolarizados (0 - -80 mV) y a potenciales despolarizados (+50 - 0 mV) en condiciones sin drogas y con 10 minutos de CBX 5 μ M y PBN 200 μ M. Abreviaciones igual que en la tabla 6.

	Corriente (% de I)					
	-80 a 0 mV			0 a +50 mV		
	I + Drogas	II	II + Drogas	I + Drogas	II	II + Drogas
Promedio	134	102	136	167	105	166
DS	8.5	10	11	11	16	16
SEM	2.8	3.4	3.7	3.7	5.2	5.4
IC 95% inferior	127	94	128	159	93	154
IC 95% superior	141	109	145	176	117	179

Figura 4. Registros en 3 células HeLa Panx1 YFP. (A) Fotografía de una célula HeLa Panx1 YFP en que se registro. Barra de escala = 20 μ m. (B) Se muestra un ejemplo de los registros obtenidos en las distintas condiciones. (C) Relación corriente-voltaje del promedio de las 3 células en las distintas condiciones estudiadas. (D) Curvas de las diferencias entre los distintos pasos de voltaje. (E) Valores normalizados respecto a I y separados en corrientes evocadas por hiperpolarización restando las obtenidas a -80 mV de las obtenidas a 0 mV y las evocadas por despolarización restando las medidas a 0 mV de las medidas a +50 mV. $p < 0.0001$ (***).

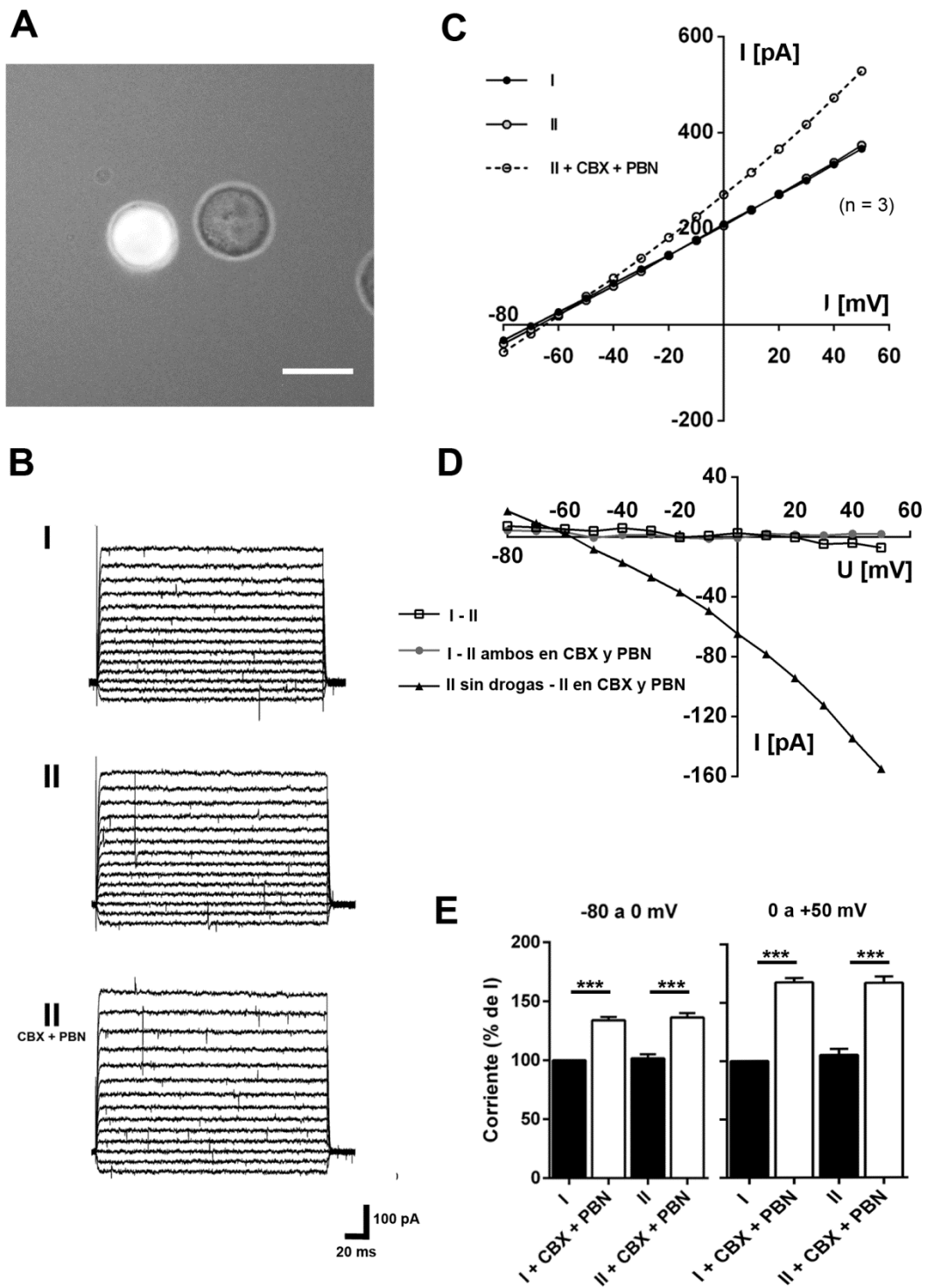


Fig. 4

Al realizar un promedio de las corrientes dependientes de voltaje registradas en las 10 células HeLa Panx1 YFP se observa en las curvas corriente-voltaje y en las curvas de diferencia que no existen diferencias entre las distintas condiciones estudiadas (Fig. 5A, B). Al normalizar y comparar los datos respecto al primer paso de voltaje con y sin bloqueadores no se observaron diferencias significativas (Fig. 5C, D; Tabla 8; Tablas 7-9 de Anexos).

Tabla 8. Diferencia normalizada en 10 células HeLa Panx1 YFP respecto al paso de voltaje I entre las corrientes registradas a potenciales hiperpolarizados (0 - -80 mV) y a potenciales despolarizados (+50 - 0 mV) en condiciones sin drogas y con 10 minutos de CBX 5 μ M y PBN 200 μ M. Abreviaciones igual que en la tabla 6.

	Corriente (% de I)					
	-80 a 0 mV			0 a +50 mV		
	I + Drogas	II	II + Drogas	I + Drogas	II	II + Drogas
Promedio	101	100	101	101	100	100
DS	23	6.7	24	44	10	44
SEM	4.0	1.2	4.2	7.6	1.8	7.7
IC 95% inferior	93	97	93	85	97	85
IC 95% superior	109	102	110	116	104	116

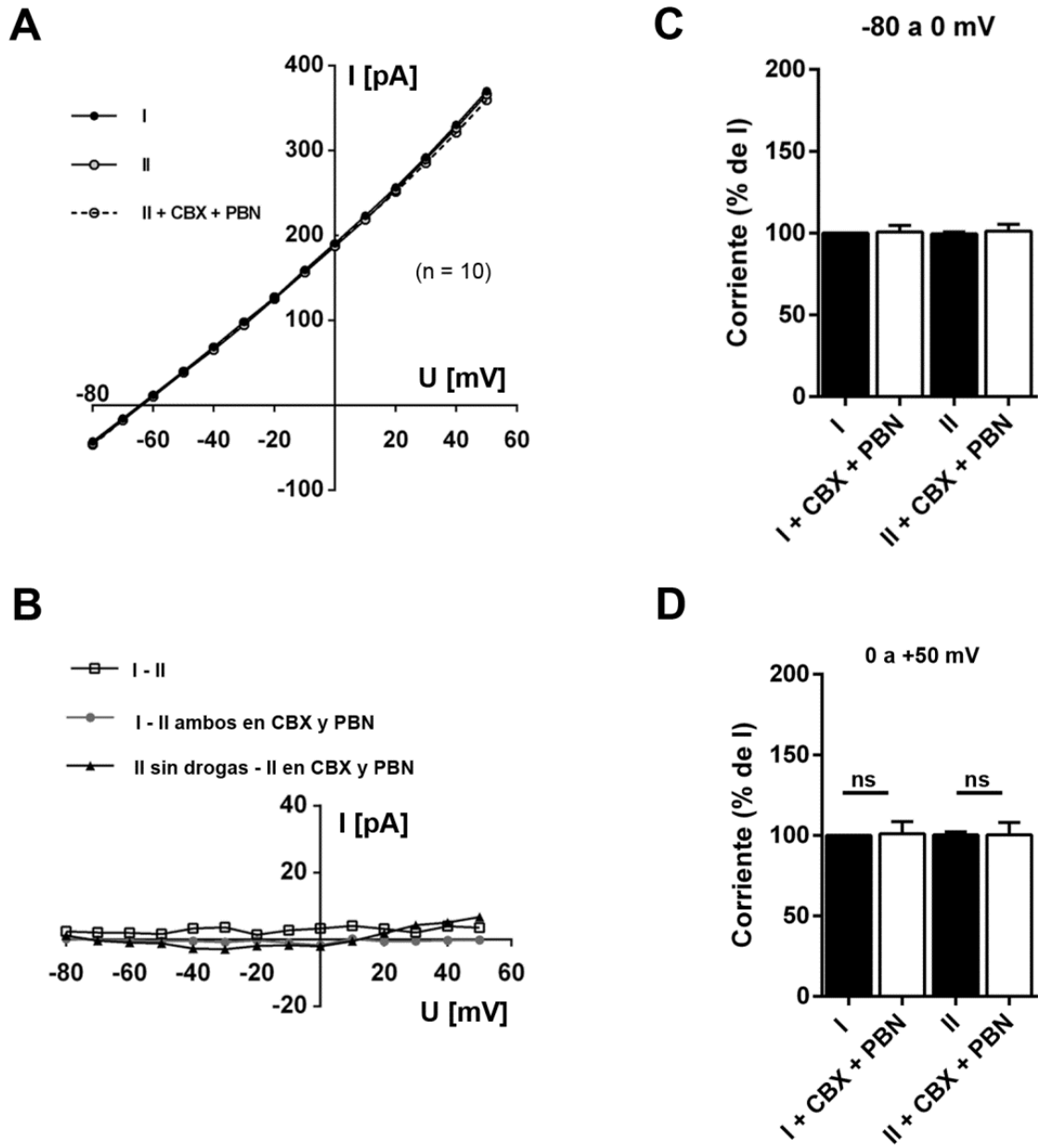


Figura 5. Registros en 10 células HeLa Panx1 YFP. (A) Relación corriente-voltaje del promedio de las 10 células en las distintas condiciones estudiadas. (B) Curvas de las diferencias entre los distintos pasos de voltaje. (C-D) Valores normalizados respecto a I y separados en corrientes a potenciales de membrana hiperpolarizados restando las obtenidas a -80 mV de las obtenidas a 0 mV (C) y a potenciales de membrana despolarizados restando las medidas a 0 mV de las medidas a +50 mV (D). ns = no estadísticamente significativo.

Registros electrofisiológicos en células ganglionares de la retina.

Las CGR son células con árboles dendríticos que pueden tener 400 μm de diámetro y el diámetro de sus somas varía desde 15 a 25 μm (Sun et al., 2002; Badea and Nathans, 2004; Kong et al., 2005; Coombs et al., 2006; Völgyi et al., 2009). Debido a que en la CCG las células amacrinas desplazadas representan un poco más de la mitad del total de neuronas (Jeon et al., 1998), se eligieron para registrar aquellas células con somas más grandes (diámetro aproximadamente mayor a 15 μm), ya que las amacrinas desplazadas presentan somas que alcanzan como diámetro máximo los 10 μm (Pérez De Sevilla Müller et al., 2007).

Sumada a la expresión de canales de Panx1 en la retina de ratón que se observó (Fig. 2A, B) estudios previos ya habían visto expresión en CGL y en algunas células de la CNI y CPE (Dvorientchikova et al., 2006b; Kranz et al., 2013). Es por esto que se decidió aplicar el protocolo propuesto por Gründken y cols. (2011) para observar si en un modelo distinto es posible observar corrientes activadas por voltaje de canales Panx1 y poder avanzar en entender la modulación de respuestas eléctricas de los canales de Panx1 en la retina. Como los bloqueadores de Panx1 probaron ser relativamente efectivos, se utilizaron a las mismas concentraciones usados en células HeLa (CBX, 5 μM y PBN, 200 μM).

Los primeros registros de whole-cell con el voltaje fijado en la retina de ratones C57 BL/6 realizados fueron una solución extracelular con HEPES como tampón (composición en tabla 4) y utilizando una solución de intracelular sin bloqueadores (Tabla 5). En esta etapa de experimentos no se ocupó Lucifer Yellow o Alexa Fluor para marcar las células y se eligieron solo aquellas de somas grandes. En la Fig. 6A se muestra un ejemplo de los registros obtenidos en células ganglionares de la retina.

Al realizar un promedio de las corrientes obtenidas a cada potencial en 3 sellos de 3 ratones distintos no se observaron a potenciales más negativos diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones estudiadas (con y sin bloqueadores). Se observa una leve disminución en las corrientes a potenciales positivos en el II paso de voltaje respecto al paso I, reflejada en la disminución de la pendiente de la

curva (Fig. 6B, C) que es significativo ($p < 0.05$; Fig. 6D; Tabla 9), indicando que las rampas preconditionantes en estas condiciones provocaron el cierre de algunos canales.

Con la perfusión por 10 minutos de los bloqueadores de Panx1 CBX ($5 \mu\text{M}$) y PBN ($200 \mu\text{M}$) se produjo una reducción en las corrientes de salida normalizadas que se observa con claridad en la curvas de corriente-voltaje (Fig. 6B), que es de aproximadamente 200 pA (Fig. 6C) y que representa el $60\% \pm 2.3\%$ (promedio \pm error estándar de la media, SEM) del normalizador en el paso de voltaje I + CBX + PBN; y $49\% \pm 1.6\%$ en el segundo paso de voltaje luego de la aplicación de las drogas (II + CBX + PBN) (Fig. 6D; Tabla 9), ambas significativas ($p < 0.0001$).

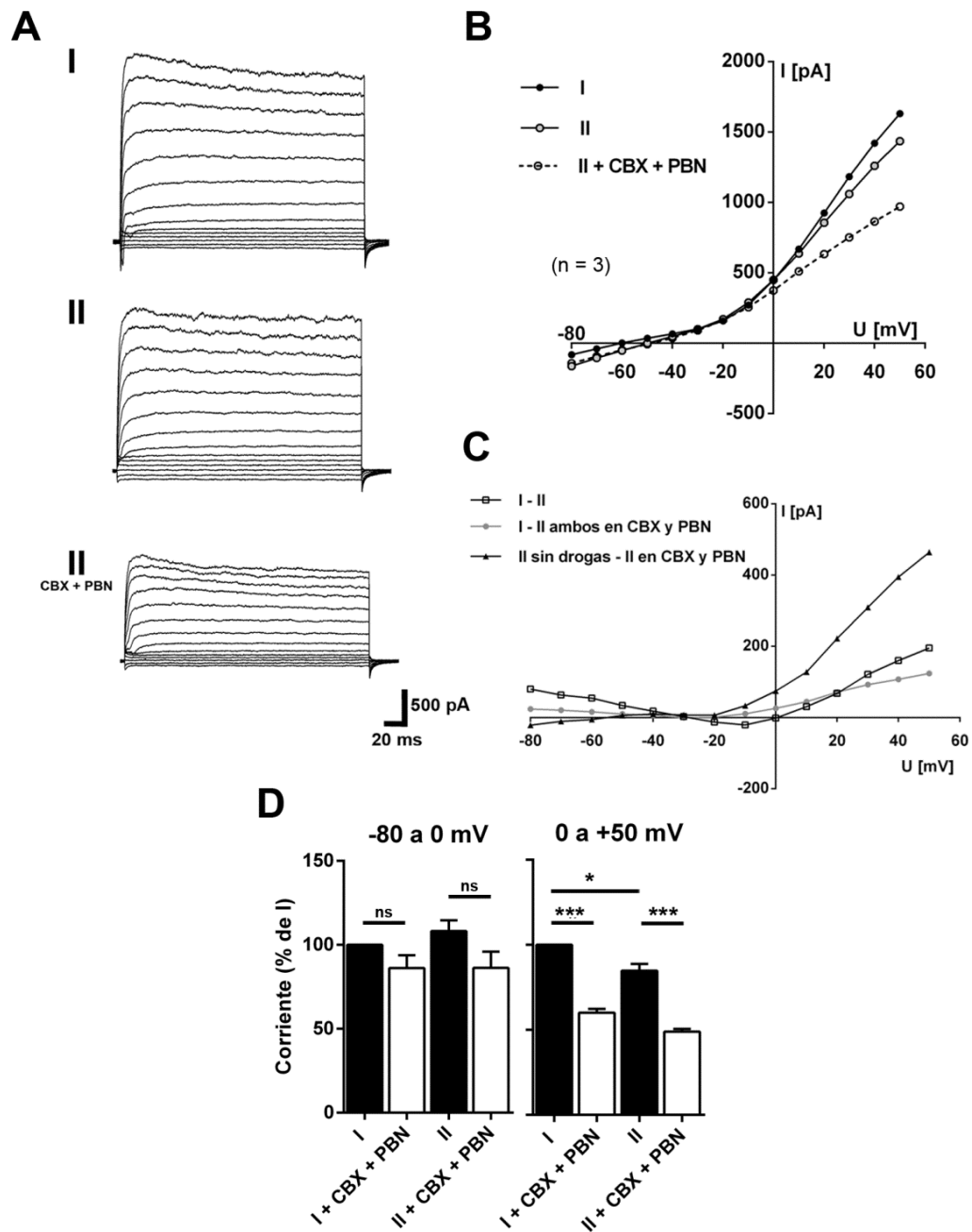


Figura 6. Registros en 3 CGR con solución extracelular tamponada con HEPES y solución intracelular sin bloqueadores. (A) Ejemplo de los registros obtenidos en las distintas condiciones. (B) Relación corriente-voltaje del promedio de las 3 células en las distintas condiciones estudiadas. (C) Curvas de las diferencias entre los distintos pasos de voltaje. (D) Valores normalizados respecto a I y separados en corrientes evocadas por hiperpolarización (0 - -80 mV) y evocadas por despolarización (+50 - 0 mV). Valores de $p < 0.05$ (*); $p < 0.0001$ (**); ns = no estadísticamente significativo.

Tabla 9. Análisis de 3 registros en solución tamponada con HEPES. Datos presentados como la diferencia normalizada respecto al paso de voltaje I entre las corrientes registradas a potenciales hiperpolarizados (0 - -80 mV) y a potenciales despolarizados (+50 - 0 mV) en condiciones sin drogas y con 10 minutos de CBX 5 μ M y PBN 200 μ M. Abreviaciones igual que en la tabla 6.

	Corriente (% de I)					
	-80 a 0 mV			0 a +50 mV		
	I + Drogas	II	II + Drogas	I + Drogas	II	II + Drogas
Promedio	86	108	86	60	85	49
DS	31	25	40	9.4	15	6.8
SEM	7.6	6.4	9.7	2.3	3.9	1.6
IC 95% inferior	70	94	66	55	76	45
IC 95% superior	102	122	107	65	93	52

De 17 registros de células ganglionares de la retina en solución burbujeada se logró fotografiar 2 exitosamente en el microscopio confocal y 12 con la cámara montada en el setup de registro. De estas 17 células se descartaron aquellas que no se logró observar su árbol dendrítico con los marcadores intracelulares y/o que presentaron muchos potenciales de acción que hacían imposible realizar curvas corriente-voltaje, quedando en total 11 células registradas en 5 ratones C57 BL/6 wild type. En la Fig. 7A se muestra una de las células marcada con Lucifer Yellow fotografiada en el microscopio confocal en el plano horizontal de la retina (Fig. 7A) y al realizar una reconstrucción en tres dimensiones de las fotografías tomadas (Fig. 7B). Se observa claramente su árbol dendrítico y su proyección hacia la capa plexiforme interna. En la Fig. 7C se presenta un registro modelo de los obtenidos al parchar células ganglionares de la retina ocupando el protocolo de rampas preconditionantes y la solución que bloquea los canales de potasio. Realizando un promedio de las corrientes registradas en las 11 células en los 5 ratones se observa que esta disminución en las corrientes de salida no es significativa entre los pasos de voltaje I y II (Fig. 7D, F).

Al aplicar los bloqueadores de Panx1 no se observaron diferencias significativas a potenciales hiperpolarizados entre los pasos I + CBX + PBN ($95\% \pm 3.1\%$ del normalizador) y II ($111\% \pm 2.3\%$ del normalizador) (Tabla 10). Se observa una disminución en las corrientes de salida luego de la perfusión de los bloqueadores en el segundo paso de voltaje (II + CBX + PBN; Fig. 7D). Esta disminución no es estadísticamente significativa entre los pasos I y I + CBX + PBN ($89\% \pm 2.6\%$ del normalizador). De nuevo se hace notar los intervalos de confianza del 95% pero en este caso para el paso I + CBX + PBN que son de 84 a 94% del normalizador (inferior-superior) con un SEM de 2.6% y un $n = 11$ de CGR registradas (Tabla 10) se puede decir que a estas concentraciones los bloqueadores bloquean una muy pequeña parte de los canales de Panx1. Tampoco se observan diferencias significativas entre los pasos II ($87\% \pm 1.2\%$ del normalizador) y II + CBX + PBN ($81\% \pm 1.9\%$ del normalizador) (Figura 7F; Tabla 10). En este caso, los intervalos de confianza del 95% del paso II + CBX + PBN están dentro de 77 y 85% con un SEM de 1.9% por lo que no se podría decir que existen disminuciones leves de las corrientes de salida.

Figura 7. Registros en 10 CGR de 5 ratones C57 BL/6 en solución extracelular tamponada con carbonato y con bloqueadores de Kv en la solución intracelular (A) Fotografía tomada en un microscopio confocal de una CGR marcada con Lucifer Yellow. Barra de escala = 50 μm . (B) Reconstrucción 3D de la misma célula en (A). Barra de escala = 20 μm . (C) Ejemplo de los registros obtenidos en las distintas condiciones (D) Relación corriente-voltaje del promedio de las 10 CGR registradas. (E) Curvas de las diferencias entre los distintos pasos de voltaje. (F) Valores normalizados respecto al paso de voltaje I y separadas en evocadas por hiperpolarización y despolarización.

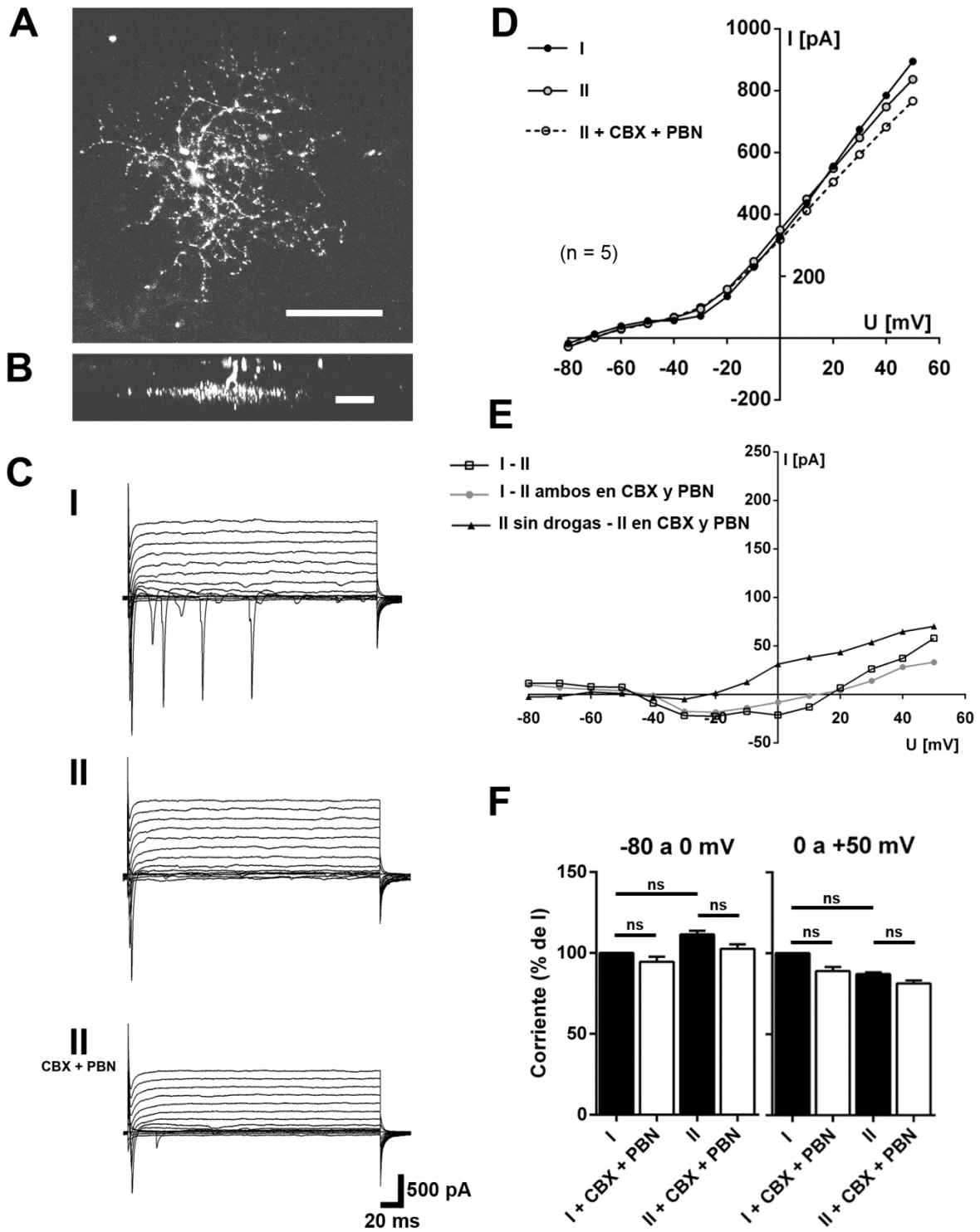


Fig. 7

Tabla 10. Análisis de 10 registros en solución extracelular tamponada con carbonato y con bloqueadores de Kv en la solución interna. Los datos representan la diferencia normalizada respecto al paso de voltaje I entre las corrientes registradas a potenciales hiperpolarizados (0 - -80 mV) y a potenciales despolarizados (+50 - 0 mV) en condiciones sin drogas y con 10 minutos de CBX 5 μ M y PBN 200 μ M. Abreviaciones igual que en la tabla 6.

	Corriente (% de I)					
	-80 a 0 mV			0 a +50 mV		
	I + Drogas	II	II + Drogas	I + Drogas	II	II + Drogas
Promedio	95	111	103	89	87	81
DS	17	13	15	14	6.8	11
SEM	3.1	2.3	2.7	2.6	1.2	1.9
IC 95% inferior	88	107	97	84	85	77
IC 95% superior	101	116	108	94	90	85

Discusión

Inmunohistoquímica en retina

Se observó marcación específica de Panx1 solo en la capa de células ganglionares (CCG) y en la capa plexiforme interna (CPI) de ratones WT (Fig. 2A, B). La marcación en los somas se ubicó principalmente alrededor de los núcleos indicando que los canales están expresados en la membrana celular de las células. Sin ocupar marcadores neuronales específicos para CGR, no es posible descartar que las células marcadas sean células amacrinas desplazadas, sobre todo cuando representan aproximadamente la mitad de las neuronas en la CCG (Jeon et al., 1998).

Esta evidencia de la expresión de Panx1 en la CCG se suma a estudios previos que han identificado expresión de Panx1 en la retina y en particular en las CGR. En nuestro caso, no se observó expresión en la capa nuclear interna (CNI), ni tampoco en la capa plexiforme externa (CPE) donde se han identificado que células bipolares 3a OFF y células horizontales expresan Panx1 utilizando el mismo anticuerpo de esta tesis (Kranz et al., 2013). Sin embargo, todavía queda por demostrarse con marcadores específicos si las células amacrinas expresan Panx1, como se hipotetiza en Dvorientchikova y cols. (2006).

La marcación de Panx1 que se observó en el ratón KO fue muy similar a la observada en el ratón WT (Fig. 2 C, D). Como se mencionó previamente, se ha demostrado que la línea de ratones KO de Panx1 ocupados expresa aproximadamente el 50% de los mRNA de Panx1 al compararlo con el ratón WT y que el porcentaje de expresión depende del tejido (Hanstein et al., 2013). Lamentablemente Hanstein et al. (2013) no estudiaron la expresión de Panx1 en la retina en esta línea de ratones por lo que no es posible saber si en la retina existe una mayor o menor expresión. Según lo observado en la Fig. 2 C y D es posible pensar que en la retina de la línea de ratones KO usados, la expresión de Panx1 disminuyó menos del 50% medido por Hanstein et al. (2013) en otros tejidos. Otra razón de la marcación observada en el ratón KO podrían ser que el anticuerpo usado (RbCT-395) no es específico para Panx1 aunque trabajos previos han demostrado su alta

especificidad (Penuela et al., 2007; Cone et al., 2013) incluso en la retina (Dvorientchikova et al., 2006). Como no se observó marcación del anticuerpo RbCT-395 en las criosecciones de retina de rata Sprague-Dawley (Fig. 2E) es probable que existan diferencias en la secuencia genética de la Panx1 entre ambas especies en la región epítipo del anticuerpo RbCT-395, entre los residuos aminoacídicos 395 y 409 cerca del fin de la región C-terminal de la Panx1.

Electrofisiología en células HeLa Panx1 YFP

En los registros realizados en células HeLa Panx1 YFP no se observaron diferencias significativas en las corrientes dependientes de voltaje entre los pasos I y II del protocolo usado (Fig. 3, 4 y 5). Gründken y cols. (2011) y posteriormente Kurtenbach y cols. (2013), ocupando protocolos de pasos de voltaje con rampas despolarizantes precondicionadoras, similar al ocupado en esta tesis, lograron observar una activación de las corrientes de salida y de entrada de Panx1 en células de Neuroblastoma (N2a) expresando Panx1. Se ha propuesto que las diferencias observadas tienen que ver con el cierre retrasado de los canales de Panx1 luego de las rampas precondicionantes afectando su cinética de repolarización (Gründken et al., 2011), similar al efecto observado en hemicanales (Trexler et al., 1996). Al observar un aumento de las corrientes de las "colas" luego de los pasos de voltaje más despolarizados y de la constante de tiempo de las corrientes generadas por los pasos hiperpolarizantes comprueban esta hipótesis. Este aumento en las corrientes hipo- y despolarizadas fue inhibido por el bloqueador de Panx1 mefloquina indicando un efecto específico de la Panx1 (Iglesias et al., 2009; Gründken et al., 2011). Razones de porque nosotros no observamos este efecto probablemente tienen que ver con que el protocolo se tuvo que dividir en 3 partes distintas en Clampex 10.3 provocando que entre cada protocolo el voltaje fijado volviera por unos milisegundos a -60 mV.

La aplicación por perfusión de los bloqueadores de Panx1 (CBX, 5 μ M y PBN, 200 μ M) provocó diferentes efectos en 2 poblaciones de células HeLa Panx1 YFP. En 7 de 10 células registradas se observó una disminución significativa de las corrientes de salida y de entrada (Fig. 3), indicando el cierre de canales activados por voltaje, probablemente

canales de Panx1 ya que los bloqueadores son bastante específicos a las concentraciones usadas (Bruzzone et al., 2003; Silverman et al., 2008; D'hondt et al., 2009; Ma et al., 2009) . En otra población de células HeLa Panx1 YFP (n = 3) se observó un aumento significativo en las corrientes de salida y de entrada, evidenciando la apertura de canales activados por voltaje al aplicar los bloqueadores (Fig. 4). Existe evidencia de que la activación receptores P2X7 por ATP 5 mM y la aplicación de CBX 50 μ M provoca un aumento de las corrientes registradas en células HEK293 coexpresando Panx1 y receptores P2X7 (Ma et al., 2009). Esto sugiere que no es posible descartar que este sea el efecto observado sobre todo con la evidencia de que las células HeLa expresan endógenamente receptores P2X7 (Feng et al., 2006; Welter-Stahl et al., 2009).

Electrofisiología en células ganglionares de la retina

Gründken y cols. (2011) también observaron la activación de las corrientes de salida y de entrada en células CA1 del hipocampo lo que permitiría decir que el efecto observado no tiene que ver con una característica especial de las células N2a, si no que la aplicación del protocolo sería extrapolable a distintas líneas celulares y tejidos. Es por esto que se partió ocupando el protocolo registrando células ganglionares de la retina (CGR) en una solución extracelular tamponada con HEPES y una interna sin bloqueadores. Se ha hecho hincapié en que se utilizó HEPES para controlar el pH por los cambios que se han observado en distintas propiedades fisiológicas de células CA1 del hipocampo de rata al cambiar entre una solución tamponada con HEPES o carbonato (Church, 1992).

En los registros de CGR con solución extracelular con HEPES como tampón se observó una disminución significativa solo de las corrientes entre los pasos I y II de voltaje (Fig. 6). Esta disminución refleja el cierre de canales provocados por las rampas preconditionantes y que es probable tenga que ver con un agotamiento de metabolitos intracelulares. La aplicación de los bloqueadores CBX y PBN disminuyeron aún más las corrientes de salida (Fig. 6) indicando que canales de Panx1 se habían abierto con al aplicar el protocolo sin las drogas y también que podría existir una contribución de los canales de Panx1 a la modulación de respuestas eléctricas en CGR.

Aunque los resultados obtenidos en células HeLa Panx1 YFP no permitieron definir si realmente el protocolo propuesto permite la diferenciación de corrientes de Panx1, se decidió continuar ocupando el protocolo para determinar si en la retina existen diferencias ya que los registros en células ganglionares de la retina (CGR) realizados en solución extracelular tamponada con HEPES fueron los primeros en realizarse de toda la tesis y en ellos se observó una diferencia significativa entre los pasos I y II de voltaje (Fig. 6). Se prefirió continuar estos experimentos en la retina ocupando solución extracelular tamponeada con carbonato para imitar condiciones más fisiológicas de registro. Asimismo, para intentar aislar las corrientes de Panx1 de las corrientes de canales de potasio (Kv) se agregó a la solución interna bloqueadores establecidos de estos canales.

No se observaron diferencias significativas entre ninguna de las comparaciones realizadas de los registros de CGR en solución externa tamponada con carbonato y solución interna de bloqueo (Fig. 7). Haciendo un análisis de los intervalos de confianza del 95% inferior y superior observados para los pasos II y I CBX + PBN se puede decir que existen leves disminuciones en las corrientes de salida pero que no fueron identificadas como estadísticamente significativas por el test de comparaciones múltiples ocupado. Si se asume que las CGR registradas fueron elegidas al azar y que los valores de la población presentan una distribución Gaussiana los intervalos de confianza permiten saber que hay un 95% de probabilidad de que el intervalo de confianza del 95% contenga el verdadero promedio de la población (Gardner y Altman, 1986; Poole, 2001). Por esto es posible y necesario analizar con mayor detalle y sacar conclusiones a partir de los intervalos de confianza aunque no existan diferencias significativas.

Por la forma constante de las corrientes más tardías, típicas de los canales Kv, se puede decir que la solución intracelular de bloqueo con metanosulfonato de cesio (125 mM) y TEA-Cl (15 mM) dejó una gran cantidad de canales Kv sin bloquear. Esto probablemente se deba al gran tamaño de las células registradas, impidiendo el bloqueo efectivo de todos sus canales Kv. La subunidad Kv β 3 de los canales Kv fue relacionada con la Panx1 proponiéndose que existe una modulación de los canales de Panx1 por la subunidad Kv β 3 (Bunse et al., 2009). La subunidad Kv β 3 disminuye la acción inhibitoria carboxelona y probenecida sobre las corrientes de Panx1 (Bunse et al., 2009). No existe hasta el momento evidencia de la expresión de esta subunidad en particular en la retina pero si de otras subunidades de canales de Kv. Si existiera expresión de esta

subunidad en las CGR se podría explicar la poca inhibición de canales de Panx1 por CBX y PBN.

Un problema mayor del estudio de Cxs y la Panx1 en la retina es la poca especificidad de sus bloqueadores. Esto lleva a que muchas veces se mal interpreten resultados al existir efectos secundarios no tomado en cuenta en otras proteínas. En esta tesis se tomo en cuenta este problema y se eligieron bloqueadores de Panx1 que a las concentraciones utilizadas se ha probado que son bastante selectivos para los canales de Panx1 (Bruzzone et al., 2003; D'hondt et al., 2009; Ma et al., 2009).

Por último, como no hay evidencia de la expresión de Panx1 en todas los tipos de CGR, tampoco es posible descartar la posibilidad de que algunas células registradas simplemente no expresen canales de Panx1.

Conclusión

En conclusión, en esta tesis se entrega más evidencia de la expresión de Panx1 en la retina, en especial en la capa de células ganglionares y en la capa plexiforme interna. La expresión observada en el ratón KO probablemente se deba al fenotipo hipomórfico de este ratón. Por su parte, el protocolo propuesto por Gründken et al. (2011) no permitió diferenciar las corrientes de Panx1 en células HeLa Panx1 YFP al no observarse diferencias significativas entre los pasos de voltaje I y II. Se observaron diferencias significativas en las corrientes hiper-despolarizadas con efectos inversos en dos poblaciones de células HeLa Panx1 YFP disminuyendo significativamente en una y aumentando en la otra. Futuros trabajos deberán estudiar si existe un efecto de los receptores P2X₇ expresados endógenamente en las células HeLa sobre los bloqueadores de Panx1.

En la retina, el protocolo permitió diferenciar corrientes de salida de los canales de Panx1 sobre todo al ocupar HEPES tampón de la solución extracelular y una solución interna sin los bloqueadores de canales de potasio. El efecto de las rampas preconditionantes fue cerrar canales en la célula al disminuir las corrientes de salida en el paso de voltaje II a diferencia de lo observado en estudios anteriores (Gründken et al., 2011; Kurtenbach et al., 2013) reflejando un mecanismo que debe ser estudiado en mayor profundidad. Se demostró que estos canales cerrados por las rampas preconditionantes no correspondían a los de Panx1 al existir una disminución significativa de las corrientes de salida luego de la aplicación de CBX y PBN. Los resultados obtenidos en retina con solución extracelular tamponada con carbonato y una solución interna con bloqueadores de potasio no mostraron diferencias significativas en todas las condiciones estudiadas.

Por último, los resultados indican que existe una leve modulación mediada por los canales de Panx1 de las respuestas eléctricas de CGR. Futuros trabajos deberán resolver si con una estimulación más fisiológica (*e.g.* respuestas a glutamato o luz) se observan efectos de los canales de Panx1 sobre las respuestas eléctricas de estas células.

Referencias

- Armstrong CM (1971)** Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol* 58:413–437.
- Badea TC, Nathans J (2004)** Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *J Comp Neurol* 480:331–351.
- Bao L, Locovei S, Dahl G (2004)** Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 572:65–68.
- Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y (2004)** The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* 83:706–716.
- Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R (2006)** Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda)* 21:103–114.
- Baroja-Mazo A, Barberà-Cremades M, Pelegrín P (2013)** The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim Biophys Acta* 1828:79–93.
- Bennett MV., Zukin RS (2004)** Electrical Coupling and Neuronal Synchronization in the Mammalian Brain. *Neuron* 41:495–511.
- Bennett MVL, Garré JM, Orellana J a, Bukauskas FF, Nedergaard M, Sáez JC (2012)** Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res* 1487:3–15.
- Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G (2007)** Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J Biol Chem* 282:31733–31743.
- Boassa D, Qiu F, Dahl G, Sosinsky G (2008)** Trafficking dynamics of glycosylated pannexin 1 proteins. *Cell Commun Adhes* 15:119–132.
- Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H (2005)** Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* 92:1033–1043.
- Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H (2003)** Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13644–13649.

- Bunse S, Locovei S, Schmidt M, Qiu F, Zoidl G, Dahl G, Dermietzel R (2009)** The potassium channel subunit Kvbeta3 interacts with pannexin 1 and attenuates its sensitivity to changes in redox potentials. *FEBS J* 276:6258–6270.
- Burnstock G (2006)** Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S172–81.
- Chepkova AN, Sergeeva OA, Haas HL (2008)** Carbenoxolone impairs LTP and blocks NMDA receptors in murine hippocampus. *Neuropharmacology* 55:139–147.
- Church J (1992)** A change from HCO₃⁽⁻⁾-CO₂⁻ to hepes-buffered medium modifies membrane properties of rat CA1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol* 455 :51–71.
- Cone AC, Ambrosi C, Scemes E, Martone ME, Sosinsky GE (2013)** A comparative antibody analysis of pannexin1 expression in four rat brain regions reveals varying subcellular localizations. *Front Pharmacol* 4:6.
- Coombs J, van der List D, Wang G-Y, Chalupa LM (2006)** Morphological properties of mouse retinal ganglion cells. *Neuroscience* 140:123–136.
- D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Bultynck G, Himpens B (2009)** Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? *Bioessays* 31:953–974.
- Dvorientchikova G, Ivanov D, Barakat D, Grinberg A, Wen R, Slepak VZ, Shestopalov VI (2012)** Genetic ablation of Pannexin1 protects retinal neurons from ischemic injury. *PLoS One* 7:e31991.
- Dvorientchikova G, Ivanov D, Panchin Y, Shestopalov VI (2006a)** Expression of pannexin family of proteins in the retina. *FEBS Lett* 580:2178–2182.
- Dvorientchikova G, Ivanov D, Panchin Y, Shestopalov VI (2006b)** Expression of pannexin family of proteins in the retina. *FEBS Lett* 580:2178–2182.
- Feng Y-H, Li X, Wang L, Zhou L, Gorodeski GI (2006)** A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem* 281:17228–17237.
- Gardner MJ, Altman DG (1986)** Statistics in Medicine Confidence intervals rather than P values : estimation rather than hypothesis testing. 292:746–750.
- Gründken C, Hanske J, Wengel S, Reuter W, Abdulazim A, Shestopalov VI, Dermietzel R, Zoidl G, Prochnow N (2011)** Unified patch clamp protocol for the characterization of Pannexin 1 channels in isolated cells and acute brain slices. *J Neurosci Methods* 199:15–25.

- Hanstein R, Negoro H, Patel NK, Charollais A, Meda P, Spray DC, Suadicani SO, Scemes E (2013)** Promises and pitfalls of a Pannexin1 transgenic mouse line. *Front Pharmacol* 4:61.
- Hille B (1967)** The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *J Gen Physiol* 50:1287–1302.
- Iglesias R, Spray DC, Scemes E (2009)** Mefloquine blockade of Pannexin1 currents: resolution of a conflict. *Cell Commun Adhes* 16:131–137.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH (1998)** The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18:8936–8946.
- Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R (2001)** Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science* 292:1178–1180.
- Kihara AH, Mantovani de Castro L, Belmonte MA, Yan CYI, Moriscot AS, Hamassaki DE (2006)** Expression of connexins 36, 43, and 45 during postnatal development of the mouse retina. *J Neurobiol* 66:1397–1410.
- Kong J-H, Fish DR, Rockhill RL, Masland RH (2005)** Diversity of ganglion cells in the mouse retina: unsupervised morphological classification and its limits. *J Comp Neurol* 489:293–310.
- Kranz K, Dorgau B, Pottek M, Herrling R, Schultz K, Bolte P, Monyer H, Penuela S, Laird DW, Dedek K, Weiler R, Janssen-Bienhold U (2013)** Expression of Pannexin1 in the outer plexiform layer of the mouse retina and physiological impact of its knockout. *J Comp Neurol* 521:1119–1135.
- Kurtenbach S, Prochnow N, Kurtenbach S, Klooster J, Zoidl C, Dermietzel R, Kamermans M, Zoidl G (2013)** Pannexin1 channel proteins in the zebrafish retina have shared and unique properties. *PLoS One* 8:e77722.
- Locovei S, Bao L, Dahl G (2006)** Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7655–7659.
- Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G (2007)** Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett* 581:483–488.
- Ma W, Hui H, Pelegrin P, Surprenant A (2009)** Pharmacological Characterization of Pannexin-1 Currents Expressed in Mammalian Cells □. 5.
- Matsuuchi L, Naus CC (2013)** Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochim Biophys Acta* 1828:94–108.

- Mitchell CH, Lu W, Hu H, Zhang X, Reigada D, Zhang M (2009)** The P2X(7) receptor in retinal ganglion cells: A neuronal model of pressure-induced damage and protection by a shifting purinergic balance. *Purinergic Signal* 5:241–249.
- Nielsen MS, Nygaard Axelsen L, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou N-H (2012)** Gap junctions. *Compr Physiol* 2:1981–2035.
- Panchin Y V (2005)** Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *J Exp Biol* 208:1415–1419.
- Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S (2000)** A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 10:R473–R474.
- Pelegri P, Surprenant A (2006)** Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071–5082.
- Penuela S, Bhalla R, Gong X-Q, Cowan KN, Celetti SJ, Cowan BJ, Bai D, Shao Q, Laird DW (2007)** Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J Cell Sci* 120:3772–3783.
- Penuela S, Gehi R, Laird DW (2013)** The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta* 1828:15–22.
- Pérez De Sevilla Müller L, Shelley J, Weiler R (2007)** Displaced amacrine cells of the mouse retina. *J Comp Neurol* 505:177–189.
- Poole C (2001)** Low P-values or narrow confidence intervals: which are more durable? *Epidemiology* 12:291–294.
- Ransford G a, Fregien N, Qiu F, Dahl G, Conner GE, Salathe M (2009)** Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41:525–534.
- Ray A, Zoidl G, Weickert S, Wahle P, Dermietzel R (2005)** Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. *Eur J Neurosci* 21:3277–3290.
- Reigada D, Lu W, Zhang M, Mitchell CH (2008)** Elevated pressure triggers a physiological release of ATP from the retina: Possible role for pannexin hemichannels. *Neuroscience* 157:396–404.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC (2003)** Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83:1359–1400.

- Saez JC, Connort JA, Spray DC, Bennett MVL (1989)** Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger , inositol 1 , 4 , 5-trisphosphate , and to calcium ions. *86:2708–2712.*
- Sáez JC, Retamal M a, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MVL (2005)** Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta 1711:215–224.*
- Santiago MF, Veliskova J, Patel NK, Lutz SE, Caille D, Charollais A, Meda P, Scemes E (2011)** Targeting pannexin1 improves seizure outcome. *PLoS One 6:e25178.*
- Silverman W, Locovei S, Dahl G (2008)** Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol 295:C761–7.*
- Silverman WR, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E, Keane RW, Dahl G (2009)** The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem 284:18143–18151.*
- Sohl G, Maxeiner S, Willecke K (2005)** Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci 6:191–200.*
- Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, Naus CC, Penuela S, Scemes E, Spray DC, Thompson RJ, Zhao H-B, Dahl G (2011a)** Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels 5:193–197.*
- Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, Naus CC, Penuela S, Scemes E, Spray DC, Thompson RJ, Zhao H-B, Dahl G (2011b)** Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels 5:193–197.*
- Sun W, Li N, He S (2002)** Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J Comp Neurol 451:115–126.*
- Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, Rungta RL, Hines DJ, Beazely MA, Macdonald JF, Macvicar BA (2008)** Hemichannels Augments Aberrant Bursting in the Hippocampus. *319:1555–1559.*
- Thompson RJ, Zhou N, MacVicar B a (2006)** Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science 312:924–927.*
- Trexler EB, Bennett M V, Bargiello T a, Verselis VK (1996)** Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel. *Proc Natl Acad Sci U S A 93:5836–5841.*
- Vessey JP, Lalonde MR, Mizan H a, Welch NC, Kelly MEM, Barnes S (2004)** Carbenoxolone inhibition of voltage-gated Ca channels and synaptic transmission in the retina. *J Neurophysiol 92:1252–1256.*

- Vogt A, Hormuzdi SG, Monyer H (2005)** Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 141:113–120.
- Völggi B, Chheda S, Bloomfield S a (2009)** Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J Comp Neurol* 512:664–687.
- Vroman R, Klaassen LJ, Kamermans M (2013)** Ephaptic communication in the vertebrate retina. *Front Hum Neurosci* 7:612.
- Wang J, Jackson DG, Dahl G (2013)** The food dye FD&C Blue No. 1 is a selective inhibitor of the ATP release channel Panx1. *J Gen Physiol* 141:649–656.
- Welter-Stahl L, da Silva CM, Schachter J, Persechini PM, Souza HS, Ojcius DM, Coutinho-Silva R (2009)** Expression of purinergic receptors and modulation of P2X7 function by the inflammatory cytokine IFN γ in human epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1788:1176–1187.
- Xia J, Lim JC, Lu W, Beckel JM, Macarak EJ, Laties AM, Mitchell CH (2012)** Neurons respond directly to mechanical deformation with pannexin-mediated ATP release and autostimulation of P2X7 receptors. *J Physiol* 590:2285–2304.
- Ye Z-C, Oberheim N, Kettenmann H, Ransom BR (2009)** Pharmacological “cross-inhibition” of connexin hemichannels and swelling activated anion channels. *Glia* 57:258–269.
- Zoidl G, Petrasch-Parwez E, Ray a, Meier C, Bunse S, Habbes H-W, Dahl G, Dermietzel R (2007)** Localization of the pannexin1 protein at postsynaptic sites in the cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience* 146:9–16.

Anexos

I. Análisis de los registros en células HeLa Panx1 GFP.

1. Promedio de células donde se registro una disminución de las corrientes de salida.

Tabla 1. Relación voltaje-corriente en el primer (I) y segundo (II) paso de voltaje en 7 células HeLa Panx1 YFP registradas. El promedio se realizo con mínimo 3 registros. SD = desviación estándar; SEM = error estándar de la media.

Voltaje (mV)	I			II		
	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)
-80	-47.214	17.989	5.996	-47.583	19.073	6.358
-70	-20.551	9.256	3.085	-20.854	11.206	3.735
-60	6.459	3.181	1.060	5.944	2.442	0.814
-50	34.058	11.222	3.741	33.406	9.752	3.251
-40	61.193	21.986	7.329	58.864	21.737	7.246
-30	90.789	35.919	11.973	87.329	34.326	11.442
-20	119.278	47.140	15.713	117.115	47.619	15.873
-10	151.937	60.678	20.226	148.214	62.588	20.863
0	183.024	77.591	25.864	179.391	79.192	26.397
10	215.950	95.097	31.699	210.464	97.018	32.339
20	250.711	114.972	38.324	245.994	116.175	38.725
30	288.506	135.610	45.203	283.480	138.793	46.264
40	329.181	157.689	52.563	321.753	161.592	53.864
50	371.373	181.226	60.409	363.296	183.712	61.237

Tabla 2. Relación voltaje-corriente en el primer (I) y segundo (II) paso de voltaje luego de la aplicación de Carbenoxelona (5 μ M, CBX) y Probenecida (200 μ M, PBN) por 10 minutos en 7 células HeLa Panx1 YFP registradas.. El promedio se realizo con mínimo 3 registros. SD = desviación estándar; SEM = error estándar de la media.

Voltaje (mV)	I + Drogas			II + Drogas		
	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)
-80	-43.436	15.439	5.146	-41.830	15.764	5.255
-70	-18.256	8.241	2.747	-16.464	8.591	2.864
-60	6.554	2.058	0.686	8.227	2.763	0.921
-50	30.917	8.485	2.828	31.385	9.019	3.006
-40	54.175	17.811	5.937	55.342	17.705	5.902
-30	78.081	27.005	9.002	79.860	27.333	9.111
-20	103.805	36.368	12.123	103.896	38.038	12.679
-10	128.445	47.635	15.878	129.409	48.698	16.233
0	152.519	58.886	19.629	154.554	59.755	19.918
10	177.001	70.479	23.493	177.601	72.087	24.029
20	201.453	82.570	27.523	202.847	84.549	28.183
30	228.050	95.677	31.892	229.109	97.625	32.542
40	255.656	109.446	36.482	256.809	111.748	37.249
50	286.060	122.453	40.818	287.147	124.878	41.626

Tabla 3. Diferencias entre pasos de voltaje en condiciones sin drogas y con 10 minutos de CBX 5 μM y PBN 200 μM en 7 células HeLa Panx1 YFP registradas.

Voltaje (mv)	I - II (pA)	I - II ambos en drogas (pA)	II sin drogas - II en drogas (pA)
-80	0.370	-1.606	-5.754
-70	0.303	-1.792	-4.390
-60	0.515	-1.673	-2.283
-50	0.652	-0.468	2.021
-40	2.329	-1.167	3.522
-30	3.460	-1.779	7.469
-20	2.163	-0.091	13.219
-10	3.724	-0.963	18.805
0	3.633	-2.035	24.837
10	5.486	-0.600	32.863
20	4.717	-1.394	43.147
30	5.027	-1.058	54.371
40	7.429	-1.152	64.944
50	8.077	-1.087	76.149

2. Promedio de células donde se registro un aumento de las corrientes de salida.

Tabla 4. Relación voltaje-corriente en el primer (I) y segundo (II) paso de voltaje en 3 células HeLa Panx1 YFP registradas.. El promedio se realizo con mínimo 3 registros. Abreviaciones igual que en la tabla 1.

Voltaje (mV)	I			II		
	Promedio (pA)	SD (pA)	SEM (pA)	Promedio (pA)	SD (pA)	SEM (pA)
-80	-31.414	18.824	6.275	-30.863	49.414	16.471
-70	-2.600	15.288	5.096	-19.104	44.975	14.992
-60	27.275	15.696	5.232	-5.677	47.400	15.800
-50	55.763	17.835	5.945	7.866	53.582	17.861
-40	86.823	15.984	5.328	20.936	63.556	21.185
-30	116.087	16.123	5.374	34.070	74.679	24.893
-20	145.013	17.225	5.742	47.413	86.550	28.850
-10	177.429	16.587	5.529	61.339	101.412	33.804
0	210.015	20.204	6.735	76.740	115.861	38.620
10	240.597	25.031	8.344	91.876	129.015	43.005
20	271.932	32.552	10.851	108.161	141.968	47.323
30	301.163	41.222	13.741	124.128	153.419	51.140
40	334.493	48.453	16.151	140.982	167.639	55.880
50	367.246	59.325	19.775	158.857	180.531	60.177

Tabla 5. Relación voltaje-corriente en el primer (I) y segundo (II) paso de voltaje luego de la aplicación de Carbenoxelona (5 μ M) y Probenecida (200 μ M) por 10 minutos en 3 células HeLa Panx1 YFP registradas. El promedio se realizó con mínimo 3 registros. Abreviaciones igual que en la tabla 1.

	I + Drogas			II + Drogas		
Voltaje (mV)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)
-80	-51.927	28.115	9.372	-51.927	28.115	9.372
-70	-14.456	23.173	7.724	-14.456	23.173	7.724
-60	22.709	21.748	7.249	22.709	21.748	7.249
-50	59.534	14.930	4.977	59.534	14.930	4.977
-40	99.338	10.624	3.541	99.338	10.624	3.541
-30	140.331	8.658	2.886	140.331	8.658	2.886
-20	181.771	5.121	1.707	181.771	5.121	1.707
-10	224.799	2.880	0.960	224.799	2.880	0.960
0	270.947	3.129	1.043	270.947	3.129	1.043
10	319.882	9.766	3.255	319.882	9.766	3.255
20	367.725	19.661	6.554	367.725	19.661	6.554
30	419.134	30.186	10.062	419.134	30.186	10.062
40	475.041	39.234	13.078	475.041	39.234	13.078
50	531.097	53.794	17.931	531.097	53.794	17.931

Tabla 6. Diferencias entre pasos de voltaje en condiciones sin drogas y con 10 minutos de CBX 5 μM y PBN 200 μM en 3 células HeLa Panx1 YFP registradas.

Voltaje (mv)	I-II (pA)	I-II ambos en drogas (pA)	II sin drogas - II en drogas (pA)
-80	7.523	4.541	17.531
-70	6.553	4.132	9.435
-60	5.507	3.390	2.448
-50	4.123	-0.230	-8.125
-40	6.027	1.453	-17.090
-30	4.256	1.660	-26.839
-20	-0.149	-0.247	-36.855
-10	0.935	-1.018	-49.323
0	2.872	-0.652	-64.456
10	1.135	2.337	-78.083
20	-0.108	1.656	-94.029
30	-4.453	1.190	-112.328
40	-3.974	2.298	-134.276
50	-6.926	2.169	-154.755

3. Promedio de todas las células HeLa Panx1 YFP registradas.

Tabla 7. Relación voltaje-corriente en el primer (I) y segundo (II) paso de voltaje en todas las células HeLa Panx1 YFP registradas. El promedio se realizó con mínimo 3 registros. Abreviaciones igual que en la tabla 1.

	I			II		
Voltaje (mV)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)
-80	-42.474	19.567	6.522	-44.990	20.651	6.884
-70	-15.165	13.862	4.621	-17.344	14.092	4.697
-60	12.704	12.781	4.260	10.691	10.892	3.631
-50	40.569	16.618	5.539	38.876	14.077	4.692
-40	68.882	24.022	8.007	65.443	22.872	7.624
-30	98.379	34.383	11.461	94.680	33.066	11.022
-20	126.999	43.604	14.535	125.530	44.387	14.796
-10	159.585	54.839	18.280	156.698	56.841	18.947
0	191.121	69.406	23.135	187.717	71.301	23.767
10	223.344	84.392	28.131	219.163	86.970	28.990
20	257.077	101.601	33.867	253.807	104.087	34.696
30	292.303	119.580	39.860	290.121	124.112	41.371
40	330.775	138.865	46.288	326.767	144.163	48.054
50	370.135	159.797	53.266	366.559	164.251	54.750

Tabla 8. Relación voltaje-corriente en el primer (I) y segundo (II) paso de voltaje luego de la aplicación de Carbenoxelona (5 μ M) y Probenecida (200 μ M) por 10 minutos en todas las células HeLa Panx1 YFP registradas. El promedio se realizo con mínimo 3 registros. Abreviaciones igual que en la tabla 1.

	I + Drogas			II + Drogas		
Voltaje (mV)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)
-80	-45.983	19.307	6.436	-46.221	18.367	6.122
-70	-17.116	13.208	4.403	-17.102	11.047	3.682
-60	11.400	13.006	4.335	11.554	8.474	2.825
-50	39.502	17.203	5.734	39.899	16.198	5.399
-40	67.724	27.271	9.090	68.105	26.015	8.672
-30	96.756	38.476	12.825	97.503	37.428	12.476
-20	127.195	49.375	16.458	127.333	50.608	16.869
-10	157.352	62.490	20.830	158.331	63.343	21.114
0	188.048	77.006	25.669	189.667	77.204	25.735
10	219.865	92.671	30.890	219.584	92.623	30.874
20	251.334	108.430	36.143	251.813	108.361	36.120
30	285.376	125.411	41.804	285.759	125.297	41.766
40	321.472	144.009	48.003	321.589	143.640	47.880
50	359.571	161.580	53.860	359.681	160.752	53.584

Tabla 9. Diferencias entre pasos de voltaje en condiciones sin drogas y con 10 minutos de CBX 5 μM y PBN 200 μM en todas las células HeLa Panx1 YFP registradas.

Voltaje (mv)	I-II (pA)	I-II ambos en drogas (pA)	II sin drogas - II en drogas (pA)
-80	2.516	0.238	1.232
-70	2.178	-0.015	-0.242
-60	2.013	-0.154	-0.864
-50	1.693	-0.397	-1.023
-40	3.439	-0.381	-2.661
-30	3.699	-0.747	-2.823
-20	1.469	-0.138	-1.803
-10	2.887	-0.980	-1.633
0	3.405	-1.620	-1.951
10	4.181	0.281	-0.421
20	3.270	-0.479	1.994
30	2.183	-0.384	4.361
40	4.008	-0.117	5.178
50	3.576	-0.110	6.878

I. Análisis de los registros en células ganglionares de la retina (CGR) de ratón C57 BL/6.

1. Promedio 3 CGR registradas en solución extracelular tamponada con HEPES.

Tabla 10. Relación voltaje-corriente en el primer (I) y segundo (II) paso de voltaje en 3 CGR registradas en solución extracelular con HEPES como tampón. El promedio se realizó con mínimo 3 registros. Abreviaciones igual que en la tabla 1.

	I			II		
Voltaje (mV)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)
-80	-81.134	16.903	11.952	-161.252	42.028	29.719
-70	-39.412	23.404	16.549	-102.876	41.858	29.598
-60	3.655	28.974	20.487	-51.053	49.730	35.165
-50	35.846	42.945	30.366	1.519	56.435	39.906
-40	67.391	47.729	33.749	48.969	65.599	46.385
-30	103.972	54.589	38.600	101.005	78.130	55.246
-20	158.966	85.400	60.387	171.594	116.033	82.048
-10	271.595	153.440	108.498	291.616	177.520	125.525
0	449.777	241.454	170.734	450.953	248.254	175.542
10	669.895	332.092	234.824	638.570	301.878	213.460
20	925.774	418.547	295.958	857.322	365.847	258.693
30	1184.094	486.645	344.110	1062.114	404.158	285.783
40	1420.863	549.979	388.894	1260.732	448.826	317.368
50	1632.894	606.856	429.112	1436.908	494.859	349.918

Tabla 11. Relación voltaje-corriente en el primer (I) y segundo (II) paso de voltaje luego de la aplicación de Carbenoxelona (5 μ M) y Probenecida (200 μ M) por 10 minutos en 3 CGR registradas en solución extracelular con HEPES como tampón. El promedio se realizo con mínimo 3 registros. Abreviaciones igual que en la tabla 1.

	I + Drogas			II + Drogas		
Voltaje (mV)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)
-80	-115.639	92.215	65.206	-139.926	103.369	73.093
-70	-71.818	86.190	60.945	-92.865	96.677	68.361
-60	-29.896	81.080	57.332	-46.137	90.046	63.672
-50	5.706	76.818	54.319	-4.848	82.736	58.503
-40	45.425	69.844	49.387	38.727	75.280	53.231
-30	93.656	72.812	51.486	93.193	76.082	53.798
-20	166.273	107.017	75.672	164.783	102.368	72.385
-10	269.391	153.670	108.661	258.206	135.996	96.163
0	402.306	213.063	150.658	376.203	181.520	128.354
10	555.787	277.436	196.177	510.519	231.307	163.559
20	706.926	334.586	236.588	635.047	270.951	191.591
30	845.386	370.804	262.198	752.236	294.370	208.151
40	973.482	394.957	279.277	865.541	307.280	217.279
50	1096.439	399.638	282.586	972.322	309.197	218.635

Tabla 12. Diferencias entre pasos de voltaje en condiciones sin drogas y con 10 minutos de CBX 5 μM y PBN 200 μM en 3 CGR registradas en solución extracelular con HEPES como tampón.

Voltaje (mv)	I-II (pA)	I-II ambos en drogas (pA)	II sin drogas - II en drogas (pA)
-80	80.117	24.287	-21.326
-70	63.465	21.047	-10.011
-60	54.708	16.240	-4.916
-50	34.327	10.554	6.367
-40	18.422	6.699	10.242
-30	2.967	0.463	7.812
-20	-12.628	1.490	6.811
-10	-20.021	11.185	33.410
0	-1.177	26.103	74.750
10	31.324	45.268	128.051
20	68.453	71.879	222.275
30	121.980	93.150	309.877
40	160.131	107.941	395.191
50	195.986	124.117	464.586

2. Promedio CGR registradas en solución extracelular tamponada con carbonato.

Tabla 13. Relación voltaje-corriente en el primer (I) y segundo (II) paso de voltaje en 11 CGR registradas en solución extracelular tamponada con carbonato y solución interna con bloqueadores de Kv. El promedio se realizo con mínimo 3 registros. Abreviaciones igual que en la tabla 1.

	I			II		
Voltaje (mV)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)
-80	-16.184	31.423	8.715	-27.910	29.669	8.229
-70	13.992	26.382	7.317	2.423	27.248	7.557
-60	39.997	23.370	6.482	31.979	22.862	6.341
-50	56.522	34.999	9.707	48.939	30.579	8.481
-40	57.318	53.471	14.830	66.094	37.411	10.376
-30	72.942	62.302	17.280	94.604	33.224	9.215
-20	135.701	61.183	16.969	158.016	38.506	10.680
-10	230.852	87.186	24.181	248.247	63.157	17.517
0	329.821	115.444	32.018	350.961	90.171	25.009
10	437.890	144.790	40.157	450.874	119.763	33.216
20	556.368	173.418	48.098	549.520	145.796	40.437
30	675.067	205.977	57.128	648.711	175.466	48.666
40	785.439	241.333	66.934	748.134	203.727	56.504
50	895.867	273.339	75.811	837.671	230.300	63.874

Tabla 14. Relación voltaje-corriente en el primer (I) y segundo (II) paso de voltaje luego de la aplicación de Carbenoxelona (5 μ M) y Probenecida (200 μ M) por 10 minutos en 11 CGR registradas en solución extracelular tamponada con carbonato y solución interna con bloqueadores de Kv. El promedio se realizo con mínimo 3 registros. Abreviaciones igual que en la tabla 1.

	I + Drogas			II + Drogas		
Voltaje (mV)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)	Promedio (pA)	DS (pA)	SEM (pA)
-80	-15.601	34.492	9.566	-25.561	36.364	10.086
-70	11.328	31.736	8.802	4.189	32.760	9.086
-60	34.744	28.016	7.770	29.445	28.413	7.880
-50	51.935	28.496	7.903	47.737	29.398	8.154
-40	67.361	36.427	10.103	68.230	33.186	9.204
-30	82.000	49.060	13.607	99.386	32.895	9.123
-20	138.356	65.325	18.118	156.361	38.523	10.684
-10	221.881	92.983	25.789	235.383	54.681	15.166
0	311.788	107.312	29.763	319.612	67.184	18.634
10	410.989	121.612	33.729	412.385	85.865	23.815
20	510.180	139.823	38.780	505.861	111.162	30.831
30	608.881	159.394	44.208	594.788	136.836	37.952
40	711.596	186.679	51.776	683.168	164.194	45.539
50	800.707	214.706	59.549	767.378	192.934	53.510

Tabla 15. Diferencias entre pasos de voltaje en condiciones sin drogas y con 10 minutos de CBX 5 μM y PBN 200 μM en 11 CGR registradas en solución extracelular tamponada con carbonato y solución interna con bloqueadores de Kv.

Voltaje (mv)	I-II (pA)	I-II ambos en drogas (pA)	II sin drogas - II en drogas (pA)
-80	11.726	9.960	-2.349
-70	11.569	7.139	-1.766
-60	8.018	5.299	2.534
-50	7.583	4.198	1.202
-40	-8.776	-0.869	-2.136
-30	-21.663	-17.386	-4.781
-20	-22.315	-18.005	1.655
-10	-17.395	-13.502	12.864
0	-21.140	-7.824	31.350
10	-12.984	-1.396	38.489
20	6.848	4.319	43.659
30	26.356	14.094	53.924
40	37.305	28.428	64.965
50	58.196	33.329	70.292