



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

**“ROL DE LOS HEMICANALES DE PANEXINA EN LA MIGRACION CELULAR DE
FIBROBLASTOS DERMICOS”**

**UNIDAD DE INVESTIGACION II PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA**

**CAROLINA ANDREA FLORES MUÑOZ
DIRECTOR: Dr. AGUSTÍN DEMETRIO MARTÍNEZ CARRASCO**

VALPARAÍSO, CHILE

2012

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecer al Dr. Agustín Martínez por darme la oportunidad de realizar la tesis de pregrado en su laboratorio, por confiar en mí y en este proyecto.

Quiero agradecer mis padres, por darme las herramientas para poder estudiar, gracias a ambos por las palabras de apoyo en este largo camino que hemos recorrido juntos, a pesar de las adversidades aquí llegamos al final de este camino, esta tesis es de ustedes y de mis hermanas. Gracias incentivarme a conseguir mis sueños, y por ser partícipe de cada uno de ellos, los amo demasiado.

A mis hermanas Javiera, Fernanda y Josefa, gracias por su amor incondicional, por completar mi entorno, y hacer más divertidos los viajes a casa, por esas locuras que sólo las cuatro entendemos, las amo con todo mi corazón.

A la mejor tía abuela Uchi, gracias por todo el cariño y las palabras que necesitaba, por la fuerza que me daban tus mensajes, y a mis primos Fabiola, Matías y Mauricio, por ser el mejor complemento de la familia, por su apoyo incondicional, por los cariños, consejos, retos, risas, etc.

Además debo agradecer a mi amiga de años Camila, porque estuviste conmigo en este camino, cuando viajaba los fines de semana y nos juntábamos a contar historias. Por el apoyo a la distancia, que a pesar de los años aún continúa. También agradecer a Jacqueline, por su apoyo a lo largo de estos años en la Universidad, por las risas, los consejos y todo lo que hemos vivido a lo largo de los años en la licenciatura.

A mi mejor amiga, mi compañera de batalla, de carrera que ha estado en cada etapa que he vivido en Valparaíso, Verónica. Gracias por ayudarme en cada dificultad que he pasado o en cada alegría que he vivido en Valparaíso.

Además agradecer el apoyo incondicional de mis compañeros del laboratorio de conexinas: Jaime, Oscar, Ricardo, Isaac, Alvaro, por los conocimientos que me enseñaron, por hacer del laboratorio un lugar de enseñanza y diversión.

ÍNDICE

MARCO TEÓRICO	5
Panexina 1 (Panx1).....	6
Panexina2 (Panx2).....	6
Panexina3 (Panx3).....	7
Modelos genéticamente modificados	9
Bloqueadores de Panxs y Cxs	9
Receptor P2X ₇ y Panxs	10
Migración Celular.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	16
OBJETIVOS GENERALES	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	17
1. Modelo Animal.....	17
2. Aislamiento y cultivo de fibroblastos dérmicos	17
3. Ensayo Migración Fibroblastos.....	17
4. Bloqueadores Cxs y Panxs	18
5. Electroforesis	19
6. Inmuno Westernblotting.....	19
7. Extracción de RNA y RT-PCR para Panx1 y Panx3.....	21
8. Análisis de Datos.....	22
RESULTADOS	23
1. Cultivo primario de fibroblastos dérmicos.	23
2. Expresión de panexinas 1 y 3, en fibroblastos dérmicos	24
3. Papel de las panexinas en la migración de los fibroblastos dérmicos.	26
4. Papel de las vías de señalización activadas por el receptor P2X ₇ en la migración de fibroblastos dérmicos	33
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIÓN	39
FINANCIAMIENTO	40
REFERENCIAS	41

RESUMEN

Panexina 1 (Panx1) y Panexina 3 (Panx3) son proteínas integrales de membrana que comparten homología de secuencia con la familia de proteínas de uniones en hendidura (UH), inexas (Inxs). Ambas, se expresan en la piel de mamíferos. Para investigar el papel de las Panxs en la migración de los fibroblastos, se emplearon fibroblastos dérmicos de embrionarios de rata de estadio 18 (E18), ratón tipo salvaje y humano.

En este estudio, se determinaron los niveles de Panx1 endógena en los fibroblastos de las especies estudiadas. Mediante westernblot se detectó la expresión de Panx1 (~48 kDa) y sus diferentes isoformas glicosiladas en los fibroblastos de todas las especies estudiadas. Además, se observaron altos niveles de Conexina 43 (Cx43) en los distintos tipos de fibroblastos.

Por otra parte, se realizaron análisis de RT-PCR, para estudiar la expresión de mRNA de Panx1 y Panx3 en los fibroblastos, se observó que el mRNA de Panx1 se encuentra en los fibroblastos de ratón tipo silvestre, por otra parte, se utilizó un control negativo que fueron fibroblastos de ratón knockout para la Panx1 (KO-Panx1), el mRNA de Panx1 no se encontró en estos ratones. El mRNA de la Panx3 se encuentra en los fibroblastos tanto de ratón tipo silvestre y el KO-Panx1. Con estos resultados, se estudió el papel de los hemicanales formados por conexina y panexinas en la migración de los fibroblastos.

Mediante la utilización de bloqueadores específicos de hemicanales de Cx43 (péptidos miméticos de asa extracelular, La³⁺) y de bloqueadores químicos de Cxs, encontramos que la migración de fibroblastos no se afecta por acción de estos bloqueadores. Por lo tanto, en los ensayos de migración de fibroblastos, los hemicanales de Cx43 no participarían en las vías de regulación de la migración.

Por otra parte, utilizando estrategias experimentales similares a las descritas anteriormente se estudió la participación de los hemicanales de Panexinas, Panx1 y Panx3, en la migración de los fibroblastos. Al bloquear los hemicanales de Panx existe un aumento en la migración de los fibroblastos, y a las ocho horas de tratamiento con el péptido mimético ¹⁰Panx (que tiene 100% de homología con la primera asa extracelular de

la Panx1 y un 80 % de homología con la de la Panx3) hay un ~60% de disminución del área de la herida del cultivo. Se determinó que la Panx3 podría tener un rol en la migración de los fibroblastos ya que en los ensayos de migración de fibroblastos de ratón KO-Panx1, también el tratamiento con el ¹⁰Panx mejora la migración en un ~60%. Por último, se determinó que el bloqueo de los receptores purinérgicos P2X₇ no afecta la migración de los fibroblastos; por lo tanto, el ATP no cumple una función principal en la migración de los fibroblastos.

MARCO TEÓRICO

La familia de proteínas de canal llamadas Panexinas (Panxs), es una nueva clase de glicoproteínas integrales de membrana que se han identificado por compartir homología de secuencia con las proteínas de invertebrados llamadas inexas (Inxs), y se propuso que las Panxs comparten características funcionales con las proteínas de unión en hendidura (UH), llamadas conexinas (Cxs) (Panchin, Kelmanson et al. 2000).

A diferencia de la familia de Cxs que se compone de 21 miembros, la familia de Panxs se compone sólo de tres genes (Panx1, Panx2 y Panx3) (Baranova, Ivanov et al. 2004). Estas proteínas tienen similitud topológica, pero homología mínima de aminoácidos en comparación a las otras proteínas de UH. Esta familia de proteínas integrales de membrana se identificó por primera vez en mamíferos en el año 2000 por Panchin y sus colegas (Panchin, Kelmanson et al. 2000).

Si bien, no existe homología de secuencia entre Panxs y Cxs, las tres familias de las Panxs exhiben una topología similar a Cxs, con cuatro dominios de transmembrana, dos asas extracelulares (EL), y un asa intracelular (IL), un amino terminal (NT), y un carboxilo terminal (CT) expuesto al citoplasma (Baranova, Ivanov et al. 2004; Boassa, Ambrosi et al. 2007) (Figura 1). Entre los miembros de la familia de Panxs, la región del NT es el dominio más altamente conservado, mientras que la más alta variabilidad de secuencia se encuentra en el dominio CT (Yen and Saier 2007).

Los oligómeros de Panxs a menudo son llamados panexones (Figura 1) (Boassa, Ambrosi et al. 2007), siguiendo la nomenclatura establecida para Cxs donde los oligómeros se denominan conexones o hemicanales (HC) (Saez, Berthoud et al. 2003).

Panexina 1 (Panx1)

Distintos niveles de Panx1 se expresan de forma ubicua en tejidos de mamíferos, determinados mediante análisis de Northernblots (Baranova, Ivanov et al. 2004). Específicamente se expresa en el sistema nervioso central, también se expresa en el corazón, pulmón, cartílago de la oreja y cola de ratones, etc. Además de expresarse en la piel, especialmente en los queratinocitos y miofibroblastos (Bruzzone, Hormuzdi et al. 2003; Baranova, Ivanov et al. 2004).

Se ha demostrado que Panx1 se activa por estrés mecánico, lo que indica que podría funcionar, en parte, en el proceso de mecanotransducción (Bao, Locovei et al. 2004). Dentro de otras de las funciones en las cuales podría participar Panx1, es en la ruta de señalización paracrina mediante la formación de canales de membrana que son permeables a ATP (Locovei, Scemes et al. 2007),

Participa en la respuesta inmune mediante la asociación con el receptor P2X desencadenando una cascada de señalización (inflammasoma) involucrada en la activación de la caspasa-1 y el procesamiento de la interleucina 1 (1L-1) proveniente de macrófagos (Pelegriin and Surprenant 2006). Además, Panx1 ha sido implicada en la fuga de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico (Vanden Abeele, Bidaux et al. 2006).

Por otra parte, Panx1 se encuentra predominantemente en la superficie celular y en la superficie intracelular de los queratinocitos humanos. Lo que sugiere que esta Panx podría tener distintas funciones en la diferenciación de la piel, el mantenimiento o la regeneración de esta (Penuela, Bhalla et al. 2007).

Panexina2 (Panx2)

El transcrito de Panx2 parece más restringido a varias áreas del cerebro humano adulto. El análisis de Northernblot revela altos niveles de transcripción de Panx2 en el cerebro de roedores, la medula espinal y de los ojos, y bajos niveles en tiroides, riñón e hígado (Bruzzone, Hormuzdi et al. 2003).

Panexina3 (Panx3)

Panx3, se encuentra expresada en células como los osteoblastos, fibroblastos sinoviales, además de tejidos como cartílago del oído interno, en bajos niveles transcripcionales en extractos de hipocampo humano (Baranova, Ivanov et al. 2004).

Se ha demostrado que Panx3 exhibe dos formas de ~43 kDa y ~70 kDa en la piel (Penuela, Bhalla et al. 2007).

Por otra parte, al igual que Panx1, Panx3 se encuentra predominantemente en la superficie celular y en localizaciones intracelulares en los queratinocitos, lo que podría implicar que Panx1 y Panx3 estarían participando en diversas funciones en la diferenciación de la piel, mantenimiento o regeneración de esta, Panx3 participa en la diferenciación de los queratinocitos (Celetti, Cowan et al. 2010). Sin embargo, no se conoce si Panx3 se expresa en fibroblastos.

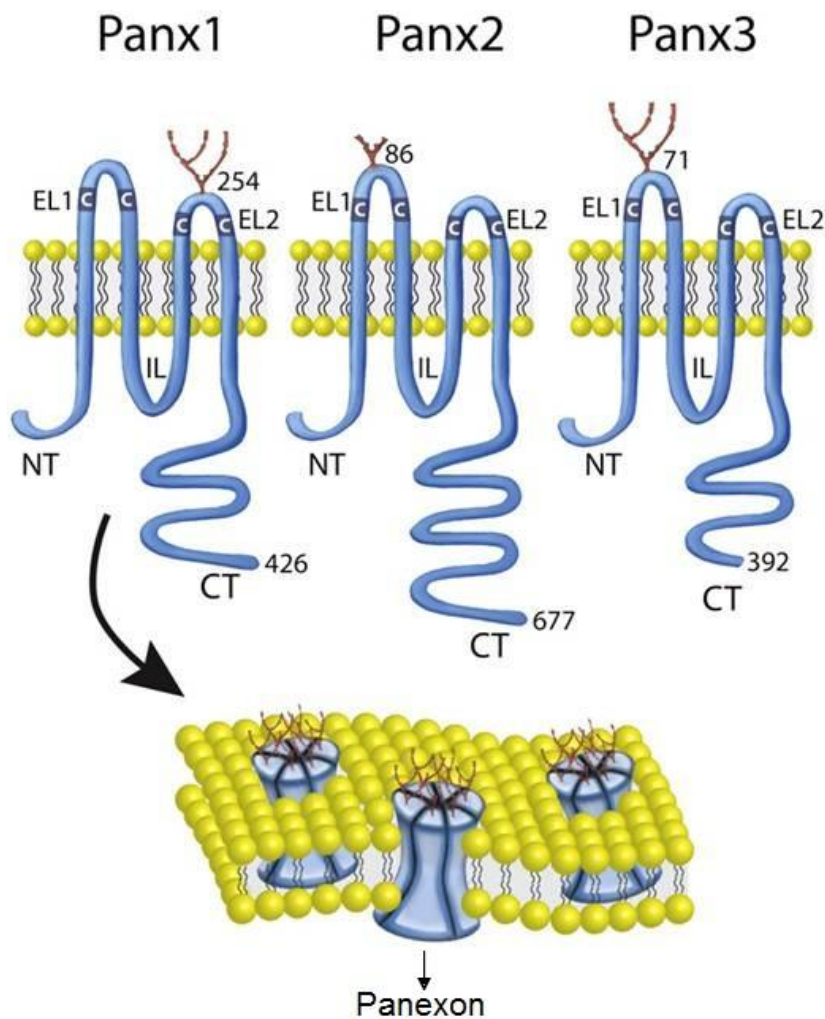


Figura 1: Topología membranar de los tres miembros de la familia de Panxs y formación de panexones. Las Panxs son proteínas con cuatro dominios de transmembrana, tienen dos asas extracelulares (EL1-EL2), además de un asa intracelular (IL), amino terminal (NT) y carboxilo terminal (CT) (Penuela, Gehi et al. 2012).

Modelos genéticamente modificados

Para los estudios de las funciones fisiológicas de Panxs, diversos grupos científicos han generado modelos de ratones con delección de genes específicos (knockout (KO)). Dada la expresión ubicua de Panx1 en muchos tejidos de ratón, en el caso del ratón KO-Panx1 mayoritariamente los autores no reportan alteraciones importantes en la anatomía y en la salud general de estos ratones. Con el primer estudio con KO-Panx1, se realizaron cultivos cocleares, en los cuales se demostró que los HC de Cx26 y Cx30, y no en los HC de Panxs, son responsables de la propagación de ondas Ca^{2+} intracelular inducidas por ATP (Anselmi, Hernandez et al. 2008).

Se han estudiado otros ratones KO-Panx1 en los que se ha demostrado que la Panx1 no se requiere para la activación de inflammasoma pero si es necesaria para la liberación de factores quimiotácticos como señales para activación de las células fagocíticas y para la apoptosis (Scemes, Suadiciani et al. 2007). Dada la aparente morfología y fisiología normal que presentan los ratones KO-Panx1, es posible que la compensación de otros miembros de la familia de las Panxs esté en juego (Penuela, Gehi et al. 2012).

Bloqueadores de Panxs y Cxs

Ambas proteínas, Panxs y Cxs, tienen una alta sensibilidad a fármacos de uso habitual, los cuales bloquean HC como lo hace, por ejemplo carbenoxolona (CBX). La CBX es una molécula conocida por ser capaz de inhibir algunos subtipos de proteínas formadoras de HCs; actúa con gran eficacia sobre HCs de Panxs (en el rango μ M de concentración) y en altas concentraciones también puede inhibir los HCs de Cxs. Además, CBX también inhibe el receptor $P2X_7$ en concentraciones micromolares (Benfenati, Caprini et al. 2009).

Probenecid, es otro fármaco utilizado para bloquear Panxs, es utilizado para el tratamiento de la gota; el mecanismo de acción es desconocido, aunque se pensaba que actuaba sobre los transportadores de aniones orgánicos, sin embargo, no se descarta que el mecanismo sea a través del bloqueo de los HCs de Panxs. Se ha demostrado que Probenecid afecta la liberación de ATP, lo cual conduce a la sugerencia de que la

liberación de ATP ocurre por un transportador de aniones orgánicos, aunque el ATP también podría liberarse a través de HCs de Panxs. Probenecid inhibe las corrientes mediadas por canales de Panx1, pero este fármaco no afecta los canales formados por Cxs (Silverman, Locovei et al. 2008).

Además, existen péptidos miméticos que corresponden a partes específicas de la proteína a estudiar, muchos de estos péptidos miméticos corresponden a secuencias de aminoácidos de las asas extracelulares, y son capaces inhibir de manera más específica a los canales formados por Cxs y Panxs (D'Hondt, Ponsaerts et al. 2009). Sin embargo, Pelegrin y cols. (2006) describieron que el péptido mimético ¹⁰Panx, también bloquea los canales de Cx46, pero a concentraciones muy altas, estos datos con consistentes son la homología estructural entre Cxs y Panxs.

En esta unidad de investigación se utilizarán los péptidos; P5 y ¹⁰Panx, donde el P5 corresponde a una secuencia de aminoácidos de la segunda asa extracelular de la Cx43 (Davidson, Green et al. 2012). El péptido mimético de Panx1 (llamado ¹⁰Panx), corresponde a una secuencia de aminoácidos de la primera asa extracelular de la Panx1, este péptido bloquea UH y HC de Panx1 (Pelegrin and Surprenant 2006). Finalmente, se utiliza La³⁺, que bloquea HC de Cxs pero no de Panxs (Pelegrin and Surprenant 2006).

Receptor P2X₇ y Panxs

Los receptores de nucleótidos extracelulares (los receptores P2) son un foco de creciente de atención en la biología. Por ejemplo, el ATP extracelular causa la vasodilatación, probablemente mediada por la liberación de óxido nítrico, o, alternativamente, la vasocontracción, probablemente mediada por la estimulación directa de receptores purinérgicos en las células musculares lisas. Además, el ATP induce la secreción de citoquinas, la quimiotaxis de células inflamatorias, proliferación de células musculares lisas, o citotoxicidad (Boarder and Hourani 1998), entre muchas otras funciones.

Efectos de nucleótidos extracelulares están mediados por la activación de dos familias distintas de receptores de superficie celular, P2X y P2Y. Recientemente se ha investigado

la expresión y función del receptor P2X₇ en fibroblastos humanos, además se ha descubierto que las respuestas mediadas por P2X₇ en fibroblastos humanos se potencian cuando estas células se cultivan en presencia de glucosa (Ralevic and Burnstock 1998). El receptor P2X₇ es un receptor P2 más intrigante por su capacidad para experimentar una transición de poro que genera una membrana selectiva permeable a moléculas hidrófilas de masa molecular de hasta 900 kDa (Solini, Chiozzi et al. 2000).

Al parecer Panx1 se expresa en todas las células que liberan ATP a través de canales. Un ejemplo notable, es el sistema vascular periférico, en el que se desencadena la liberación de ATP. El mecanismo de liberación de ATP se debe activar por unión del ATP al receptor purinérgico. El canal de Panx1 cumple con este criterio, ya que, se activa por ATP extracelular, a través de receptores purinérgicos (Pelegriin and Surprenant 2006). Tanto los receptores metabotrópicos P2Y y el receptor ionotrópico P2X₇ son capaces de activar canales de Panx1. La activación de HC de Panx1 por ATP a través del receptor P2X₇ no requiere calcio extracelular. Además el receptor P2X₇ co-inmunoprecipitado con Panx1, sugiriendo que el mecanismo de activación puede ser por interacción proteína-proteína (Anselmi, Hernandez et al. 2008)

Migración Celular

La migración celular es un proceso fundamental que no sólo tiene un papel crucial en la vida temprana que se produce cuando ocurre la embriogénesis. También es esencial para muchas funciones fisiológicas del organismo adulto, por ejemplo para la vigilancia inmune, la angiogénesis y la cicatrización de heridas, etc. (Kameritsch, Pogoda et al. 2012).

Estudios han demostrado que una disminución en la expresión Cxs, especialmente Cx43, es necesaria para la cicatrización eficiente de heridas (Goliger and Paul 1995). Agentes que reducen la expresión del gen de Cx43, en incisiones en ratones normales aceleran el cierre de la herida (Kretz, Euwens et al. 2003; Qiu, Coutinho et al. 2003; Mori, Power et al. 2006).

En ratones KO-Cx43, al reducir la expresión de los genes de Cx43 se produce un cierre acelerado de la herida en la piel de estos ratones (Kretz, Euwens et al. 2003).

La utilización de péptidos miméticos aumenta las tasas de migración celular y cierre de la herida en los queratinocitos epidérmicos de ratón (Kandyba, Hodgins et al. 2008), los queratinocitos y los fibroblastos dérmicos de humanos (Wright, van Steensel et al. 2009).

Antecedentes previos sobre la migración, muestran que el bloqueo de UH favorece la migración celular. Utilizando los péptidos miméticos para la Cx43, GAP 26 y GAP 27, se observó que donde las UH se encontraban bloqueadas, la migración se vio favorecida (Churko, Shao et al. 2011). Otros estudios sugieren que la modulación de la Cx43 de la dirección de la migración de las células consiste en la regulación de la dinámica de tubulina, mientras que la comunicación celular mediada por canales de uniones en hendidura (GJCh) de Cx43 puede ser prescindible (Francis, Xu et al. 2011). Sin embargo, hay quienes sugieren que existe un aumento de la expresión de Cx43 en la migración celular de fibroblastos (Huang, Cooper et al. 1998). No se ha estudiado el papel de los HCs de Panxs en este proceso de migración celular.

En esta unidad de investigación, estudiaremos la expresión de las Panxs en los fibroblastos dérmicos, y el rol que podrían tener los HC de Panx1 en la migración de los fibroblastos, para esto se utilizaran fibroblastos dérmicos, de ratón tipo silvestre, embriones de rata de estadio 18, y humano.

Parte de los antecedentes que me permiten fundamentar este trabajo, se derivan de resultados previos descritos en la tesis de Catherine Estay (no publicados). En la tesis de Catherine Estay se determinó que durante la migración de los fibroblastos de rata las células migrantes captan el trazador fluorescente bromuro de etidio desde el medio extracelular (Figura 2, siguiente hoja), aún en presencia de calcio extracelular y de La^{3+} , condición que bloquea HCs de Cxs. Estos datos sugieren que existe una vía de captación independiente de los HCs de Cx que se activa durante la migración de los fibroblastos, nosotros proponemos que esta vía alternativa es a través de HCs de Panxs y que ellos participan en la regulación de la migración.

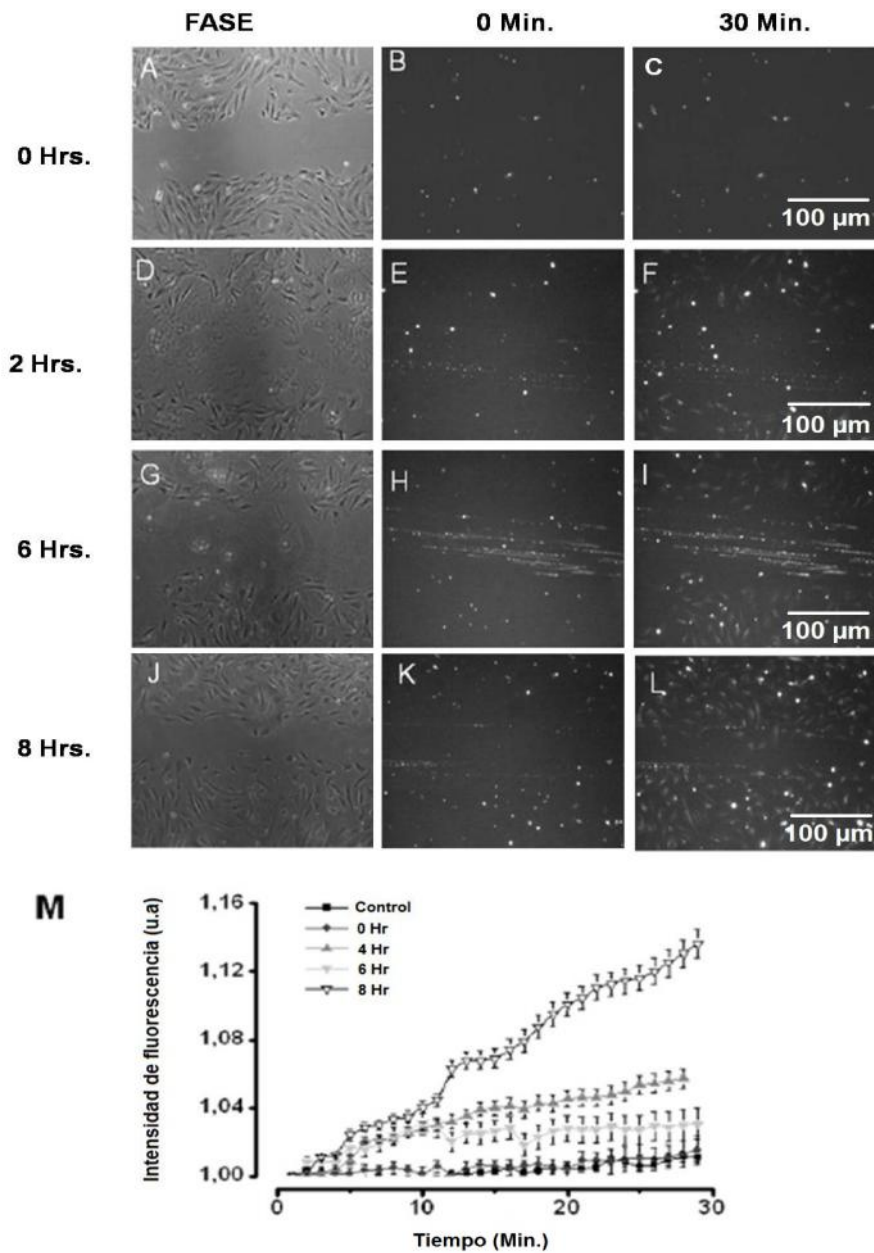


Figura 2: Los fibroblastos migrantes presentan HCs funcionales. Se evidenció la incorporación del trazador fluorescente etidio en fibroblastos migrantes en presencia de 2 mM Ca^{2+} extracelular. **(A-L)** Se muestran imágenes fotográficas de tiempos representativos durante la migración de fibroblastos en periodos de tiempo de cada dos horas hasta las ocho horas de experimento. **(M)** Gráfica representativas del aumento de intensidad de fluorescencia por célula durante un curso temporal de incorporación de etidio. Las fotografías analizadas fueron tomadas cada 1 minuto durante 30 minutos (Estay Catherine et al., 2011; resultados no publicados).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se determinó mediante estudios preliminares en nuestro laboratorio en procesos de migración celular en fibroblastos existe un aumento en la captación de trazadores fluorescentes en los fibroblastos migrantes que se encuentran cercanos a la herida del cultivo; a medida que transcurre el tiempo de migración sigue aumentando la captación por un mecanismo insensible a calcio extracelular. Además, estudios previos de otros laboratorios muestran que los bloqueadores no selectivos de Cxs aceleran la migración de los fibroblastos.

Con estos antecedentes, nos planteamos que los HCs activos durante la migración se deben a HCs de Panxs, más que a HCs de Cxs, por lo tanto nos preguntamos si las Panxs se encuentran expresadas en los fibroblastos, y si ejercen una función en la migración de los fibroblastos. Además, se estudiará si esta función se encuentra asociada a un posible complemento funcional de las Panxs y el receptor purinérgico P2X₇, el que previamente se ha determinado interactúa funcionalmente y estructuralmente con Panx1.

Todas estas interrogantes se intentaran responder en esta unidad de investigación.

HIPÓTESIS

“Los hemicanales de panexinas participan en las vías de regulación del proceso de migración de los fibroblastos. La disminución de la actividad de los HCs de Panxs con bloqueadores específicos provoca un aumento en la migración de los fibroblastos”

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Estudiar papel de hemicanales de Panxs y hemicanales de Cx43 en el proceso de migración celular *in vitro* de fibroblastos neonatales de ratón, rata y humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar el cultivo celular primario de fibroblastos dérmicos neonatales de ratón.
2. Estudiar la expresión de Panxs en fibroblastos dérmicos.
3. Determinar si hemicanales de Panx o Cx43 regulan el proceso de migración en los fibroblastos dérmicos de las especies estudiadas.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1. Modelo Animal

Se utilizaron embriones de 18 días de rata *Sprague-Dawley*, neonatos de ratón tipo silvestre (C57BL10) y neonatos de ratón KO-Panx1 (C57BL10-Panx1), provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, en cumplimiento de todas las normas éticas referidas a la utilización de animales.

2. Aislamiento y cultivo de fibroblastos dérmicos

Se utilizó el procedimiento descrito por Lichti y colaboradores (Lichti, Anders et al. 2008). Los ratones se decapitaron e inmediatamente se les removió la piel bajo condiciones de asepsia. Las muestras de piel fueron lavadas a lo menos cinco veces con una solución que contenía PBS 1X suplementado con antibióticos (penicilina 100 unds/ml y estreptomycinina 100 µg/ml, HyClone). Se realizó una disgregación de la piel en una placa de vidrio estéril de 100 mm, para facilitar las sucesivas digestiones con colagenasa II (3 mg/ml, Worthington) se dejó incubando por 1,5 horas.

Luego de las 1,5 horas, el producto de las digestiones se transfirió a una placa de cultivo de vidrio estéril de 100 mm, posteriormente, se cambió el medio por DMEM-F12 suplementado con 10% de SBF, los fibroblastos se dejaron proliferar durante 24 horas en un ambiente controlado a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad.

3. Ensayo Migración Fibroblastos

Los fibroblastos que se encontraban a una confluencia del 100% fueron tripsinizados con 1,5 ml de Tripsin- EDTA 1X (HyClone). Se cultivaron en placas petri de 35 mm que contenían en su interior cubreobjetos de vidrio de 25 mm, se mantuvieron en medio DMEM-F12 (al 10% SBF). Posteriormente, se dejaron proliferar los fibroblastos durante 24 horas que se alcanza el 100% de confluencia, en un ambiente controlado a 37°C. Transcurrido el tiempo, se mantuvieron los fibroblastos en medio DMEN-F12 (al 1% SBF) por 24 horas antes del experimento, en un ambiente controlado a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de humedad.

Para realizar el ensayo de migración se utilizó la técnica de daño en el cultivo y recuperación (Wound Healing Assays). Se realizó el daño en el cultivo con una punta de 200 μ l, con la cual se trazó un camino a través de la placa (Figura 3), seguidamente se cambió el medio por HAM-F12 suplementado con SBF al 10%. Después, se procedió a registrar fotografías recorriendo camino trazado por el daño en el cultivo con el microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200-U) durante un curso de tiempos de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 horas, todo esto se observo con el objetivo 10X.

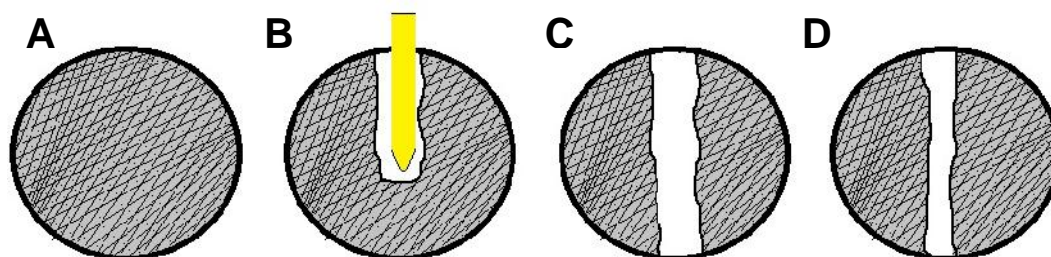


Figura 3: Ensayo de la herida. Se realiza una herida en el cultivo celular, para luego observar el cierre progresivo de la herida. **(A)** Células confluentes al 100%. **(B)** Con una micropipeta se realiza una herida a través de la monocapa de células. **(C)** Se procede a medir el límite de la herida en la pre-migración. **(D)** Las células comienza el cierre progresivo de la herida por la migración de las células.

4. Bloqueadores Cxs y Panxs

Para los ensayos de migración de los fibroblastos se utilizo bloqueadores específicos para Cxs y Panxs, como péptidos miméticos para bloquear HC y UH, y también sustancias químicas.

Para el bloqueo de Cx43, se utilizo el péptido mimético, péptido 5 (VDCFLSRPTEKT, 200 μ M, Auckland University), este péptido fue disuelto en 1 ml de HAM-F12, y se agregó a la placa a utilizar, y se dejó durante 20 minutos en la incubadora en un ambiente controlado a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de humedad. Y el Scrambled P5 (200 μ M, Auckland University).

Para el bloqueo de Panx1 se utilizo el péptido mimético, péptido ¹⁰Panx (WRQAAFVDSY, 200 μ M, Tocris Bioscience), este péptido fue disuelto en 1 ml de HAM-F12, se dejó

incubando 20 minutos, en un ambiente controlado a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de humedad. Además, de la utilización del Scrambled ¹⁰Panx (FSVYWAQADR, 200 µM, Tocris Bioscience).

También se utilizaron los bloqueadores químicos como CBX (100 µM, 5 µM, Sigma Aldrich), Probenecid (200 µM, Sigma Aldrich) y Lantano (200 µM, Sigma Aldrich), cada uno fue preparado en 1 ml de HAM-F12 suplementado con SBF al 10%, y se dejaron incubar para su posterior análisis. Transcurrido el tiempo de incubación, se prosiguió a capturar las fotografías siguiendo el protocolo de migración de fibroblastos descrito anteriormente.

5. Electroforesis

Los fibroblastos se cosecharon en frío con una solución de PBS 1X con PMSF (2 µl de PMSF con 1 ml de PBS 1X). Con ayuda de un rastrillo de goma de borde liso, se raspó suavemente la superficie de la placa para desprender la mayor cantidad de células posibles. Una vez desprendidos los fibroblastos, se traspasaron a un tubo eppendorf de 1,6 ml, luego se centrifugó a 14000 rpm por cinco minutos en la ultracentrífuga. Terminada la centrifugación, cada muestra fue resuspendida en una solución que contenía un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas a un volumen que representaba el doble de su pellet, y se procedió a romper las células en el sonicador de vástago. Todo el procedimiento fue realizado sobre hielo. La cuantificación de proteínas se realizó con el fluorómetro Qubit siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Para la detección se cargaron entre 100 a 75 µg de extracto proteico según la proteína a determinar. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70 V.

6. Inmuno Westernblotting

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membranas de PVDF (Amersham) en una cámara de transferencia semiseca (BioRad). Las membranas de PVDF tienen gran capacidad de unión a proteínas y gran resistencia

mecánica pero son hidrofóbicas. Las membranas de PVDF fueron acondicionadas primero en metanol, por treinta segundos, luego en agua destilada por diez minutos y finalmente en tampón de transferencia 1X, durante treinta minutos. Posteriormente, se depositaron sobre la cámara de transferencia (BioRad) 3 trozos de papel Whatman 3 mm, de las mismas dimensiones del gel, humedecidos en tampón de transferencia 1X, sobre estos, se puso la membrana de PVDF previamente acondicionada, y sobre ella el gel que contenía las muestras, finalmente se pusieron otros 3 trozos de papel Whatman 3 mm humedecidos en Tampón de Transferencia 1X, sobre el gel. Se cerró la cámara y se inició la transferencia a 17 V y 300 mA por una hora.

Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,05%, leche descremada 5%) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes según el ensayo: Anti-rabbit Panx1 (Abcam, dilución 1:1000), Anti-rabbit Cx43 (Sigma, dilución 1:1000) y Anti-rabbit Panx1 (Inmunoprecipitado, dilución 1:1000) toda la noche a 4°C con agitación suave. Posterior a la incubación las membranas se lavaron 5 veces por 5 min en TBS 1X/Tween-20 al 0,05%, e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios Anti-Rabbit IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch, dilución 1:5000) Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas 6 veces con TBS 1X/Tween-20% al 0,05%, fueron incubadas con 2 ml de un reactivo quimioluminiscente (ECL Plus, Amersham), durante cinco minutos en oscuridad, la membrana ya tratada fue depositada sobre un cassette y sobre esta se puso una mica, para proteger la membrana, luego sobre esta se puso una placa fotográfica de las mismas dimensiones de la membrana y se mantuvo en exposición durante un tiempo suficiente para visualizar las bandas. Luego la placa fotográfica fue sumergida en una solución reveladora fotográfica, hasta que se visualizaron las marcas en el film y se transfirió a una solución fijadora fotográfica por cinco minutos, el film (BioMax Light Film, Kodak) fue lavado con agua destilada y secado para el análisis.

7. Extracción de RNA y RT-PCR para Panx1 y Panx3

El RNA total de los fibroblastos dérmicos se extrajo utilizando el kit SV Total RNA Isolation (Promega) se siguió el protocolo descrito por el fabricante. La concentración de RNA total se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm, y se confirmó su integridad mediante su migración electroforética en geles de agarosa al 10% con Gel Star. Posteriormente, se realizó la reacción de transcriptasa reversa, se utilizó un total de 5 µg de RNA para la síntesis de cDNA con el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), se siguió el protocolo descrito por el fabricante. La concentración del cDNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm.

Posteriormente, para el PCR se realizó una reacción total de 25 µl, mediante la utilización de 12,5 µl de Green Taq PCR Master Mix (Promega), 0,1 µl de partidor sense, 0,1 µl de partidor antisense y 12,3 µl de agua libre de RNasa.

Los partidores se diseñaron a partir de secuencias descritas en NCBI; se utilizó la secuencia para Panx1 de ratón (Secuencia de referencia: NM_019482.2) y para Panx3 de ratón (Secuencia de referencia NM_172454.2), estos partidores fueron sintetizados en IDT (Integrated DNA technologies).

Los cDNA de las distintas líneas celulares fueron amplificados usando los partidores específicos para Panx1 (sense: 5'- CTC GGA CTT CTT GCT GAA GG-3'; y antisense: 5'- GAT TCA GAA GCC TCT GGC GA-3') y para Panx3 (sense: 5'-TAC ATG CTC TCT GAT GCC CT-3'; y antisense: 5'-TTT GAG GGT TCT AAG CCA GC-3'), con productos de amplificado de 1235 pb y 1109 pb, respectivamente.

Todos los productos de reacción fueron analizados después de 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo estuvo dado por pasos consecutivos de 3 min a 95°C, 15 seg a 94°C, 54°C (Panx1) y 53°C (Panx3) (T_m).

Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa al 1% que contenía 5 µl de Gel Star (Invitrogen). Se visualizaron bajo luz ultravioleta, las fotografías fueron capturadas por el programa de ENDURO™ GDS Gel.

8. Análisis de Datos

Para la migración de fibroblastos se utilizó el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Con el cual se midió el área de la herida en un curso temporal de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 horas, los datos del área arrojados por programa ImageJ, fueron transformados a μm^2 . Para transformar los pixeles a μm^2 , con la regla del microscopio Nikon Eclipse TE200-U, se fijó en área de un cuadrado de $10 \mu\text{m}^2$, cuya área equivale a 23700 pix^2 . El área del cuadrado nos divide el área de la herida. El área de la herida de cada uno de los controles se realizó la diferencia entre cada uno.

Los gráficos se realizaron con el programa Origin Pro 8 (OriginLab), en el cual se realizó el análisis con t-student, además de error estándar de cada uno de los controles.

RESULTADOS

1. *Obtención del cultivo primario de fibroblastos.*

Debido a que la expresión de Cxs y Panxs puede variar dependiendo de la especie, decidimos hacer un estudio en fibroblastos de tres especies. Se realizaron cultivos primarios de fibroblastos dérmicos de rata, humano y ratón tipo silvestre y KO-Panx1 (ver métodos). De la extracción de la piel de las especies estudiadas, se logró obtener una confluencia del 100% del cultivo celular (Figura 4). La utilización de la enzima colagenasa tipo II, en tratamiento de los tejidos, permitió obtener una separación más eficiente de los fibroblastos de los otros tipos celulares presentes en la piel de las especies utilizadas.

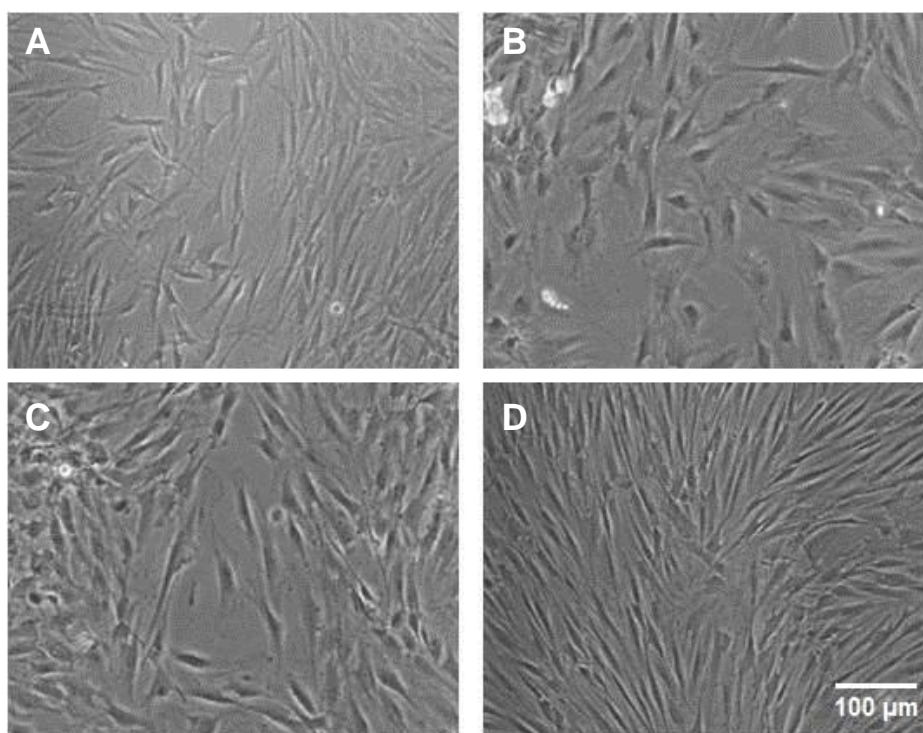


Figura 4: Cultivo celular de fibroblastos de distintas especies. Fotografías obtenidas en contraste de fase con un microscopio de epifluorescencia invertido (Nikon Eclipse TE200-U). **(A)** Cultivo de fibroblastos de rata E18. **(B)** Cultivo fibroblastos de ratón tipo silvestre. **(C)** Cultivo de fibroblastos de ratón KO-Panx1. **(D)** Cultivo fibroblastos de humano. Fotografías con aumento 10x.

2. Expresión de panexinas 1 y 3, en fibroblastos dérmicos

Se estudió la expresión de Panxs y de Cx43 en los cultivos celulares de fibroblastos mediante la realización de un westernblot (ver métodos). El análisis por westernblot confirma que los fibroblastos dérmicos de las distintas especies estudiadas expresan Panx1 con la masa esperada de 48 kDa (Figura 5-A). También, se detectan diversas isoformas glicosiladas de Panx1 (Figura 5-A). Como se esperaba, no se detectó expresión de Panx1 en extractos de fibroblastos dérmicos de ratón KO-Panx1. Además de Panx1, los fibroblastos dérmicos también expresan Cx43 (Figura 5-B).

Debido a que los anticuerpos comerciales de Panx1 podrían tener reacción cruzada con otras proteínas, ya que no contamos con anticuerpos para Panx3, se estudió la expresión de Panxs a nivel de su transcrito mediante RT-PCR. Se confirma la expresión del mRNA de Panx1 y de Panx3 en fibroblastos de las tres especies, y la nula expresión del transcrito de Panx1 en los cultivos de fibroblastos de ratón KO-Panx1 (Figura 5).

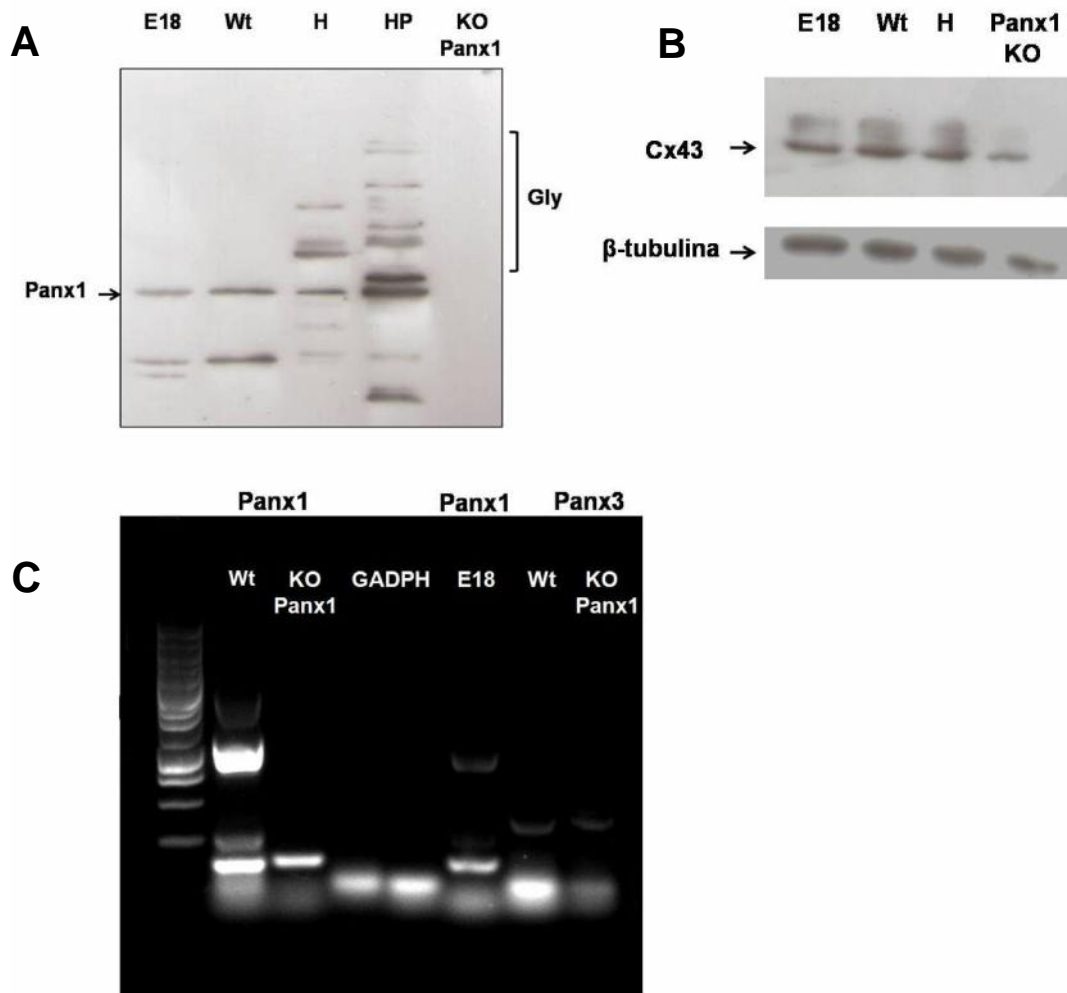


Figura 5: Expresión de Panxs 1 y 3 y de Cx43 en fibroblastos dérmicos. (A) Westernblot de Panx1, muestra la expresión de Panx1 (~48 kDa), y sus diversas isoformas glicosiladas (Gly). (B) Westernblot de Cx43 (~45 kDa), de extractos de fibroblastos de las tres especies estudiadas. (C) mRNA Panx1 y Panx3 detectado por RT-PCR en Fibroblastos de ratón y rata. Representaciones **E18**: fibroblastos de embriones de rata de estadio 18, **Wt**: fibroblastos de ratón wild type, **H**: fibroblastos de humano, **HP**: Células HeLa Parental, **KO-Panx1**: fibroblastos de ratón KO-Panx1.

3. La inhibición de los Hemicanales de Panexina acelera la migración de los fibroblastos.

Los ensayos de migración fueron realizados en un curso temporal de 24 horas, con temperatura controlada de 37°C. En figura 6, muestra imágenes representativas del área de la herida del cultivo y la posterior repoblación del área dañada por migración de los fibroblastos contiguos a la herida. Este protocolo experimental se utilizó para todos los experimentos de migración que se presentan en esta tesis.

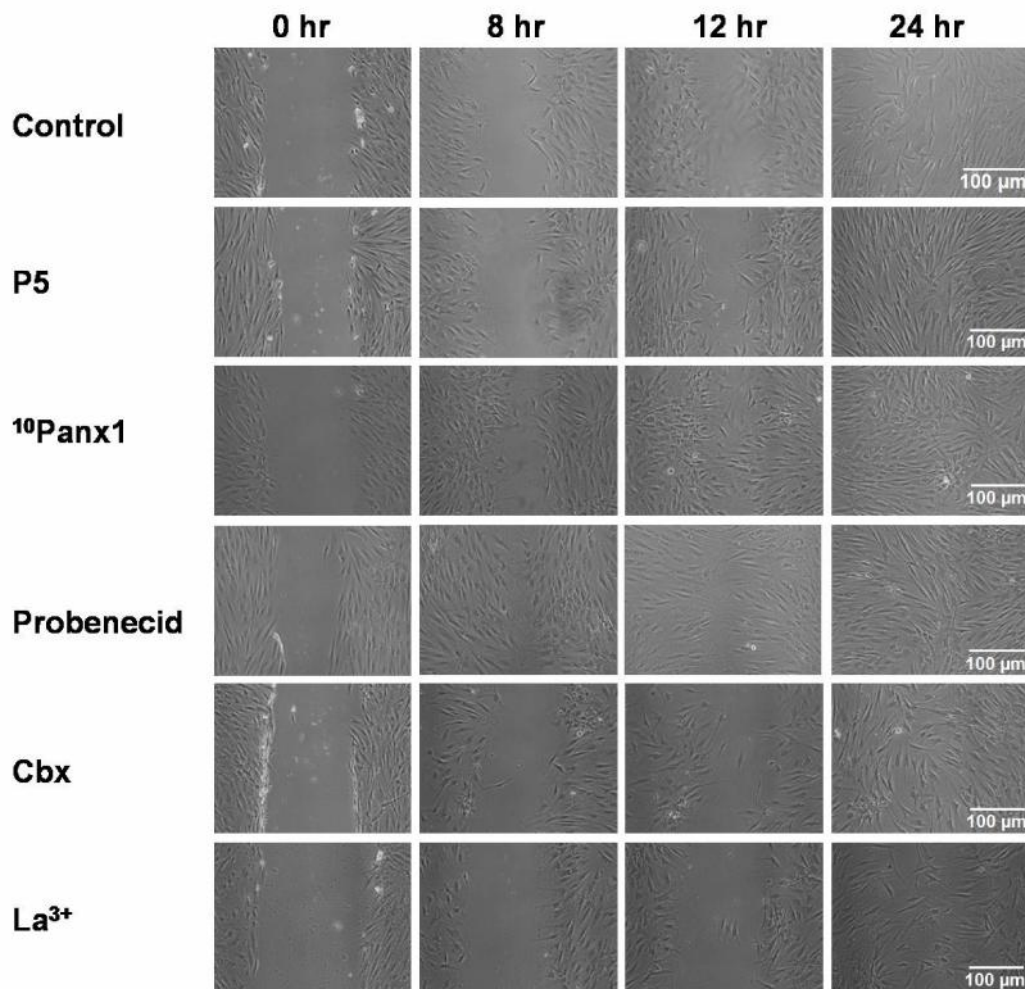


Figura 6: El bloqueo de los de hemicanales de Panexinas aceleran la migración de los fibroblastos de rata. Imágenes representativas de los experimentos de migración en un curso temporal de 24 horas.

Encontramos que tanto Probenecid como $^{10}\text{Panx}$, pero no P5 y La^{3+} , aceleran la recuperación del área dañada del cultivo. A continuación, se presentan cuantificaciones de estos experimentos.

Se utilizaron bloqueadores específicos para HCs de Cx43, como el La^{3+} (200 μM), el péptido mimético P5 (200 μM), y su control negativo, el péptido scrambled de P5 (Sc. P5; contiene los mismos aminoácidos que el P5 pero en otra secuencia) (200 μM) y el inhibidor no selectivo CBX (100 μM).

Como se observa en las curvas de disminución del área dañada del cultivo, existe una paulatina recuperación del cultivo, que llega casi a un 100 % de recuperación a las 24 hrs post daño para los cultivos de las tres especies (Figura 7 A-C). Solo los tratamientos con P5 aceleran levemente la migración de los fibroblastos de todas las especies estudiadas (Figura 7). Por el contrario, la incubación con La^{3+} , que inhibe HCs de Cx, parece desacelerar levemente la migración de los fibroblastos humanos, lo que no se observa para los fibroblastos de las otras especies (Figura 7-D, siguiente).

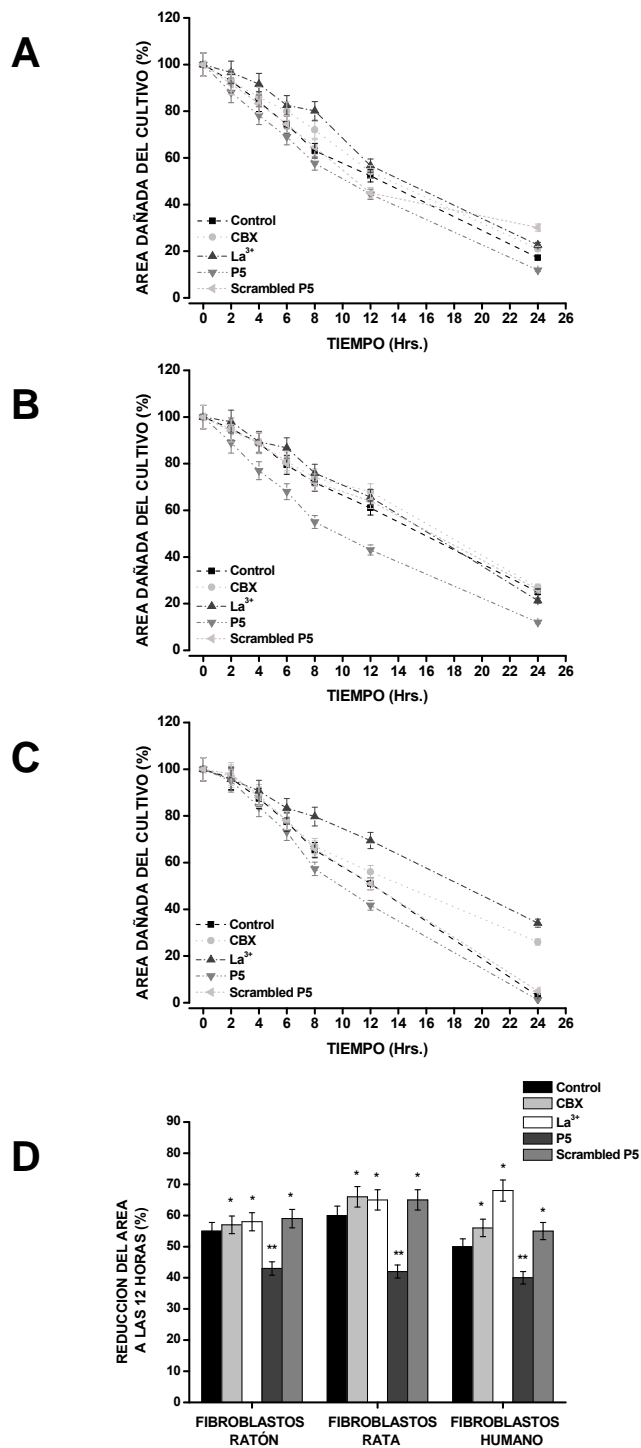


Figura 7: Efecto de la inhibición de los hemicanales de Cx43 sobre la migración de fibroblastos de rata, ratón y humanos. Las curvas representan el curso temporal de reducción

del área dañada por migración de fibroblastos posterior a la herida en el cultivo en los distintos tratamientos. **(A)** Migración fibroblastos de rata E18. **(B)** Migración fibroblastos de ratón silvestre. **(C)** Migración fibroblastos de humano. **(D)** Consolidado de los resultados anteriores expresados como reducción del área dañada a las 12 hrs de tratamiento, tiempo en el que en los controles se recupera el 50 % del área. Resultados significativos comparados con el control (por t-Student) *p 0,05, **p 0,02. (n=10).

Estos resultados sugieren que la inhibición de los HCs de Cxs no afecta mayormente la migración de los fibroblastos de las tres especies estudiadas. Por lo tanto, nos preguntamos si al bloquear HC de Panxs se observaría la misma tendencia o un efecto más significativo. Es por esto, que se procedió a bloquear los HC de Panxs con Probenecid (200 μ M) y 10 Panx (200 μ M). Además de la utilización del péptido control Sc. 10 Panx, y del bloqueador no selectivo, CBX (5 μ M).

En la Figura 8, se observa que tanto Probenecid como 10 Panx inducen una significativa aceleración de la migración de los fibroblastos de todas las especies estudiadas. A las 12 hrs de tratamiento, Probenecid y 10 Panx reducen en aproximadamente un 90% y 80% el área dañada de los cultivos de fibroblastos de las tres especies, muy por sobre el 50% de reducción observado en los cultivos controles o en aquellos tratados con el péptido control Sc. 10 Panx (Figura 8-D). Estos resultados indican que el bloqueo de los HCs de Panxs acelera significativamente la migración de los fibroblastos independiente de la especie estudiada. Sin embargo, el tratamiento con CBX (5 μ M), a una concentración que supuestamente bloquea principalmente HCs de Panxs, no tiene efectos sobre la migración de los fibroblastos (Figura 8, siguiente hoja)

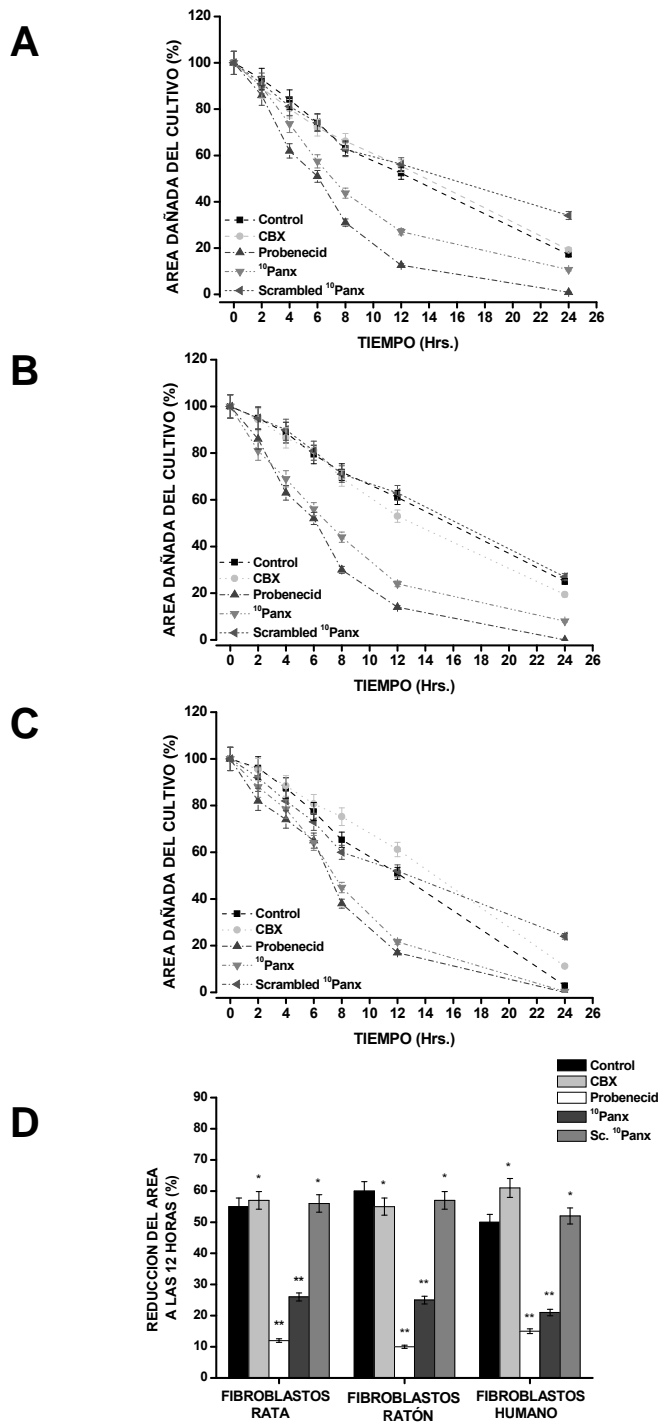


Figura 8: La inhibición de los HCs de Panxs acelera significativamente la migración de fibroblastos de rata, ratón y humanos. Las gráficas corresponden al curso temporal de la disminución del área dañada en el transcurso de 24 horas. **(A)** Migración fibroblastos de rata E18. **(B)** Migración fibroblastos de ratón tipo

silvestre. **(C)** Migración fibroblastos de humano. **(D)** Consolidado de los resultados anteriores expresados como reducción del área dañada a las 12 hrs de tratamiento, tiempo en el que en los controles se recupera el 50 % del área dañada. Resultados significativos comparados con el control (por t-Student) *p 0,05, **p 0,02. (n=10).

Como los bloqueadores utilizados son inespecíficos y no discriminan entre los HCs de Panx1 o Panx3, se requiere de estrategias genéticas para resolver el papel de cada Panxs. Para analizar el papel específico de Panx1, se estudió las propiedades de la migración de los fibroblastos del ratón KO-Panx1. Encontramos que existe una leve y no estadísticamente significativa aceleración del proceso de migración en los fibroblastos KO-Panx1 comparados con los fibroblastos del ratón silvestre (Figura 9). Además, se encontró que en los fibroblastos del ratón KO-Panx1, tanto Probenecid como ¹⁰Panx aceleran el proceso de migración de manera similar a lo encontrado para los fibroblastos del ratón silvestre (Figura 10). Finalmente, los bloqueadores de los HCs de Cxs no afectan la migración de los fibroblastos KO-Panx1 (Figura 10-A). Estos resultados sugieren que en la regulación del proceso de migración, es Panx3 y no Panx1 o Cxs la más relevante.

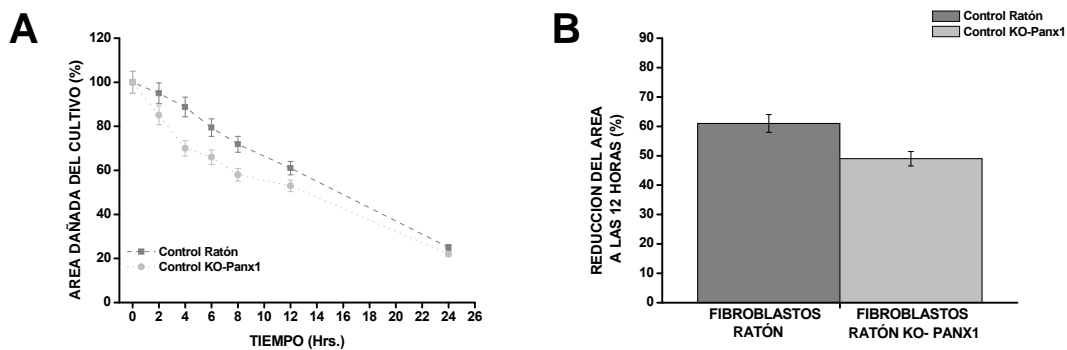


Figura 9: Comparación migración fibroblastos ratón con fibroblastos KO-Panx1. (A) Migración fibroblastos en un curso temporal de 12 horas. **(B)** Reducción del área dañada al cabo de 12 horas de migración, datos comparados con el control (por t-Student) *p 0,05. (n=10).

Con estos datos comparamos que es lo que sucede al bloquear HC de Cx43 y HC de Panx en los fibroblastos dérmicos del ratón KO-Panx1.

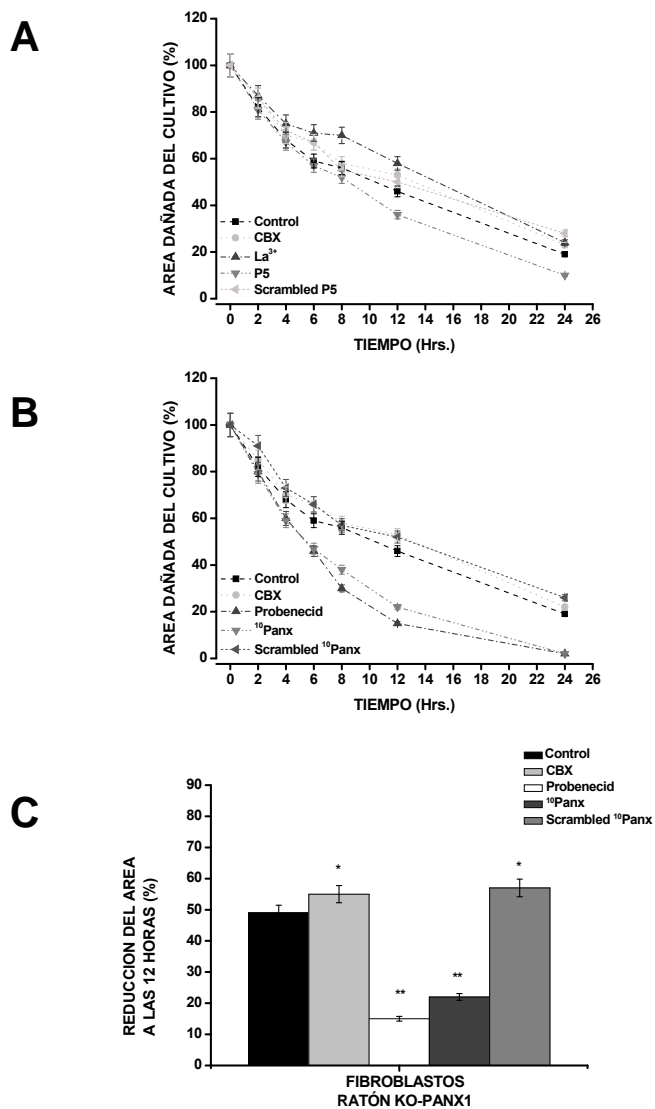


Figura 10: Probenecid y ¹⁰Panx aceleran la migración de fibroblastos de ratón KO-Panx1. (A) Efecto del bloqueo de HCs de Cx43 sobre la migración de los fibroblastos KO-Panx1. **(B)** Efecto del bloqueo HC de Panx sobre la migración de los fibroblastos KO-Panx1. **(C)** Reducción del área de la herida a las 12 horas de migración, datos comparados con el control (por t-Student) *p < 0,05. (n=10).

4. Los receptores purinérgicos del tipo P2X₇ no participan en las vías de regulación de la migración de fibroblastos dérmicos

Debido a que se ha encontrado en estudios previos que la activación de receptores purinérgicos, como los del tipo P2X, se relaciona con la activación de los HCs de Panexinas, se estudió la participación de los receptores purinérgicos del tipo P2X₇, que se expresan en los fibroblastos de diversas especies (Solini, Chiozzi et al. 2004), en el proceso de migración de los fibroblastos.

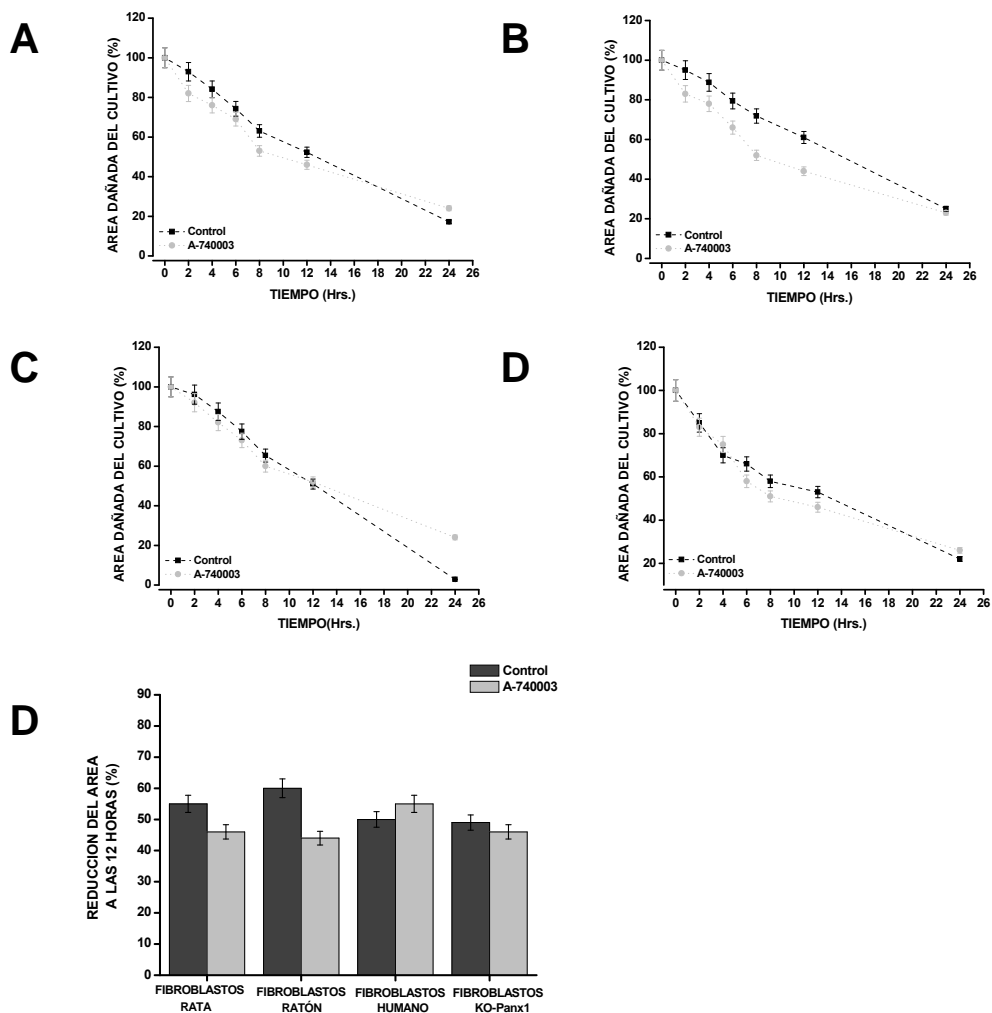


Figura 12: Papel del receptor purinérgico P2X₇ en la migración de los fibroblastos. Los fibroblastos fueron tratados con el bloqueador A-740003 que es capaz de bloquear el receptor P2X₇ (1 μ M). **(A)**

Fibroblastos de rata E18. **(B)** Fibroblastos de ratón tipo silvestre **(C)** Fibroblastos de humano. **(D)** Fibroblastos de ratón KO-Panx1. (n=2).

Encontramos que la incubación con el bloqueador selectivo A-740003 (1 μ M) no afectó la migración de los fibroblastos de las distintas especies estudiadas. Estos resultados indican que la activación de los receptores P2X₇ no se requieren para la migración de los fibroblastos, sin embargo, no se descarta la participación de otro tipo de receptor purinérgico, lo que será estudiado en futuros trabajos.

DISCUSIÓN

Los ensayos de recuperación de la herida en el cultivo, nos proporcionan varias ventajas: (1) el ensayo se puede realizar en cualquier placa de cultivo, (2) las células se mueven en una dirección definida, es decir, para cerrar la herida, (3) la superficie de ensayo se puede recubrir con una matriz extracelular a elección antes del experimento, y (4) el movimiento y la morfología de las células se puede observar visualmente en tiempo real y las imágenes capturadas durante todo el experimento permite la mediciones de la velocidad de migración.

El ensayo de recuperación de la herida es particularmente adecuado para los estudios de migración celular direccional y regulación mediante la interacción de células con la matriz extracelular (ECM) e interacciones célula-célula. La migración de las células está regulada tanto por el ECM en las células y por factores solubles (Lipton, Klinger et al. 1971).

En este estudio, demostramos que Panx1 se encuentra expresada en los fibroblastos de ratón, fibroblastos de embriones de rata de estadio 18 y en fibroblastos de humano. Los análisis por RT-PCR, nos demuestran que la Panx1 se expresa en los fibroblastos de ratón tipo silvestre y en los fibroblastos E18. La Panx3, se expresa en los fibroblastos de ratón tipo silvestre y en los fibroblastos KO-Panx1. Estos resultados aportan a los estudios previos que describen la expresión de Panx1 y Panx3 en la piel específicamente en queratinocitos (Celetti, Cowan et al. 2010).

La inhibición de los HCs de Cxs, en particular Cx43, con péptido mimético P5 no afectó la morfología de los fibroblastos, y a su vez, no incrementó la reducción del área de la herida. Estos resultados son diferentes a lo reportado previamente por (Wright, Pollok et al. 2012) en donde otro péptido mimético de Cxs, GAP27, acelera la migración de fibroblastos dérmicos de humano en condiciones de hiperglicemia e hipoglicemia.

El análisis de los resultados con CBX es complicado debido a que este bloqueador no es selectivo de Cxs ni Panxs. Sin embargo, el hecho de que ni las dosis altas de CBX afecte significativamente la migración es contradictorio con la posible participación de los HCs de Panxs. Una posibilidad es que CBX no bloquee Panx3, o sea menos eficiente, no existe en la literatura estudios detallados sobre el efecto de CBX en Panx3. Otra posibilidad es

que CBX sea metabolizada rápidamente y no sirva para experimentos de largo plazo, como los de esta tesis. La CBX, es utilizada en la medición de corriente de HC de Cxs, que son experimentos de corto tiempo no más de 40 minutos, también es utilizada, en ensayos de funcionalidad de HC, los cuales también tienen una duración de no más de 30 minutos (Benfenati, Caprini et al. 2009). Los experimentos que nosotros realizamos en el laboratorio tienen una duración de 12-.24 horas.

Por otra parte, el péptido mimético para la Cx43, el P5, ejerce un efecto limitado en los fibroblastos de ratón tipo silvestre y en fibroblastos de humano (Figura 7). Al alinear la secuencia de P5 con las especies estudiadas existe un 100% de alineamiento, por lo tanto, quedaría descartado que no existe homología de secuencia.

Con respecto al bloqueo los HC de Panx, el péptido ¹⁰Panx que es específico para Panx1, acelera considerablemente la migración en cada una de las especies; en cambio, Probenecid, provoca una reducción del área de la herida. En la bibliografía actual Probenecid es un fármaco utilizado para bloquear HC de Panx1, en mismo caso, que ¹⁰Panx que bloquea HC de Panx1.

Por otra parte, el péptido mimético para la Cx43, el P5, ejerce un efecto menor en los fibroblastos de ratón y en fibroblastos de humano (Figura 7). Al alinear la secuencia de P5 con la Cx43 de las especies estudiadas existe un 100% de alineamiento, por lo tanto, quedaría descartado que no existe homología de secuencia.

Con respecto al bloqueo los HC de Panx, el péptido ¹⁰Panx se lo ha presentado como específico para Panx1 en diversos artículos. Sin embargo, la secuencia del péptido mimético ¹⁰Panx, tiene más de 90% de homología con la secuencia de Panx3, por lo tanto, este péptido podría bloquear Panx3 en los fibroblastos KO-Panx1, y el efecto de Probenecid en la migración, se debería al bloqueo de los HCs de Panx3, lo que acelera la migración. Estos experimentos sugieren que el los HCs de Panx3 podrían participar en las vías de regulación de la migración de los fibroblastos. Para comprobar esta idea se deberán realizar experimentos en fibroblastos tratados con RNA de interferencia para eliminar la expresión de Panx3.

Panx3 parece cumplir un papel en la migración de los fibroblastos, pero el mecanismo que lleva a la migración queda inconcluso, en esta investigación propusimos que el mecanismo que ayuda a los fibroblastos era por medio del receptor P2X₇, el cual se encuentra acoplado a la Panx1. Este receptor podría estar asociado a los HC de Panx3, pero al bloquear con A-740003 que es un bloqueador específico del receptor P2X₇ (Honore, Donnelly-Roberts et al. 2006), no se ve afectada la migración, lo cual puede deberse a que el bloqueador lo utilizamos a muy baja concentración. La participación de los receptores purinérgicos será estudiada en el futuro con otros bloqueadores y con Bz-ATP, que es un agonista selectivo de receptores purinérgicos P2X (Solini, Chiozzi et al. 2004).

La comunicación entre dos células adyacentes implica un diálogo localizado en donde las UH también pueden apoyar la formación de redes celulares acopladas metabólicamente, que proporcionan la propagación de señalización regulada y de largo plazo. Se debe agregar, que se encuentra descrito que la Cx43 parece tener un papel en la migración, aunque se ha interpretado que se debe a la formación de UH. La comunicación por UH es ahora reconocido como un aspecto importante de la respuesta de la lesión cutánea (Qiu, Coutinho et al. 2003). Sin embargo, no se ha estudiado consistentemente el papel de los HCs de Cxs ni de Panxs. Esta tesis hace una contribución al proponer que los HCs, en especial de Panx son importantes reguladores de la migración celular por un mecanismo desconocido (Desplantez, Dupont et al. 2007).

Finalmente, los HC de Panx3 parecen jugar un papel importante en la migración como la activación de un proceso que restringe la migración. Como se encuentra descrito que la Cx43 tiene un papel en la cicatrización, es posible que sea un complemento entre los HC de Panx3 y HC de Cx43. Estas interrogantes, las podríamos responder mediante un cultivo celular de fibroblastos provenientes de un ratón-KO-Panx1/Panx3, con este doble KO podemos descartar la función de la Panx1 y Panx3 al bloquear los HC con los bloqueadores específicos para Panxs. También, una técnica con un 80% de certeza es utilizar siRNA de Panx1 y Panx3, además de un control con siRNA de Cx43.

Como proyección de posibles estudios en el laboratorio, se proponen realizar estudios *in vivo* en ratón tipo silvestre, ratón KO-Panx1. A los ratones, se le realizan heridas localizadas en la piel y se someten a tratamientos con los péptidos miméticos y fármacos

utilizados en esta investigación. Estos tratamientos serán agregados a determinados tiempos, y se capturan fotografías del avance de esta herida. Además, de realizar estudios de histología de la piel, a medida que va cicatrizando la piel, hacer una biopsia de esta, por medio, de inmunohistoquímica estudiar la localización de Panx1, Panx3 y Cx43. Pensamos que hay una proyección a la medicina regenerativa de la piel, en donde la inhibición de Panxs podría acelerar el proceso de cicatrización.

CONCLUSIÓN

Las Panxs estructuralmente son similar a Cxs pero distinta evolutivamente, estas se co-expresan con Cxs en los vertebrados. Las propiedades básicas de los canales de Panxs, así como su regulación son distintas de las de Cxs, lo que sugiere que ambas familias de proteínas tienen funciones celulares específicas.

El presente estudio se demostró que en fibroblastos de ratón y de embriones de rata de estadio 18, se encuentra expresando las proteínas de UH, Cx43, y las Panxs, Panx1 y Panx3. En los fibroblastos KO-Panx1 se expresa Panx3. Por otra parte, al bloquear la Panxs con Probenecid y péptido mimético ¹⁰Panx parecer promover la migración en los fibroblastos de las especies que se estudiaron. Estos resultados son muy alentadores, ya que, esta información puede ser útil para el crecimiento de nuevas estrategias para mejorar la cicatrización de las heridas.

FINANCIAMIENTO

FONDOS ICM-ECONOMIA PROYECTO CODIGO P09-022-F

REFERENCIAS

- Anselmi, F., V. H. Hernandez, et al. (2008). "ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca²⁺ signals across the inner ear." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(48): 18770-18775.
- Bao, L., S. Locovei, et al. (2004). "Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP." FEBS Lett **572**(1-3): 65-68.
- Baranova, A., D. Ivanov, et al. (2004). "The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins." Genomics **83**(4): 706-716.
- Benfenati, V., M. Caprini, et al. (2009). "Carbenoxolone inhibits volume-regulated anion conductance in cultured rat cortical astroglia." Channels (Austin) **3**(5): 323-336.
- Boarder, M. R. and S. M. Hourani (1998). "The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors." Trends Pharmacol Sci **19**(3): 99-107.
- Boassa, D., C. Ambrosi, et al. (2007). "Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane." J Biol Chem **282**(43): 31733-31743.
- Bruzzone, R., S. G. Hormuzdi, et al. (2003). "Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13644-13649.
- Celetti, S. J., K. N. Cowan, et al. (2010). "Implications of pannexin 1 and pannexin 3 for keratinocyte differentiation." J Cell Sci **123**(Pt 8): 1363-1372.
- Churko, J. M., Q. Shao, et al. (2011). "Human dermal fibroblasts derived from oculodentodigital dysplasia patients suggest that patients may have wound-healing defects." Hum Mutat **32**(4): 456-466.
- D'Hondt, C., R. Ponsaerts, et al. (2009). "Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions?" Bioessays **31**(9): 953-974.
- Davidson, J. O., C. R. Green, et al. (2012). "Deleterious effects of high dose connexin 43 mimetic Peptide infusion after cerebral ischaemia in near-term fetal sheep." Int J Mol Sci **13**(5): 6303-6319.
- Desplantez, T., E. Dupont, et al. (2007). "Gap junction channels and cardiac impulse propagation." J Membr Biol **218**(1-3): 13-28.
- Francis, R., X. Xu, et al. (2011). "Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics." PLoS One **6**(10): e26379.

- Goliger, J. A. and D. L. Paul (1995). "Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication." Mol Biol Cell **6**(11): 1491-1501.
- Honore, P., D. Donnelly-Roberts, et al. (2006). "A-740003 [N-(1-[[[(cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino]-2,2-dimethylpropyl]-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat." J Pharmacol Exp Ther **319**(3): 1376-1385.
- Huang, G. Y., E. S. Cooper, et al. (1998). "Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration." J Cell Biol **143**(6): 1725-1734.
- Kameritsch, P., K. Pogoda, et al. (2012). "Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration." Biochim Biophys Acta **1818**(8): 1993-2001.
- Kandyba, E. E., M. B. Hodgins, et al. (2008). "A murine living skin equivalent amenable to live-cell imaging: analysis of the roles of connexins in the epidermis." J Invest Dermatol **128**(4): 1039-1049.
- Kretz, M., C. Euwens, et al. (2003). "Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3443-3452.
- Lichti, U., J. Anders, et al. (2008). "Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice." Nat Protoc **3**(5): 799-810.
- Lipton, A., I. Klinger, et al. (1971). "Migration of mouse 3T3 fibroblasts in response to a serum factor." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(11): 2799-2801.
- Locovei, S., E. Scemes, et al. (2007). "Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex." FEBS Lett **581**(3): 483-488.
- Mori, R., K. T. Power, et al. (2006). "Acute downregulation of connexin43 at wound sites leads to a reduced inflammatory response, enhanced keratinocyte proliferation and wound fibroblast migration." J Cell Sci **119**(Pt 24): 5193-5203.
- Panchin, Y., I. Kelmanson, et al. (2000). "A ubiquitous family of putative gap junction molecules." Curr Biol **10**(13): R473-474.
- Pelegri, P. and A. Surprenant (2006). "Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor." EMBO J **25**(21): 5071-5082.
- Penuela, S., R. Bhalla, et al. (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**(Pt 21): 3772-3783.

- Penuela, S., R. Gehl, et al. (2012). "The biochemistry and function of pannexin channels." Biochim Biophys Acta.
- Qiu, C., P. Coutinho, et al. (2003). "Targeting connexin43 expression accelerates the rate of wound repair." Curr Biol **13**(19): 1697-1703.
- Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev **50**(3): 413-492.
- Saez, J. C., V. M. Berthoud, et al. (2003). "Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions." Physiol Rev **83**(4): 1359-1400.
- Scemes, E., S. O. Suadicani, et al. (2007). "Connexin and pannexin mediated cell-cell communication." Neuron Glia Biol **3**(3): 199-208.
- Silverman, W., S. Locovei, et al. (2008). "Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels." Am J Physiol Cell Physiol **295**(3): C761-767.
- Solini, A., P. Chiozzi, et al. (2000). "High glucose modulates P2X7 receptor-mediated function in human primary fibroblasts." Diabetologia **43**(10): 1248-1256.
- Solini, A., P. Chiozzi, et al. (2004). "Enhanced P2X7 activity in human fibroblasts from diabetic patients: a possible pathogenetic mechanism for vascular damage in diabetes." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(7): 1240-1245.
- Vanden Abeele, F., G. Bidaux, et al. (2006). "Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1." J Cell Biol **174**(4): 535-546.
- Wright, C. S., S. Pollok, et al. (2012). "The connexin mimetic peptide Gap27 increases human dermal fibroblast migration in hyperglycemic and hyperinsulinemic conditions in vitro." J Cell Physiol **227**(1): 77-87.
- Wright, C. S., M. A. van Steensel, et al. (2009). "Connexin mimetic peptides improve cell migration rates of human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro." Wound Repair Regen **17**(2): 240-249.
- Yen, M. R. and M. H. Saier, Jr. (2007). "Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily." Prog Biophys Mol Biol **94**(1-2): 5-14.