



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE INNOVACIÓN TERAPÉUTICA Y DIAGNÓSTICO
MOLECULAR

**Rol de los canales de Panexina I en la polarización de
macrófagos como posible aplicación en el tratamiento de
heridas**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN II
MATÍAS CARVAJAL ROJAS
Director: Ricardo Ceriani Fernández

RESUMEN

Las heridas cutáneas son procesos complejos que comprometen la integridad del tejido y pueden clasificarse como agudas o crónicas, dependiendo de la duración del proceso inflamatorio. Este proceso está regulado principalmente por las poblaciones de macrófagos M1 (proinflamatorios) y M2 (antiinflamatorios). El bloqueo de los canales de panexina 1 (Panx1) podría desempeñar un papel relevante en la modulación de la actividad de los macrófagos, aunque las investigaciones al respecto son limitadas y su potencial terapéutico aún se desconoce.

En este estudio se evaluó el efecto del bloqueo con Probenecid (PBN) en Panx1, presentes en macrófagos derivados de medula ósea de ratón mediante los niveles de expresión de marcadores de superficie celular y citoquinas características de cada población. Para este propósito, los macrófagos M0 fueron tratados con PBN, midiéndose la expresión de CD80 y CD206 para identificar los fenotipos. Posteriormente a los macrófagos M0, se les indujo hacia los fenotipos M1 y M2 con citoquinas específicas, a las cuales se les aplicó PBN. La cuantificación de la expresión génica en ambos procesos se llevó a cabo con qPCR

Los resultados obtenidos revelaron diferencias significativas entre los marcadores utilizados. CD206 mostró un nivel estadísticamente superior con respecto a la situación control al polarizar los macrófagos M0, al contrario de CD80, sugiriendo una tendencia hacia la polarización antiinflamatoria, sugiriendo que Panx1 podría modular funciones inflamatorias y favorecer cierto nivel de resolución en algunas heridas.

En cambio, al medir mediadores en macrófagos ya polarizados, se observa que TNF- α aumentó su expresión significativamente en macrófagos M1 con respecto al control, mientras que VEGF también se incrementó con significancia estadística en macrófagos M2 tras el bloqueo con respecto a la situación control.

Con base en estos hallazgos, se concluye que, Panx1 podría estar implicada en estos complejos procesos, aunque también podría depender del entorno inflamatorio en el que esté presente, así como de los métodos utilizados para la medición de la expresión génica o el bloqueo de Panx1.

ABSTRACT

Skin wounds are complex processes that compromise tissue integrity and can be classified as acute or chronic, depending on the duration of the inflammatory process. This process is mainly regulated by populations of M1 (proinflammatory) and M2 (anti-inflammatory) macrophages. Blocking pannexin 1 (Panx1) channels could play an important role in modulating macrophage activity, although research in this area is limited and its therapeutic potential is still unknown.

This study evaluated the effect of Probenecid (PBN) blockade on Panx1, present in macrophages derived from mouse bone marrow, by measuring the expression levels of cell surface markers and cytokines characteristic of each population. For this purpose, M0 macrophages were treated with PBN, and the expression of CD80 and CD206 was measured to identify the phenotypes. Subsequently, M0 macrophages were induced toward M1 and M2 phenotypes with specific cytokines, to which PBN was applied. Gene expression quantification in both processes was performed with qPCR.

The results obtained revealed significant differences between the markers used. CD206 showed a statistically higher level compared to the control situation when polarizing M0 macrophages, unlike CD80, suggesting a tendency toward anti-inflammatory polarization, suggesting that Panx1 could modulate inflammatory functions and promote a certain level of resolution in some wounds.

However, when measuring mediators in already polarized macrophages, it was observed that TNF- α significantly increased its expression in M1 macrophages compared to the control, while VEGF also increased statistically significantly in M2 macrophages after blockade compared to the control situation.

Based on these findings, it is concluded that Panx1 could be involved in these complex processes, although it could also depend on the inflammatory environment in which it is present, as well as the methods used to measure gene expression or block Panx1.

Palabras clave: piel, herida crónica, macrófagos, panexina 1, polarización

Keywords: skin, chronic wound, macrophage, pannexin 1, polarization

Abreviaturas

ATP	Adenosín trifosfato
CSF-1	Factor estimulante de colonias 1
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
GM-CSF	Factor estimulante de granulocitos y macrófagos
HMGB1	Proteína de caja de grupo de alta movilidad 1
IL-1	Interleuquina-1
IL-1α	Interleuquina-1 α
IL-1β	Interleuquina-1 β
IL-6	Interleuquina-6
IL-10	Interleuquina-10
IL-12	Interleuquina-12
IL-23	Interleuquina-23
LPS	Lipopolisacárido
M0	Macrófagos M0
M1	Macrófagos M1
M2	Macrófagos M2
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinasas
NF-κB	Factor nuclear kappa B
qPCR	Reacción en Cadena de Polimerasa Cuantitativa

TLR	Toll-Like Receptor
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
Panx1	Panexina 1
PBN	Probenecid
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAA	Amiloide Serico A Purificado
VEGF	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

Agradecimientos

A mi madre, padre, hermanos por ser el núcleo central del apoyo que he recibido en toda mi etapa estudiantil. A mis tíos y primos por siempre tener fé en mí.

A mis amigos, por motivarme a ser mejor cada vez con su característico humor y forma de ser.

A mis compañeros, por enseñarme diferentes realidades y traspasarme su sabiduría en muchas ocasiones.

Índice

1	Introducción	9
1.1	Anatomía de la piel	9
1.2	Heridas de piel	9
1.2.1	Coagulación	10
1.2.2	Inflamación	10
1.2.3	Proliferación	10
1.2.4	Maduración	10
1.3	Heridas crónicas	10
1.4	Macrófagos	11
1.5	Canal de Panexina 1	14
1.6	Panexinas y macrófagos	15
1.7	Hipótesis:	15
2	Objetivos	16
2.1	Objetivo General	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	Metodología	17
4	Materiales y métodos	19
4.1	Obtención de macrófagos desde médula ósea	19
4.2	Polarización de macrófagos a fenotipos M1 y M2	19
4.3	Bloqueo de los canales de Panx1	19
4.4	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	19
4.5	Análisis Estadístico	20
5	Resultados	21
5.1	El bloqueo del canal de Panx1 con Probenecid causa un aumento en la polarización a macrófagos tipo M2.	21
5.2	El bloqueo de Panx1 no disminuye la expresión de los mediadores inflamatorios	22
6	Discusión	24
7	Conclusiones	26
8	Bibliografía	27

1 Introducción

1.1 Anatomía de la piel

La piel es el órgano más externo y extenso de los mamíferos, por lo que cumple una función de barrera, ya que protege contra la pérdida o absorción de agua, microorganismos, traumas mecánicos, químicos y radiación UV. (O'Connell et al., 2015) En cuanto a su anatomía la piel se compone de tres capas: epidermis, dermis e hipodermis.

La epidermis es la capa más externa de la piel, compuesta por un epitelio estratificado cuyas células principales son los queratinocitos. Sus capas, de la más profunda a la superficial, incluyen el estrato basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo. Cada capa tiene una estructura y función específicas: el estrato basal contiene células madre y melanocitos, mientras que el estrato córneo está compuesto por queratinocitos que protegen la piel. (Ravara et al., 2018).

La dermis, contiene las capas papilar y reticular, formadas por tejido conectivo que proporciona soporte estructural y alberga glándulas sudoríparas, folículos pilosos, vasos sanguíneos, neuronas sensoriales y fibras de colágeno. El principal tipo celular residente de la dermis es el fibroblasto, responsable de producir y mantener la matriz extracelular (MEC), que es una red compuesta por proteínas como colágeno que contribuyen a la elasticidad y resistencia de la piel, además, los fibroblastos permiten regenerar el ciclo de los folículos pilosos y contribuir al proceso de cicatrización de heridas, produciendo colágeno y otras moléculas de la MEC necesarias para reparar el tejido dañado. Añadir a estas funciones, su interacción con macrófagos, para coordinar la inflamación y regeneración del tejido. (Sennett et al., 2012).

Por último, la hipodermis es la capa más profunda de la piel y está compuesta por lóbulos de tejido adiposo, neuronas sensoriales, vasos sanguíneos y algunos apéndices cutáneos (Moore et al., 2017).

1.2 Heridas de piel

Ya que la piel está expuesta, es propensa a daño, debido a esto la piel tiene un eficiente mecanismo de reparación. Este proceso de regeneración cutánea implica 4 fases secuenciales:

- 1.2.1 Coagulación: Una vez ocurrido el evento lesivo, la exposición al colágeno inicia las cascadas de coagulación intrínseca y extrínseca, seguido de la matriz de fibrina. El coágulo sanguíneo no solo bloquea microorganismos, sino que también actúa como una base para las células que reparan la herida y almacena factores de crecimiento. (Martin, 1997).
- 1.2.2 Inflamación: Poco después de una lesión, los neutrófilos (en minutos), monocitos y linfocitos llegan al área para defender al organismo contra infecciones y eliminar restos celulares. Posteriormente los macrófagos fagocitan a la fibrina y liberan factores proinflamatorios como las interleuquinas 1,6, (IL-1, IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) (Martin, 1997; Velnar et al., 2009).
- 1.2.3 Proliferación: La formación de tejido nuevo empieza desde los dos a diez días después de la lesión. Si la lesión llegó a nivel de dermis, los fibroblastos secretan colágeno III para formar un tejido conectivo poco diferenciado llamado tejido granular, el cual es altamente vascularizado. En esta fase los queratinocitos migran hacia la parte central de la lesión mediante los modelos de deslizamiento y rodamiento, en donde se modifican sus uniones de anclaje, que permiten que se desprendan y migren hacia la parte central de la lesión (Usui et al., 2005).
- 1.2.4 Maduración: La fase de maduración inicia aproximadamente tres semanas después de un evento lesivo y dura más de un año, aquí, todos aquellos procesos anteriores, son silenciados y los macrófagos, células endoteliales aisladas y los miofibroblastos entran en apoptosis, dejando la región rica en colágeno I y otras proteínas de la matriz extracelular. (Enoch et al., 2008).

1.3 Heridas crónicas

Las heridas crónicas presentan un proceso de reparación alterado, en el que el resultado esperable desde el punto de vista anatómico y funcional, no se alcanza en un tiempo adecuado, normalmente de 3 meses (Nunan et al., 2014) y no progresan a través de las fases ordenadas de cicatrización, sino que se detienen en una fase inflamatoria, que se vuelve perpetua pese al tratamiento adecuado, hay varios factores que puede retrasar la cicatrización de heridas: enfermedades crónicas, insuficiencia vascular, diabetes, malnutrición, envejecimiento, presión arterial, infecciones, edema. (Fonder et al., 2008).

El daño tisular encierra a la herida en un estado inflamatorio prolongado y exacerbado, caracterizado por una abundante infiltración de neutrófilos, con sus especies reactivas de oxígeno (ROS) asociadas y enzimas destructivas que terminan haciendo este ciclo perpetuo (Diegelmann et al., 2004). Además, hay marcadores del estado crónico como

el exudado, que mediante sus componentes causan degradación de la MEC, en los cuales las metaloproteinasas (MMPs) son considerados los elementos dominantes (sobre todo la de tipo 9), estableciendo una relación entre niveles elevados de bacterias y MMP9 (Mofazzal et al., 2018). Otro posible marcador es la senescencia de macrófagos, al entrar en esta fase, sus funciones se ven comprometidas, esto puede causar la alteración de la regulación génica fisiológica y en las funciones propias de esta célula, como la reducción de su capacidad de fagocitosis y cambios en la autofagia. (Chelvarajan et al., 2016).

Al ser la etiología de estas heridas bastante diversa, se dificultan los esfuerzos de los investigadores por encontrar un foco terapéutico que sirva para tratarlas. Los mecanismos celulares y moleculares de la curación de estas heridas son complejos y sus alteraciones no son muy conocidas. A esto, hay que añadir la amplia gama de comorbilidades, que plantea mayores obstáculos para identificar objetivos terapéuticos y diseñar un ensayo clínico.

1.4 Macrófagos

Los macrófagos son pequeñas poblaciones de leucocitos que median el proceso de cicatrización cutánea modulando la respuesta inflamatoria y facilitando la reparación tisular. Estos se definen por su ubicación, fenotipo, morfología y perfil de expresión génica (Sica et al., 2015).

Sus funciones están relacionadas a su estado de activación o fenotipo, que, a su vez, depende de los estímulos ambientales locales (Spiller et al., 2016), concretamente se utiliza el término activación y polarización de macrófagos, en que las citoquinas y agonistas de Toll-Like receptors (TLRs) producen patrones diferentes de expresión de genes y proteínas. Tienen la capacidad de cambiar sus estados de activación en respuesta al factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) y factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), por las citoquinas, productos microbianos, glucocorticoides y potenciales moléculas que puedan ser reconocidos por ellos. (Murray et al., 2014).

En primera instancia, los monocitos circulantes son reclutados rápidamente al reconocer los estímulos liberados por las células del endotelio activados posterior al daño (MCP-1, ICAM-1 y VCAM-1). Al adherirse al endotelio, genera la extravasación, en que pasan desde la circulación al tejido subendotelial, donde se podrán diferenciar a macrófagos M1 o M2. (Humeres et al., 2016).

Los macrófagos M1 son proinflamatorios, expresan marcadores tales como CD86, CD80 y liberan citoquinas como Interleuquina-1 α (IL-1 α), Interleuquina-1 β (IL-1 β), IL-6, Interleuquina-12 (IL-12), Interleuquina-23 (IL-23), TNF- α (Yao et al., 2019) (Figura 1). Inicialmente esta población se infiltra hacia la herida tras la lesión para limpiarla de

bacterias, restos extraños y células muertas, posicionándose cerca de los vasos sanguíneos en formación, ayudando en su estabilización y fusión (Fantin et al., 2010). Con esto se crea un ambiente inflamatorio necesario para combatir infecciones y preparar el tejido para su reparación.

Cuando se inicia la fase final de remodelación, los macrófagos liberan MMPs, esto con el fin de descomponer la MEC provisional y luego sufren apoptosis para permitir la maduración de la piel y que regrese a su forma original no lesionada (Vanella y Wynn, 2017). En heridas crónicas, los macrófagos M1 persisten sin transformarse en fenotipos antiinflamatorios. (Hesketh et al., 2017).

Al disminuir los niveles de DAMPS, se cambia el ambiente inmunológico hacia otro perfil de citoquinas, tales como Interleuquina-4 (IL-4), Interleuquina-10 (IL-10) e Interleuquina-13 (IL-13), que dirigen la diferenciación hacia macrófagos M2, de tipo antiinflamatorio, (Arnold et al., 2014; Sánchez et al., 2017). A su vez, este fenotipo se divide en 4 categorías (Figura 2):

- M2a: Contribuyen a la angiogénesis, la proliferación, la migración y la diferenciación de fibroblastos (Lurier et al., 2017).
- M2b: Modulan funciones proinflamatorias y antiinflamatorias mediante citoquinas, este subgrupo representa un estado intermedio entre los fenotipos M1 y M2 (Edwards et al., 2006).
- M2c: Fuerte actividad antiinflamatoria, además contribuyen a la angiogénesis, producen MMP 9 atrayendo células madre derivadas de vasos sanguíneos a los sitios lesionados, fagocitan restos de heridas y depositan componentes en la MEC (Spiller et al., 2014; Lurier et al., 2017). Mediante la expresión de TGF- β permite regular la proliferación (generalmente de fibroblastos y MEC), migración y diferenciación, procesos muy importantes en la cicatrización de heridas (Goren et al., 2009).
- M2d: Potente actividad reparatoria de tejido, el cual libera factores reparatorios tal como IL-10 y el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) (Nikovics et al., 2020; Cao et al., 2015).

En el transcurso de aproximadamente 7 días, en una cicatrización normal, hay un 80% de macrófagos M2, con esto, el proceso de liberación de mediadores permite la entrada a la fase de cicatrización, mediante la proliferación aumentada de fibroblastos que formarán colágeno para cerrar la herida. (Shook et al., 2016).

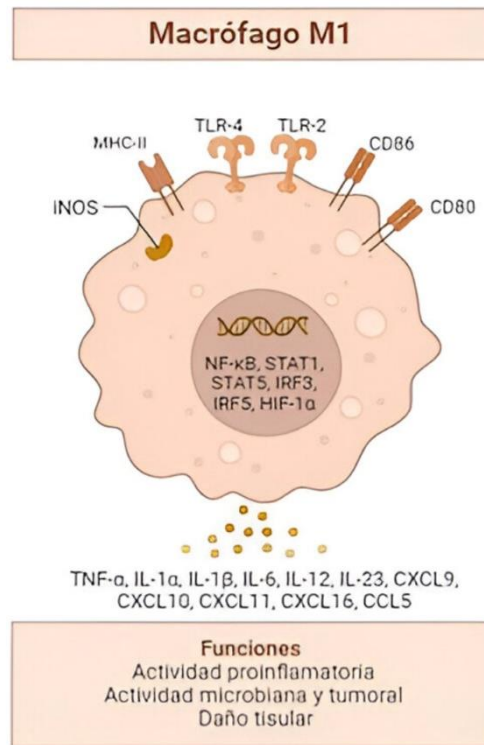


Figura 1. Características de la población de macrófagos tipo M1. Adaptado de Yao et al. (2019).

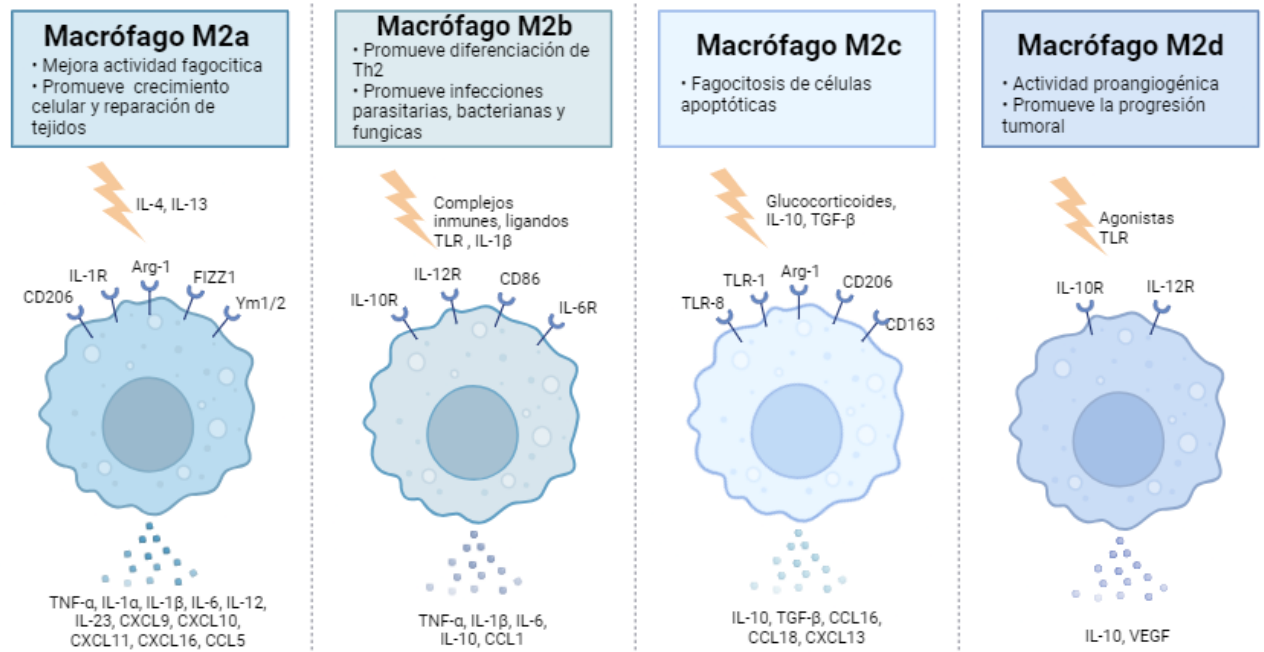


Figura 2. Características de la población de macrófagos tipo M2. Adaptado de Yao et al. (2019).

1.5 Canal de Panexina 1

Las panexinas, son una familia de proteínas de membrana, dentro de la cual se ha identificado a panexina 1, panexina 2 (Pannx2) y panexina 3 (Pannx3) (Figura 3), son capaces de formar canales cuya principal función es la liberación de ATP (Bond S., Naus C., 2014).

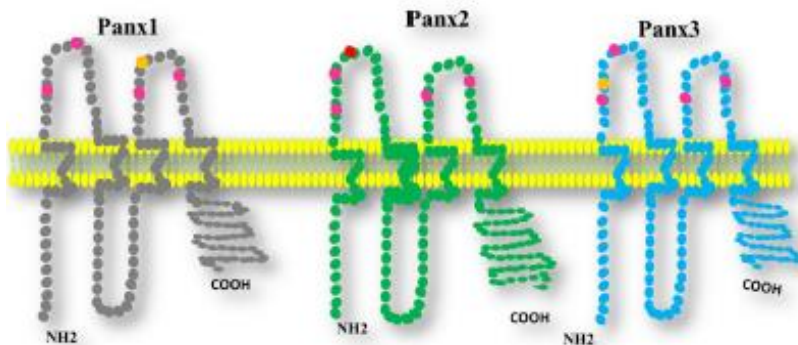


Figura 3: Familia de proteínas panexinas. Se aprecia, de izquierda a derecha, las proteínas Pannx1 en gris, Pannx2 en verde y Pannx3 en celeste. Se señalan los extremos N terminal y C terminal, que se encuentran de cara al espacio intracelular. Adaptado desde Bond S., Naus C., 2014.

En cuanto a su expresión Pannx1, se puede encontrar en la mayoría de tejidos: cerebro, piel, ovarios, placenta, timo, próstata, pulmones, hígado, intestino delgado, páncreas, bazo, colon, endotelio sanguíneo y eritrocitos. En el sistema nervioso central: cerebelo, corteza, cristalino, retina, células piramidales, interneuronas de la neocorteza y el hipocampo, amígdala, sustancia negra, bulbo olfatorio, neuronas y células gliales (Peñuela S., et al., 2013). Cabe destacar que principalmente se ha observado en corazón, músculo esquelético y testículos (Bond S., Naus C., 2014).

Dentro del proceso de inflamación Pannx1 participa en diversos roles: en la activación del inflammasoma NLRP3, que desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias, principalmente en células de la piel y músculo esquelético (IL-1, IL-6 y TNF- α) y también regula la expresión de proteínas proapoptóticas (Bax y Bcl2) (Huang et al., 2020). A través de los receptores purinérgicos P2X, el ATP liberado por Pannx1 actúa como una señal inflamatoria; en la quimiotaxis, proceso fundamental para la migración de los glóbulos blancos (macrófagos, neutrófilos y linfocitos) hacia los tejidos inflamados, lo que desencadena el inicio de la respuesta inmune (Adamson S., Leitinger N., 2014); en la muerte celular neuronal, por medio de la activación irreversible del canal (Orellana J., et al., 2011; Bennett M., et al., 2012); en la inmunidad adaptativa, por la liberación de ATP, constituyendo un circuito de retroalimentación en las células T (Schenk U., et al., 2008).

Además, los canales de Panx1, participan en la resolución de la inflamación, proceso que es mediado por los productos de degradación del ATP hacia adenosina por las ectonucleotidasas (Adamson S., Leitingner N., 2014).

1.6 Panexinas y macrófagos

Los canales Panx1 desempeñan un papel clave en la regulación de la actividad inflamatoria de los macrófagos. Su expresión y actividad aumentan en respuesta a estímulos inflamatorios, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y el amiloide sérico A purificado (SAA) (Chen et al., 2019). En un modelo de aneurisma, los canales Panx1 liberan ATP, que activa los receptores P2X7 en los macrófagos, desencadenando la liberación de IL-1 β y de la proteína de caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) (Filiberto et al., 2022). Esta respuesta inflamatoria puede inhibirse mediante el uso de bloqueadores de los canales Panx1, como Probenecid (PBN) o apirasa (Filiberto et al., 2022).

Además, se ha demostrado que la activación de los canales Panx1 estimula el inflamasoma caspasa-1/IL-1 β a través de los receptores P2X7 (Pelegri et al., 2006). También pueden activar el inflamasoma NLRP3 mediante el aumento de calcio intracelular, lo que induce permeabilización lisosomal (Santos et al., 2022). Estudios *in vitro* en macrófagos alveolares y peritoneales de rata han evidenciado que el bloqueo de los canales Panx1 reduce la formación de macrófagos multinucleados en presencia de la citoquina inflamatoria GM-CSF (Lemaire et al., 2011).

Estos hallazgos resaltan el papel de los canales Panx1 en la mediación de la liberación de citocinas proinflamatorias por los macrófagos. Asimismo, el tratamiento con inhibidores de Panx1 ha demostrado disminuir la infiltración de macrófagos en aortas inflamadas, sugiriendo un rol significativo de estos canales en la migración de macrófagos (Filiberto et al., 2022).

Por otro lado, los canales Panx1 están involucrados en la regulación de la muerte celular de los macrófagos. Su bloqueo aumenta la viabilidad celular e inhibe la actividad de las caspasas 1 y 2 en respuesta a estímulos citotóxicos, como los triglicéridos (Jung et al., 2020). Estos resultados subrayan que la actividad de Panx1 es fundamental en la regulación de la actividad de los macrófagos.

De acuerdo con lo expuesto se presenta la siguiente pregunta: ¿Qué función tiene los canales de panexina 1 en la polarización de los macrófagos?

1.7 Hipótesis:

El bloqueo de los canales de Panx1 en macrófagos altera la polarización de macrófagos incrementando el fenotipo M2.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

- Estudiar el rol de los canales de panexina 1 en la polarización de macrófagos de murino.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar el grado de polarización de los macrófagos hacia fenotipo M1 y M2, tratados con un bloqueador del canal de Panx1.
- Evaluar los niveles de expresión de citoquinas y Factores de Crecimiento producidos por macrófagos M1 y M2 tratados con un bloqueador de canales de Panx1.

3 Metodología

El diseño experimental se esquematiza en la figura 4, el proceso contempló la extracción de médula ósea desde un ratón para la obtención de los macrófagos. Los macrófagos fueron tratados con factores que permitieron la polarización a M1 y M2 más bloqueadores de canales de Panx1 (PBN y Mol1). Además, los macrófagos M1 y M2, también fueron tratados con los bloqueadores de canales de Panx1. El efecto de los niveles de polarización de macrófagos tratados con los bloqueadores de canales de Panx1, fue identificado mediante la expresión semicuantitativa de mRNA por qRt-PCR, de CD80 expresado principalmente en M1, y CD206 expresado en M2. También, se evaluaron por qRT-PCR, los niveles de mRNA de IL-6 y TNF- α en macrófagos M1, e IL-10 y VEGF en M2, tratados con los bloqueadores de canales de Panx1. Para finalizar se realizó el análisis estadístico mediante el programa GraphPad Prism.

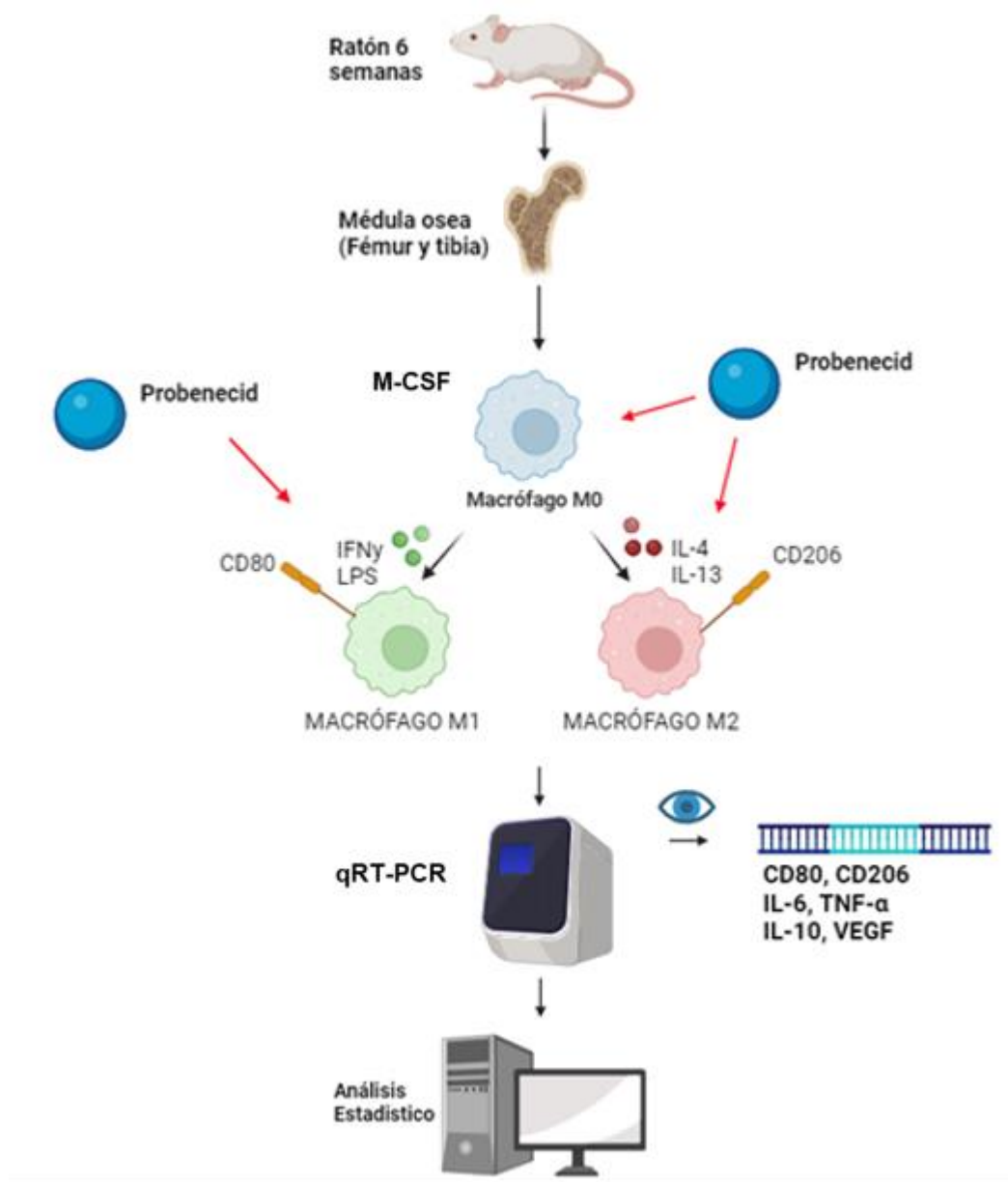


Figura 4. *Mapa conceptual acerca de la metodología del proyecto.* Elaboración propia utilizando el programa BioRender (2025).

4 Materiales y métodos

4.1 Obtención de macrófagos desde médula ósea

Los ratones macho C57BL/6J de 6 semanas fueron utilizados para la obtención de macrófagos. Se les sacrificó mediante dislocación cervical, el fallecimiento fue confirmado mediante presión en las patas posteriores y comprobando la ausencia de reflejos. De acuerdo al protocolo establecido (Sun et al., 2003). Se extrajo el fémur y la tibia para la obtención de la médula ósea, la cual fue cultivada en DMEM/F12 (Cytiva) y suplementada con 20% de suero bovino fetal (SBF) (Cytiva) más el Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (Peprotech). Después de 48 horas las células no adherentes fueron removidas, obteniendo solo los macrófagos pegados en el frasco de cultivo.

4.2 Polarización de macrófagos a fenotipos M1 y M2

Según el estudio de *Ju et al., 2020*, la polarización a macrófagos M1 fue inducida con 1 ug/mL de LPS (Invitrogen) y 20 ng/mL de IFN γ (Peprotech). En tanto, el fenotipo M2 fue estimulado mediante 2 ng/mL de IL-4 y 2 ng/mL de IL-13 (Peprotech).

4.3 Bloqueo de los canales de Panx1

Para efectuar el bloqueo de los canales de Panx1, se utilizaron 200 uM de PBN (Invitrogen) (Silverman et al., 2008). El tratamiento con el bloqueador fue realizado a las 24 y 72 horas.

4.4 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Los niveles de transcritos fueron cuantificados mediante qRT-PCR, para esto se obtuvo RNA a partir de los cultivos de macrófagos tratados con los bloqueadores de canales de Panx1 durante 24 y 72 horas, utilizando el kit de extracción de RNA E.Z.N.A total RNA (Omega Bio-Tek). Posteriormente se obtendrá el cDNA utilizando el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Bioneer). Finalmente se cuantificó la expresión de los genes a estudiar, mediante qRT-PCR, utilizando el kit SYBR Green Supermix (BIO-RAD) y el termociclador QuantStudio3 Real-Time PCR (Applied Biosystems).

Para caracterizar, el fenotipo de los macrófagos tratados con los bloqueadores de canales de Panx1, se utilizaron los marcadores CD80 en el caso del fenotipo M1, para la población de macrófagos tipo M2 se usaron los marcadores CD206 (*Zhou et al., 2017*) (Tabla 1).

Gen	Partidores forward murinos (Desde 5' a 3')	Partidores reverse murinos (Desde 5' a 3')
GAPDH	GCCAAGGTCATCCATGACAAC	GCCTCTCTTGCTCAGTGTCC
IL-6	GATCTCAAAGACAACCAACATGTG	CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG
TNF- α	CATAGCTACCTGGAGTACATGA	CATTCATATTGTCAGTTCTTCG
IL-10	GGCGCTGTCATCGATTTCTCCCC	TGCTTCCCAAGGAAGAACCCCTCC
VEGF	AGCAGAAGTCCCATGAAGTGA	ATGTCCACCAGGGTCTCAAT
CD80	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
CD206	TGGCAATTCAGGAGAGGCAG	AGTGGTTGGAGAAACAGGCA

Tabla 1. Partidores para estudiar los niveles de expresión de citoquinas y factores de crecimiento de los macrófagos M1 y M2 tratados con los bloqueadores, evaluando la expresión de IL-6 y TNF- α , para M1 e IL-10 y VEGF para M2 (Sudo et al., 2008; Vargas, 2011; Ben Addi et al., 2008; Kai et al., 2006; Nakawaki et al., 2019).

4.5 Análisis Estadístico

Los datos fueron presentados como promedios con su error estándar respectivo. Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron mediante el programa GraphPad Prism (version 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Se evaluó la distribución normal de las muestras para determinar si se usará un test paramétrico o no paramétrico.

El tamaño de la muestra se calculó empleando la fórmula: $n = 2 \times (SD)^2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 / d^2$. Donde: n: número de individuos, SD: desviación estándar, $Z_{\alpha/2}$: nivel de significancia, Z_{β} : potencia estadística y d: la diferencia entre la media de los grupos de control y tratamiento. Se estableció un nivel de significancia del 10% ($Z_{\alpha/2} = 1,64$ para pruebas bilaterales) y una potencia estadística del 80% ($Z_{\beta} = 0,84$ para pruebas unilaterales).

A partir de los datos preliminares obtenidos sobre los niveles de expresión de VEGF mediante qRT-PCR, se estimó que sería necesario un mínimo de 7 ratones para la obtención de cultivos celulares.

5 Resultados

5.1 El bloqueo del canal de Panx1 con Probenecid causa un aumento en la polarización a macrófagos tipo M2.

Para evaluar el efecto de bloqueo de los canales de Panx1 en la polarización de macrófagos, se evaluaron la expresión de marcadores de macrófagos M1 (CD80) y M2 (CD206).

Para realizar este estudio se utilizó un n=2 con duplicado, extrayendo médula ósea con macrófagos M0, que fueron expuestos a M-CSF y PBN, luego de incubar por 72 horas, se analizó mediante PCR, el análisis estadístico se llevó a cabo con ANOVA ($p < 0,05$) y t-student. En la figura 5A se aprecia que la expresión de CD80 está aumentada en los macrófagos M1 y disminuida en la población M0 y M2, lo que coincide con su perfil inflamatorio. Tras el bloqueo con PBN se ve un ligero descenso en su expresión comparada con la condición control en el fenotipo M1, aunque no significativa, en el resto de fenotipos se mantuvo estable. En la figura 5B, se observa que CD206 está expresado de manera significativa en M2 con respecto a M1 y no demasiado comparado con M0. Al aplicar PBN, causa un aumento significativo de la expresión de este marcador en la población M2 y M0 en comparación con la condición sin tratar, en la población M1 los niveles son estables.

El análisis sugiere que el bloqueo de Panx1 no afecta significativamente la activación proinflamatoria, pero podría favorecer una polarización hacia el fenotipo M2, apuntando a un posible rol inmunomodulador de Panx1, más notable en la promoción de funciones reparativas.

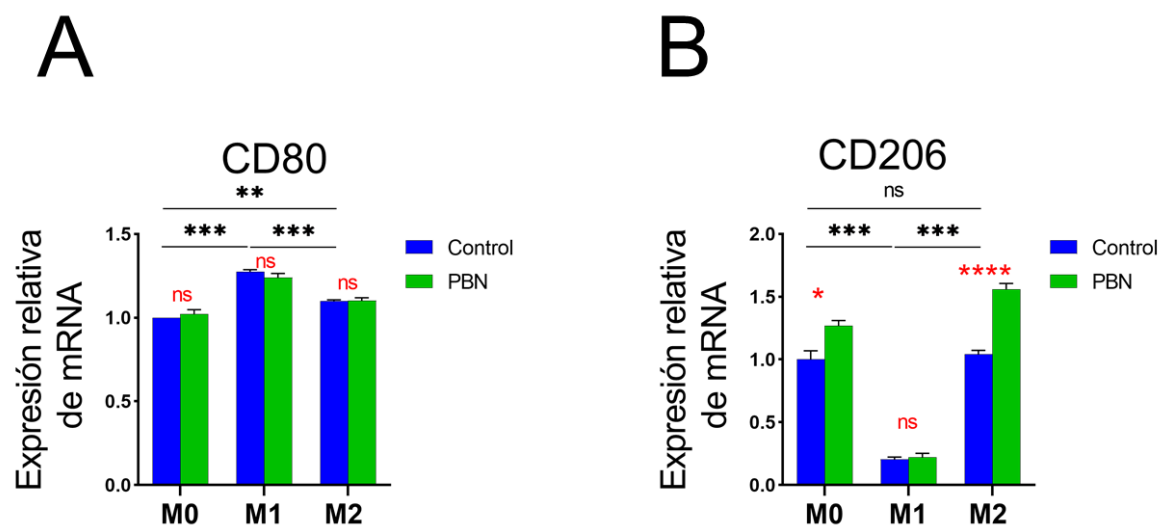


Figura 5. Análisis de la expresión de los marcadores de polarización en macrófagos M0, M1 y M2 en condiciones control (línea azul) y presencia de bloqueo del canal Panx1 con PBN (línea verde). Ns: no significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA seguido de Tukey). Se muestra el marcador proinflamatorio CD80 (A), y el marcador antiinflamatorio CD206 (B). Elaborado con GraphPad (2025)

5.2 El bloqueo de Panx1 no disminuye la expresión de los mediadores inflamatorios

Con la finalidad de evaluar el efecto del bloqueo de los canales de Panx1 en los niveles de expresión de transcritos proinflamatorios y antiinflamatorios en macrófagos M1 y M2, los transcritos proinflamatorios (TNF- α e IL-6) y antiinflamatorios (VEGF) fueron cuantificados.

En la figura 6A, se observa claramente que el nivel de expresión TNF- α es muy superior en la población M1 con respecto a M0 y M2, lo que evidencia su perfil proinflamatorio. Tras bloquear con PBN se observa un aumento estadísticamente significativo de este mediador en relación al control para el fenotipo M1, potenciando la respuesta proinflamatoria, en tanto, este aumento, aunque significativo, fue más discreto en M2, en M0 los niveles no sufrieron variables, en la figura 6B, se muestra la expresión de la citoquina IL-6, la cual es elevada en M1 con diferencia significativa con respecto a M0 y M2, En la condición tratada se observa un aumento no significativo de su expresión en M1, mientras que en el resto de fenotipos los niveles fueron estables.

En la figura 7, la expresión de VEGF se encuentra aumentada significativamente en M1 en comparación a M0 y M2, al tratar con PBN se ve un aumento marcado en macrófagos

M2 y M0 con respecto al grupo control, en M1 se observa un descenso, pero no significativo. IL-10 no pudo ser medido debido a errores en la fase preanalítica.

La inhibición con Probenecid indujo un aumento significativo de TNF- α , lo que podría sugerir una respuesta contexto dependiente. Finalmente, el incremento de VEGF en macrófagos tipo M2 podría implicar a Panx1 en un rol angiogénico.

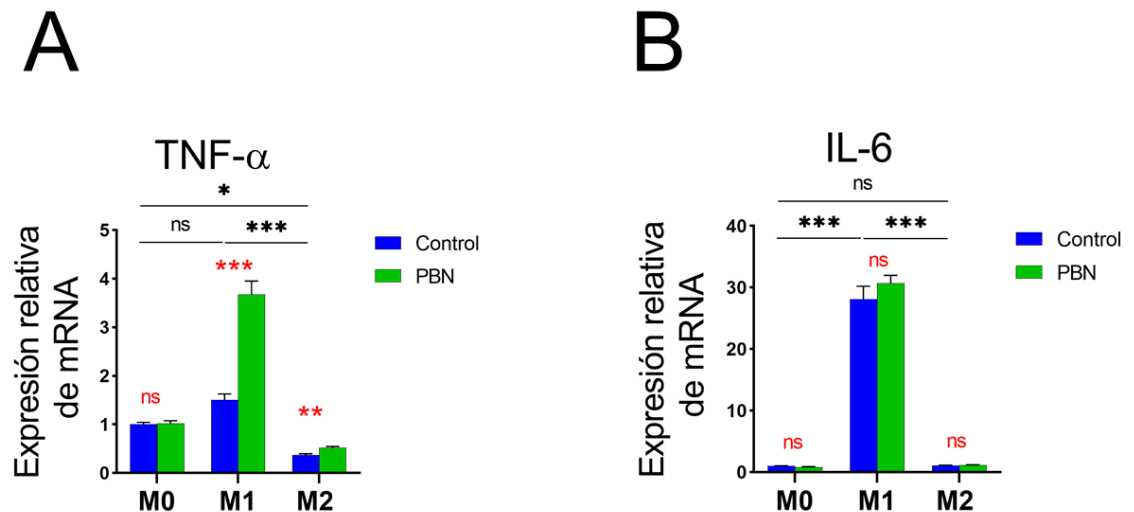


Figura 6. Análisis de la expresión de los mediadores proinflamatorios en macrófagos M0, M1 y M2, en condiciones control (línea azul) y presencia de bloqueo del canal Panx1 con PBN (línea verde). Ns: no significativo, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 (ANOVA seguido de Tukey). Se muestran los mediadores TNF- α (A) e IL-6 (B). Elaborado con GraphPad (2025).

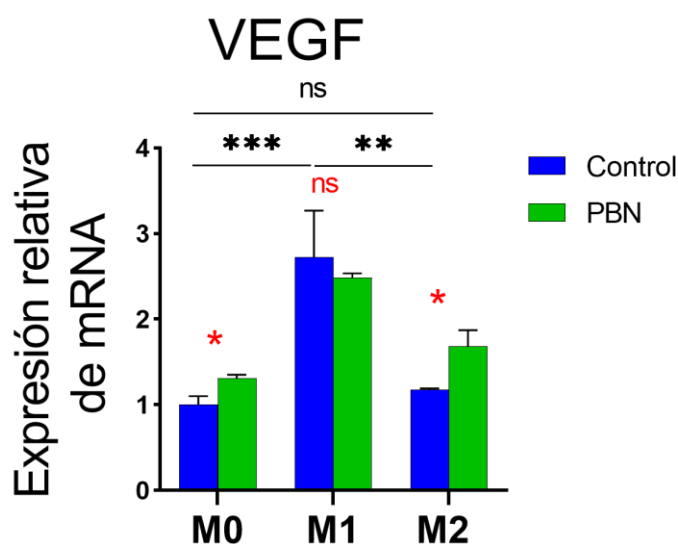


Figura 7. Análisis de la expresión de VEGF en macrófagos M0, M1 y M2 en condiciones control (línea azul) y presencia de bloqueo del canal Panx1 con PBN (línea verde). Ns: no significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA seguido de Tukey). Elaborado con GraphPad (2025)

6 Discusión

Los resultados obtenidos mediante PCR revelaron que al inhibir los canales de Panx1 en macrófagos M0 e inducir la polarización, se registró una disminución del fenotipo M1 proinflamatorio (disminución de la expresión de CD80) y un aumento de la población M2 antiinflamatoria (aumento en la expresión de CD206). Esta tendencia podría interpretarse como una modulación parcial de la activación proinflamatoria, pero insuficiente para ser considerada un cambio fenotípico significativo en el caso de la población M1, contrastando con la población M2, que sugiere una inclinación hacia una polarización antiinflamatoria, coincidiendo con el perfil clásico. Algunos estudios (Cui et al., 2018; Lopez-Castejon et al., 2011). Permiten hipotetizar que ciertos eventos en macrófagos M0 con un microambiente inflamatorio adecuado, podrían favorecer a una polarización al fenotipo M2 por sobre M1, la evidencia directa experimental sobre el bloqueo de Panx1 en macrófagos M0 es muy limitada y poco concluyente.

Por otra parte, el incremento significativo de $\text{TNF-}\alpha$ en macrófagos M1 tras el bloqueo con PBN (Figura 6A) indica un efecto inesperado: la inhibición de Panx1 potencia la producción de citoquinas proinflamatorias, lo que sugiere que este canal podría ejercer un papel negativo regulador de inflamación en ciertos contextos.

En la figura 7, se observó un aumento de VEGF en macrófagos M2 tras el bloqueo, lo que apoya la hipótesis de una reprogramación hacia un perfil proangiogénico y reparativo.

Estos datos sugieren que la inhibición de Panx1 no atenúa la expresión de citoquinas proinflamatorias clásicas en macrófagos, y en algunos casos podría incluso potenciarla, concordando con evidencia reciente (Huang et al., 2020; Zheng et al., 2022). La cual indica que el efecto de Panx1 sobre la inflamación es altamente dependiente del fenotipo celular y del entorno fisiopatológico. Más que suprimir la inflamación, Panx1 podría modular el tono inflamatorio, causando respuestas adaptativas que no se reflejan en cambios estadísticos significativos de expresión génica. Además, diversos estudios (Chen et al., 2019; Chen et al 2023; Wang et al., 2017) sugieren que el bloqueo parcial de Panx1 en presencia de estímulos podría potenciar los mediadores liberados según el fenotipo.

Los efectos del bloqueo de Panx1 sobre la polarización de macrófagos podrían requerir condiciones más complejas o estímulos combinados para manifestarse plenamente.

7 Conclusiones

El bloqueo de los macrófagos M0 con PBN mostró mayor tendencia de polarización hacia el fenotipo M2 por sobre M1

La inhibición de Panx1 mediante PBN produjo cambios significativos en la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF-alfa.

VEGF mostró un aumento en la condición tratada para el fenotipo M2, sugiriendo que el bloqueo de Panx1 puede llegar a alterar la expresión de forma significativa.

Los datos sugieren que Panx1 podría actuar como un modulador del microambiente inflamatorio más que como responsable de la polarización génica de macrófagos.

8 Bibliografía

1. A. Ben Addi, A. Lefort, X. Hua, F. Libert, D. Communi, C. Ledent, P. Macours, S.L. Tilley, J.M. Boeynaems, B. Robaye
2. Adamson S., Leitinger N. (2014). The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation. 588(8):1416-22. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.009>
3. Allan, S.M.; Tyrrell, P.J.; Rothwell, N.J. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, 5, 629-640.
4. Bao, L., Locovei, S., & Dahl, G. (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Letters*, 572, 65-68.
5. 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(4):706-16. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.09.025> .
6. Bennett M., Garré J., Orellana J., Bukauskas F., Nedergaard M., Sáez J. (2012). Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res.* 2012 Dec 3;1487:3-15. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.08.042>
7. Bond, S.R., & Naus C.C.G (2014). The pannexins: past and present. *Frontiers in Physiology*, 5(58), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00058> .
8. Cao W., Peters J.H., Nieman D., Sharma M., Watson T. and Yu J. (2015) Macrophage subtype predicts lymph node metastasis in oesophageal adenocarcinoma and promotes cancer cell invasion in vitro. *Br. J. Cancer* 113, 738–746 10.1038/bjc.2015.292
9. Chekení, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski, E. R., et al. (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467 (7317), 863–867. doi:10.1038/nature09413
10. Chelvarajan RL, Liu Y, Popa D, Getchell ML, Getchell TV, Stromberg AJ, et al. Molecular basis of age-associated cytokine dysregulation in LPS-stimulated macrophages. *J Leukoc Biol.* 2006;79:1314–27.
11. Chen W, Zhu S, Wang Y, Li J, Qiang X, Zhao X, Yang H, D'Angelo J, Becker L, Wang P, Tracey KJ, Wang H. Enhanced Macrophage Pannexin 1 Expression and Hemichannel Activation Exacerbates Lethal Experimental Sepsis. *Sci. Rep.* 2019;9(1):1–12.
12. Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci.* 1993 Jul;306(1):42-8. doi: 10.1097/00000441-199307000-00011. PMID: 8328509.
13. Clark, R. A. (Ed.). (2013). The molecular and cellular biology of wound repair. Springer Science & Business Media.

14. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, Roy S. 2015. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *The American journal of pathology* 185(10):2596-2606.
15. Dahl, G.; Keane, R.W. Pannexin: from discovery to bedside in 11±4 years? *Brain Res.*, 2012, 1487, 150-159.
16. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. 2013. Tissue-resident macrophages. *Nature immunology* 14(10):986-995.
17. Diegelmann R.F., Evans M.C. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* 2004;9:283–289. doi: 10.2741/1184.
18. Diotallevi, M., Nicol, T., Ayaz, F., Bailey, J., Shaw, A., McNeill, E., Davies, B., Channon, K. M., Crabtree, M. J. Isolation and In vitro Culture of Bone Marrow-Derived Macrophages for the Study of NO-Redox Biology. *J. Vis. Exp.* (183), e62834, doi:10.3791/62834 (2022).
19. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. 2014. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41(1):21-35.
20. Filiberto AC, Spinosa MD, Elder CT, Su G, Leroy V, Ladd Z, Lu G, Mehaffey JH, Salmon MD, Hawkins RB, Ravichandran KS, Isakson BE, Upchurch GR, Sharma AK. Endothelial pannexin-1 channels modulate macrophage and smooth muscle cell activation in abdominal aortic aneurysm formation. *Nat. Commun.* 2022;13(1):1–11.
21. Fonder M.A., Lazarus G.S., Cowan D.A., Aronson-Cook B., Kohli A.R., Mamelak A.J. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008;58:185–206. doi: 10.1016/j.jaad.2007.08.048.
22. Fontainhas, A.M.; Wang, M.; Liang, K.J.; Chen, S.; Mettu, P.; Damani, M.; Fariss, R.N.; Li, W.; Wong, W.T. Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One*, 2011, 6, e15973.
23. Goren, I.; Allmann, N.; Yogev, N.; Schurmann, C.; Linke, A.; Holdener, M.; Waisman, A.; Pfeilschifter, J.; Frank, S. A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: Effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am. J. Pathol.* 2009, 175, 132–147.
24. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, Garcia-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38(4):792-804.
25. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G. 2012. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *The American journal of pathology* 180(4):1340-1355.

26. Huang G, Bao J, Shao X, Zhou W, Wu B, Ni Z, Wang L. (2020). Inhibiting pannexin-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury via decreasing NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis. *Life Sci.* 2020 Aug 1;254:117791. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117791. Epub 2020 May 19. PMID: 32416166.
27. Jung BC, Kim SH, Lim J, Kim YS. Activation of Pannexin-1 Mediates Triglyceride-Induced Macrophage Cell Death. *BMB Rep.* 2020;53(11):588–593.
28. Kai, H., Shibuya, K., Wang, Y., Kameta, H., Kameyama, T., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Honda, S.-i., Matsumoto, I., Koyama, A., Sumida, T. and Shibuya, A. (2006), Critical role of M. tuberculosis for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57BL/6 mice. *Immunology*, 118: 233-239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02361.x>
29. Lemaire I, Falzoni S, Zhang B, Pellegatti P, Di Virgilio F. The P2X7 Receptor and Pannexin-1 Are Both Required for the Promotion of Multinucleated Macrophages by the Inflammatory Cytokine GM-CSF. *J. Immunol.* 2011;187(7):3878–3887.
30. Li J., Chen J., Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol.* 2007;25:9–18. doi: 10.1016/j.clindermatol.2006.09.007.
31. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):75-81. doi: 10.1126/science.276.5309.75. PMID: 9082989.
32. McGrath M.H., Simon R.H. Wound geometry and the kinetics of wound contraction. *Plast Reconstr. Surg.* 1983;72:66–73. doi: 10.1097/00006534-198307000-00015.
33. Mofazzal Jahromi, M.A.; Sahandi Zangabad, P.; Moosavi Basri, S.M.; Sahandi Zangabad, K.; Ghamarypour, A.; Aref, A.R.; Karimi, M.; Hamblin, M.R. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018, 123, 33–64.
34. Moore, K. L., Dalley, A. F. and Agur, A. (2017). Clinically oriented anatomy (8th ed.). Lippincott Williams and Wilkins.
35. Murray P. J., Allen J. E., Biswas S. K., Fisher E. A., Gilroy D. W., Goerdts S., Gordon S., Hamilton J. A., Ivashkiv L. B., Lawrence T., et al. 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. [Published erratum appears in 2014 *Immunity* 41: 339–340.] *Immunity* 41: 14–20.
36. Mustoe T. Understanding chronic wounds: A unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am. J. Surg.* 2004;187:S65–S70. doi: 10.1016/S0002-9610(03)00306-4.
37. Nakawaki, M., Uchida, K., Miyagi, M., Inoue, G., Kawakubo, A., Satoh, M. and Takaso, M. (2019), Changes in Nerve Growth Factor Expression and Macrophage Phenotype Following Intervertebral Disc Injury in Mice. *J. Orthop. Res.* 37: 1798-1804. <https://doi.org/10.1002/jor.24308>
38. Nikovics K., Morin H., Riccobono D., Bendahmane A. and Favier A.L. (2020) Hybridization-chain-reaction is a relevant method for in situ detection of M2d-like

macrophages in a mini-pig model. *FASEB J.* 34, 15675–15686
10.1096/fj.202001496R

39. Nunan R., Harding K.G., Martin P. Clinical challenges of chronic wounds: Searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis. Model. Mech.* 2014;7:1205–1213. doi: 10.1242/dmm.016782.
40. Orellana J., Froger N., Ezan P., Jiang J., Bennett M., Naus C., Giaume C., Sáez JC. (2011). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem.* 118(5):826-40. <https://doi.org/10.1111%2Fj.1471-4159.2011.07210.x>
41. Pelegrin P., Surprenant A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 1;25(21):5071-82. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>
42. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 2006;25(21):5071–5082
43. Peñuela S., Gehi R., Laird DW. (2013) The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta.* 1828(1):15-22. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.017>
44. Pham, T., St-Pierre, M-E., Ravel Chapuis, A., Parks, T., Langlois, S., Penuela, S., Jasmin, B., Cowan, K. (2018). Expression of Pannexin 1 and Pannexin 3 during skeletal muscle development, regeneration, and Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol.* 1–14. <https://doi.org/10.1002/jcp.26629>
45. Reinke J.M., Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.* 2012;49:35–43. doi: 10.1159/000339613.
46. Santos SACS, Persechini PM, Henriques-Santos BM, Bello-Santos VG, Castro NG, Costa de Sousa J, Genta FA, Santiago MF, Coutinho-Silva R, Savio LEB, Kurtenbach E. P2X7 Receptor Triggers Lysosomal Leakage Through Calcium Mobilization in a Mechanism Dependent on Pannexin-1 Hemichannels. *Front. Immunol.* 2022;13(February):1–13.
47. Schenk U., Westendorf A., Radaelli E., Casati A., Ferro M., Fumagalli M., Verderio C., Buer J., Scanziani E., Grassi F. (2008). Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal.* 1(39):ra6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.1160583>
48. Sennett R, Rendl M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2012;23:917–927. doi: 10.1016/j.semcd.2012.08.011.
49. Sharma AK, et al. Mesenchymal stem cells attenuate NADPH Oxidase-Dependent High Mobility Group Box 1 production and inhibit abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2016;36:908–918.

50. Sheng J, Ruedl C, Karjalainen K. 2015. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* 43(2):382-393.
51. Shook, B.; Xiao, E.; Kumamoto, Y.; Iwasaki, A.; Horsley, V. CD301b+ macrophages are essential for effective skin wound healing. *J. Investig. Dermatol.* 2016, 136, 1885–1891.
52. Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. 2015. Macrophage polarization in pathology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72(21):4111-4126.
53. Silverman, W., Locovei, S., & Dahl, G. (2008). Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(3), C761–C767. doi:10.1152/ajpcell.00227.2008
54. Spiller, K. L., Wrona, E. A., Romero-Torres, S., Pallotta, I., Graney, P. L., Witherel, C. E., & Vunjak-Novakovic, G. (2016). Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization. *Experimental Cell Research*, 347(1), 1-13.
55. Sudo, K., Yamada, Y., Saito, K., Shimizu, S., Ohashi, H., Kato, T., ... Seishima, M. (2008). TNF- α and IL-6 signals from the bone marrow derived cells are necessary for normal murine liver regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1782(11), 671–679. doi:10.1016/j.bbadis.2008.09.010
56. Sun, S., Guo, Z., Xiao, X., Liu, B., Liu, X., Tang, P.-H., & Mao, N. (2003). Isolation of Mouse Marrow Mesenchymal Progenitors by a Novel and Reliable Method. *Stem Cells*, 21(5), 527–535. doi:10.1634/stemcells.21-5-527
57. Vargas Vidal, L. A. (2011). Efecto inmunomodulador de metimazol en modelo murino de tiroiditis autoinmune experimental. [Tesis de licenciatura, Universidad Austral de Chile]. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fcv2971e/doc/fcv2971e.pdf>
58. Varol C, Mildner A, Jung S. 2015. Macrophages: development and tissue specialization. *Annual review of immunology* 33:643-675.
59. Woehrle, T., Yip, L., Elkhail, A., Sumi, Y., Chen, Y., Yao, Y., et al. (2010). Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* 116 (18), 3475–3484. doi:10.1182/blood-2010-04-277707
60. Xiong, X. X., Gu, L. J., Shen, J., Kang, X. H., Zheng, Y. Y., Yue, S. B., et al. (2014). Probenecid protects against transient focal cerebral ischemic injury by inhibiting HMGB1 release and attenuating AQP4 expression in mice. *Neurochem. Res.* 39 (1), 216–224. doi:10.1007/s11064-013-1212-z
61. Yang K., Xiao Z., He X., Weng R., Zhao X., & Sun T.(2022). Mechanisms of Pannexin 1 (PANX1) Channel Mechanosensitivity and Its Pathological Roles. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3),1523-1540 <https://doi.org/10.3390/ijms23031523>

62. Yao, Y., Xu, X. H., & Jin, L. (2019). Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Frontiers in immunology*, 10, 792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>
63. 6. Chen X, Yuan S, Mi L, Long Y, He H. Pannexin1: insight into inflammatory conditions and its potential involvement in multiple organ dysfunction syndrome. *Front Immunol*. (2023) 14:1217366. doi: 10.3389/fimmu.2023.1217366
64. Wang X, Qin W, Xu X, Xiong Y, Zhang Y, Zhang H, et al. Endotoxin-induced autocrine atp signaling inhibits neutrophil chemotaxis through enhancing myosin light chain phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2017) 114:4483–8.
65. Cui K, Ardell CL, Podolnikova NP, Yakubenko VP. Distinct Migratory Properties of M1, M2, and Resident Macrophages Are Regulated by Alphasbeta2 and Alphasbeta2 Integrin-Mediated Adhesion. *Front Immunol* (2018) 9:2650. doi: 10.3389/fimmu.2018.02650
66. Lopez-Castejon G, Baroja-Mazo A, Pelegrin P. Novel Macrophage Polarization Model: From Gene Expression to Identification of New AntiInflammatory Molecules. *Cell Mol Life Sci* (2011) 68:3095–107. doi: 10.1007/ s00018-010-0609-y