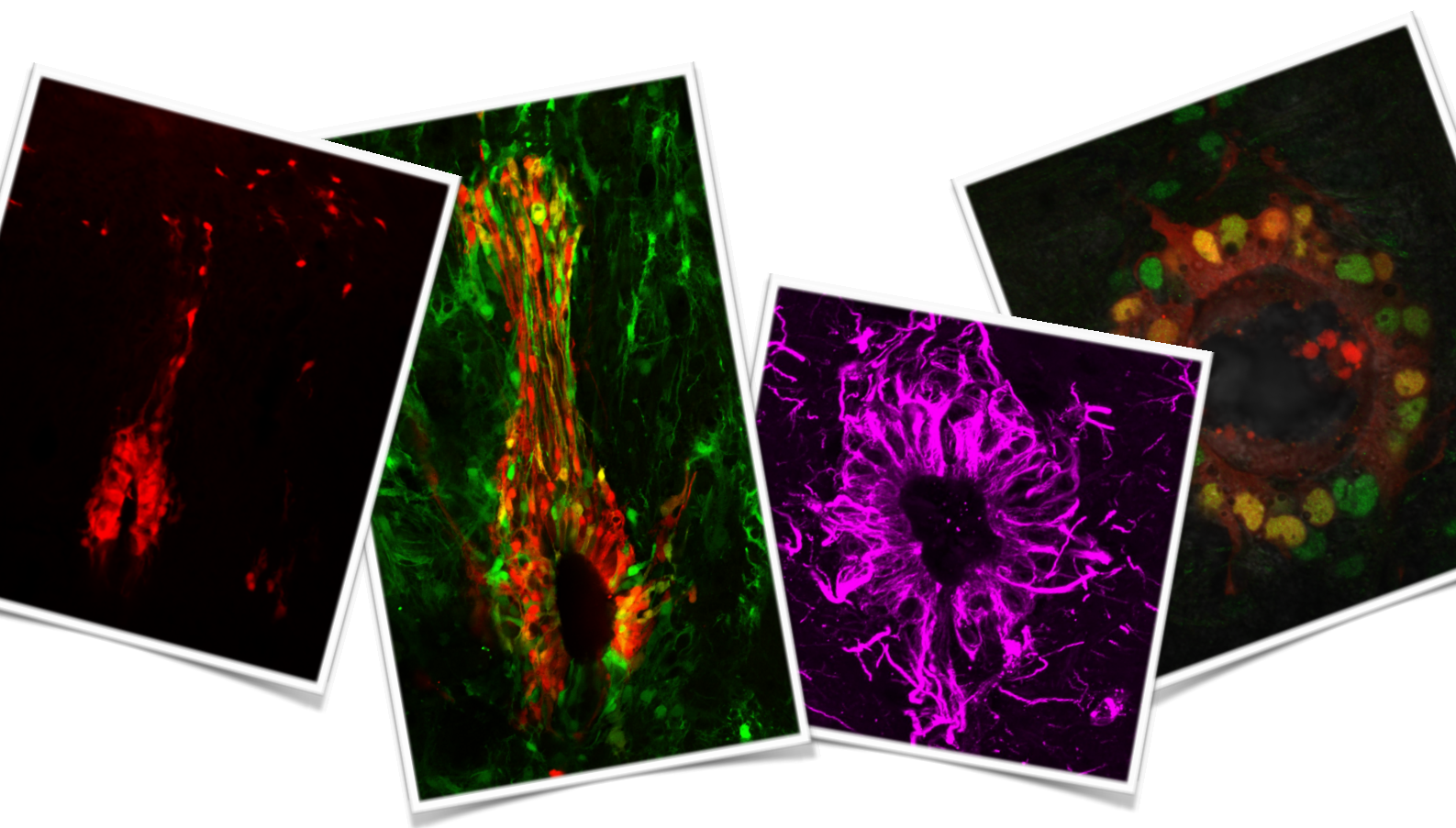


# Modulación purinérgica en las células ependimarias de la médula espinal

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas  
PEDECIBA - Neurociencias



**Estudiante:** Lic. Cecilia Maciel

**Director:** Dr. Raúl Russo

**Tribunal:** Presidente: Dra. Patricia Cassina

Vocales: Dr. Hugo Peluffo y Dra. Nathalia Vitreira

## RESUMEN 4

## INTRODUCCIÓN 6

El problema: lesiones traumáticas de la médula espinal 6

El epéndimo en la médula espinal: un nicho latente de células progenitoras 8

Respuesta de las células endimarias de la médula espinal frente a la lesión 12

Tratamientos existentes para la regeneración de la médula espinal 14

Señalización purinérgica y progenitores neurales 15

## OBJETIVOS 20

Objetivo general 20

Objetivos específicos 20

## MATERIALES Y MÉTODOS 21

Animales 21

Lesión de la médula espinal 21

Inyección intramedular de BzATP 22

Fijación de los tejidos 24

Ensayos de proliferación 24

Inmunohistoquímica 24

Diseños experimentales 26

Análisis de datos 28

## RESULTADOS 29

## DISCUSIÓN 45

Los endimocitos como células madre latentes 45

Migración de células derivadas del epéndimo hacia la cicatriz glial 46

Filamentos intermedios y plasticidad fenotípica de las células endimarias 47

El despertar del epéndimo: reactivación de la proliferación mediante receptores  
P2X7 50

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 54

BIBLIOGRAFÍA 56

AGRADECIMIENTOS 65

# RESUMEN

El epéndimo de la médula espinal de los mamíferos posee varios elementos característicos de los nichos de células madre y representa una fuente potencial de plasticidad para la reparación endógena de la médula espinal. La respuesta del epéndimo a la injuria es fundamental para limitar la extensión del daño ya que el bloqueo selectivo de la proliferación de las células endimarias aumenta el daño secundario y la muerte axonal. Parte de este efecto positivo es debido a que las células derivadas del epéndimo liberan factores tróficos que mejoran la supervivencia neuronal en regiones adyacentes a la lesión. Sin embargo, los mecanismos por los que la lesión activa este nicho “latente” de células progenitoras son desconocidos.

Se sabe que luego de una lesión hay un aumento masivo del ATP extracelular alrededor del tejido lesionado. La hipótesis de trabajo de esta tesis es que la señalización a través de receptores purinérgicos es un importante regulador de la respuesta de los progenitores endimarios frente a la lesión. El objetivo central de esta tesis fue analizar el rol de los receptores P2X7 en la reacción temprana de las células endimarias a la lesión utilizando como modelo experimental ratones adultos. En primer lugar caracterizamos los cambios en la biología de las células endimarias que se desencadenan luego de una hemisección dorsal de la médula espinal. Para evidenciar la migración de las células endimarias y de su progenie utilizamos un ratón transgénico Foxj1CreER-tdTomato.

En el marco de la plasticidad inducida por una lesión espinal, nos centramos en estudiar si la señalización purinérgica en este nicho de células mimetiza algunos de los cambios que se producen luego de una lesión. Para esto realizamos inyecciones intramedulares de BzATP -un agonista de los receptores P2X7- y estudiamos los cambios fenotípicos y la actividad proliferativa de los endimocitos producidos por el agonista. Encontramos que la inyección de BzATP mimetiza algunos de los cambios que produce la lesión espinal.

Dado que los cambios fenotípicos que se producen tanto en respuesta a la lesión como a la aplicación del BzATP son similares (e.g., aumento en la expresión de GFAP), nos preguntamos si las células que proliferan son las que expresan GFAP.

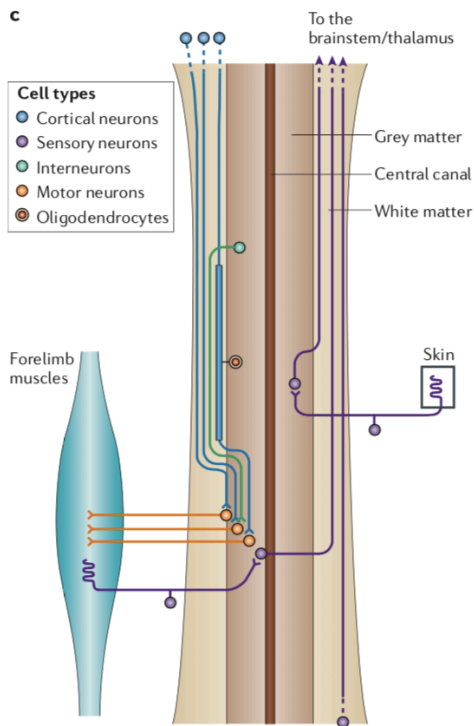
Este trabajo sugiere que los receptores P2X7 están implicados en la reacción temprana de las células ependimarias a la lesión y plantea la posibilidad de que representen un blanco potencial para modular la biología de las células ependimarias con el fin de lograr una reacción más adaptativa.

# INTRODUCCIÓN

## **El problema: lesiones traumáticas de la médula espinal**

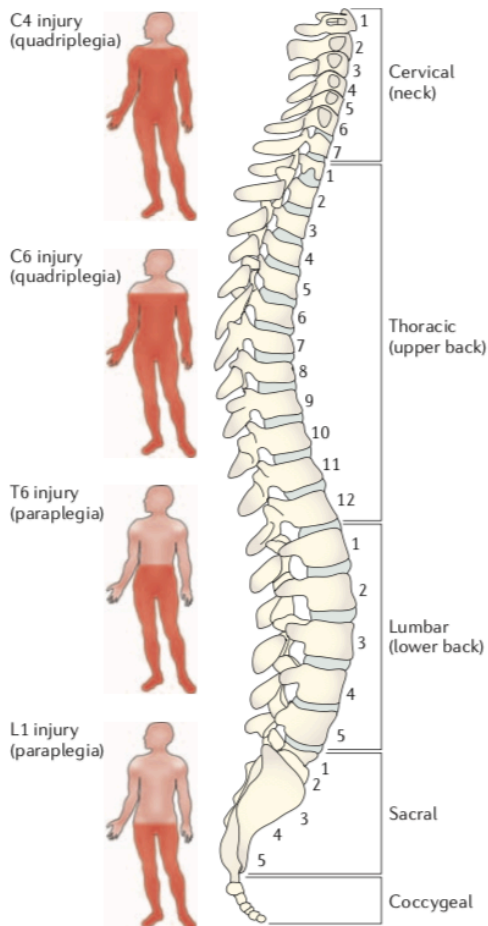
Las lesiones espinales son condiciones debilitantes para las cuales no existen aún tratamientos clínicos efectivos (DeBrot et al., 2018). Algunas de las consecuencias que comúnmente traen aparejadas son, la deficiencia en el control de esfínteres (intestino y vejiga), las funciones autónomas y la movilidad, junto con condiciones secundarias como las úlceras por presión (Simpson et al., 2012). La lesión traumática de la médula espinal no solo afecta la salud de la persona lesionada, sino que también genera efectos sociales, emocionales y económicos en su entorno. Una revisión literaria sobre artículos que estudiaron la epidemiología de la lesión espinal entre los años 1993 y 2017 afirma que la incidencia de las lesiones medulares varía por región o país y que se incrementó gradualmente con el aumento de la actividad humana. Mientras que la incidencia en países desarrollados varió de 13,1 a 163,4 cada 1.000.000 personas, la incidencia en países no desarrollados varió de 13,0 a 220,0 cada 1.000.000 personas (Kang et al., 2018).

La causa más común de lesión medular son los accidentes de tránsito, seguida por accidentes domésticos en la población de edades más avanzadas (Singh et al., 2014). Las lesiones medulares impiden la conducción de señales sensitivas de la periferia al sistema nervioso central y motoras del sistema nervioso central hacia los efectores. En la figura 1 se muestran los circuitos neuronales (proyecciones largas y circuitos locales) que se pueden ver afectados en las lesiones. El impacto que generan estas lesiones están determinadas por el nivel de la médula espinal dañada: cuanto más alto es el daño espinal, una mayor parte del cuerpo se verá afectada. Generalmente las lesiones localizadas más rostralmente están asociadas a peores afectaciones funcionales siendo el nivel cervical el que más comúnmente se lesiona (Kang et al., 2018). Las lesiones pueden ser clasificadas en completas e incompletas. Las incompletas son aquellas en las que las funciones sensitivas y motoras están parcialmente presentes por debajo del sitio de la lesión (Fig. 2) (Maynard et al., 1997).



**Figura 1. Vías neurales en la médula espinal.** Los axones descendentes provenientes de la corteza y el tronco encefálico así como axones propioespinales proyectan a neuronas motoras en el asta ventral de la médula espinal. Los axones sensoriales del sistema nervioso periférico conectan con las neuronas sensoriales de segundo orden en el asta dorsal, que a su vez envían los axones a través de las columnas dorsales y laterales a niveles supraespinales. Los oligodendrocitos mielinizan a los axones de las vías ascendentes y descendentes.

Modificado de Thuret, et al., 2016.



**Figura 2.** Clasificación de la severidad de las lesiones de médula espinal utilizando la escala de la Asociación Americana de Lesión Espinal (ASIA).

A: Completa: No se preserva función motora ni sensitiva en los segmentos sacros S4-S5.

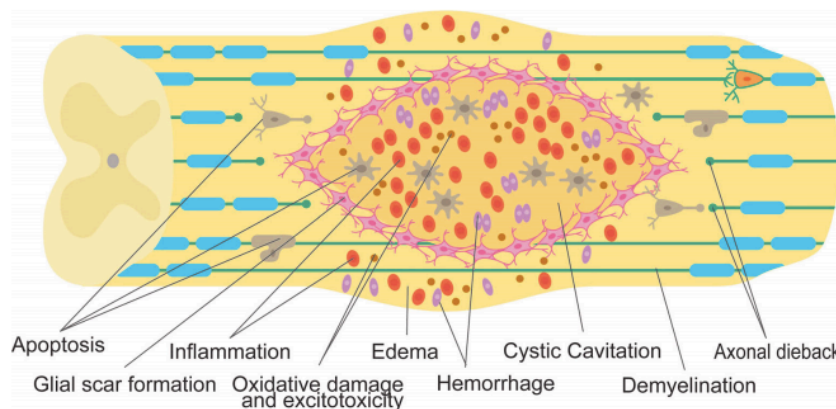
B: Incompleta: Se preserva función sensorial pero no motora por debajo del nivel neurológico lesionado, incluidos los segmentos sacros S4-S5.

C: Incompleta: La función motora es preservada por debajo de la lesión neurológica y más de la mitad de los músculos clave por debajo del nivel de la lesión neurológica tienen un grado muscular menor a 3.

D: Incompleta: La función motora es preservada por debajo del nivel neurológico lesionado, y por lo menos la mitad de los músculos clave por debajo del nivel neurológico lesionado tienen un grado muscular mayor o igual a 3.

E: Normal: Las funciones motoras y sensoriales son normales.

En las lesiones traumáticas hay dos etapas de daño, la lesión primaria y la lesión secundaria. La lesión primaria se produce por el trauma inicial en tanto la lesión secundaria es provocada por la inflamación y la isquemia que genera la lesión primaria (Fig. 3) (DeBrot et al., 2018). Como resultado de la injuria, el microambiente molecular alrededor de la lesión en mamíferos no es permisivo para la regeneración neural. Las citoquinas, entre ellas el factor de necrosis tumoral alfa, la endotelina 1, la interleuquina 1 y 6, la trombina y el factor neutrofílico ciliar pueden desencadenar un fenómeno que se conoce como gliosis (la proliferación y modificación de los astrocitos locales) y contribuir con la formación de un ambiente no permisivo (Fig. 4) (Fitch et al., 2008).

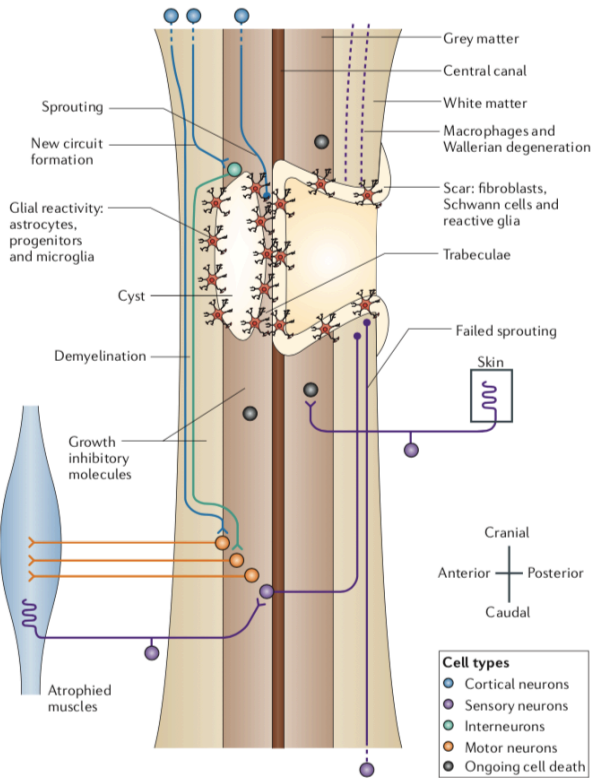


**Figura 3.** Fases fisiopatológicas después de la lesión: 1) la fase aguda (e.g., hemorragia, edema e inflamación), 2) fase subaguda (e.g., desmielinización y retracción axonal) y 3) fase crónica (e.g., formación de cavidades). La lesión primaria es causada por las fuerzas físicas del evento traumático inicial. La lesión secundaria se refiere al daño retrasado y progresivo que incluye inflamación, pérdida de homeostasis iónica, daño oxidativo, excitotoxicidad, apoptosis y necrosis. Los oligodendrocitos son altamente susceptibles a la pérdida apoptótica que resulta en la desmielinización axonal. La cavitación quística se forma en el centro de la médula espinal, con una cicatriz glial circundante en las fases subaguda y crónica. Las células no astrocitarias forman una barrera molecular al secretar inhibidores de crecimiento.

Modificado de Nori et al., 2017.

### **El epéndimo en la médula espinal: un nicho latente de células progenitoras**

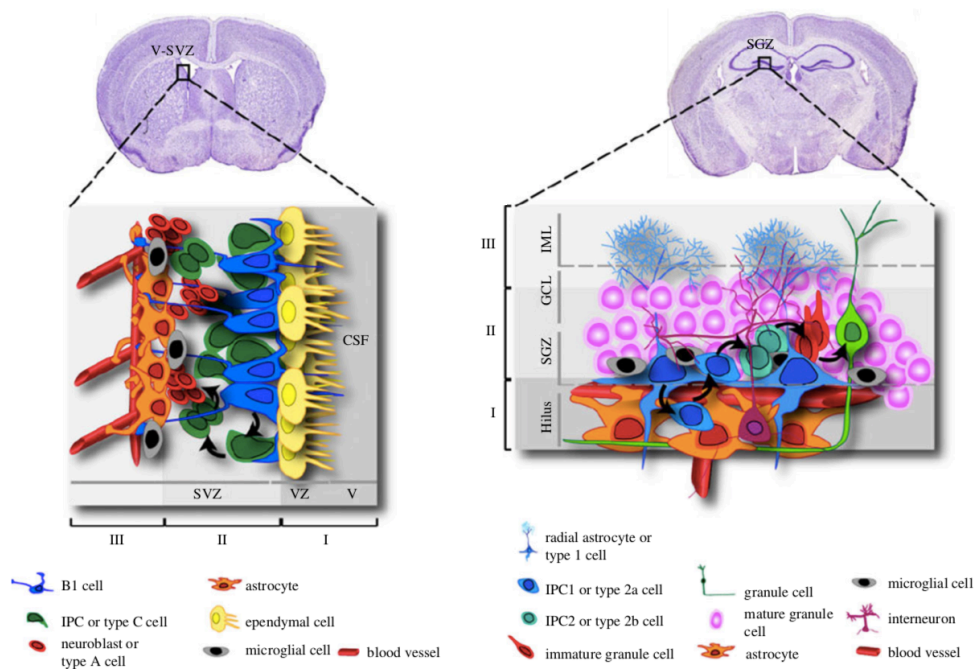
Durante las etapas iniciales del desarrollo del sistema nervioso, los precursores son las células neuroepiteliales que tapizan el tubo neural (Bjornsson et al., 2015). Luego de las primeras rondas de división estas células se transforman en glías radiales, las que primero generan neuronas y luego son utilizadas por las mismas como andamio guía durante su migración desde el nicho germinal en la zona ventricular, hacia la superficie pial para culminar su diferenciación y formar conexiones sinápticas (Kriegstein et al., 2009). Si bien la mayoría de la



**Figura 4.** Representación esquemática de una vista sagital de una región de medula cervical lesionada. Muchas células mueren inmediatamente así como también progresivamente en la fase secundaria de la lesión. Generalmente luego de una lesión por contusión se forma una cavidad quística. Células del sistema nervioso periférico a menudo invaden el sitio de la lesión para formar una cicatriz que incorpora astrocitos, células progenitoras y microglia. Muchos axones ascendentes y descendentes son interrumpidos y no se regeneran las conexiones de larga distancia. Algunos axones forman nuevos circuitos con neuronas motoras a través de interneuronas. En el sitio de formación de quistes, los axones pueden brotar en las trabéculas que se forman a partir de células endimarias. Los segmentos de axones mielinizados desconectados son fagocitados por macrófagos. Se produce alguna remielinización espontánea, en gran parte por las células de Schwann, mientras que los músculos denervados (no espásticos) se atrofian.

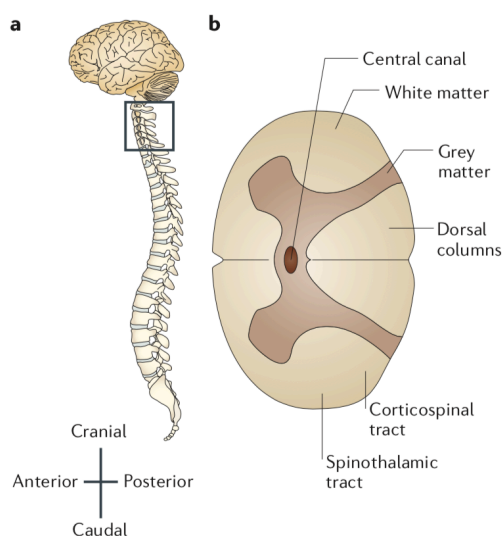
Modificado de Thuret, et al., 2006.

neurogénesis se interrumpe al finalizar el desarrollo, en el sistema nervioso central de mamíferos adultos se conservan dos nichos neurogénicos: la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Fig. 5), (Kriegstein et al., 2009).



**Figura 5.** Esquema de los nichos neurogénicos del cerebro adulto: zona subventricular y zona subgranular. Cortes coronales de cerebro y dibujos esquemáticos de la organización y relación de las diferentes poblaciones de células residentes. Tomado de Lecca, et al., 2016.

En la médula espinal las células endimarias que tapizan el canal central de los mamíferos (o endimocitos) tienen algunas características de células madre (Weiss et al., 1996, Nakano et al., 2019, Marichal et al., 2016). El canal central se extiende rostro caudalmente por el centro de la médula espinal (Fig. 6). Los endimocitos de los roedores se encuentran organizados en un pseudo-epitelio. Estas células son mayormente originadas a partir de la parte ventral del neuroepitelio (Fu et al., 2003) aunque la población dorsal se origina a partir de la parte dorsal del mismo (Xing et al., 2018). El origen diverso de estas células explica probablemente sus propiedades heterogéneas. Las células que dan lugar a las células endimarias son las glías radiales. En ratones este grupo de células prolifera activamente luego del nacimiento, lo que corresponde a la elongación de la médula espinal, la cual dobla su longitud en las primeras nueve semanas posnatales. Durante este periodo, la proliferación se va reduciendo progresivamente (Alfaro- Cervello et al., 2012). Luego de la novena semana de vida no se detectan más divisiones celulares (Sabourin et al., 2009).



**Figura 6.**

a. Esquema que muestra una vista lateral del sistema nervioso central humano.

b. Esquema de una sección transversal de médula espinal humana. En el centro se ve el canal central.

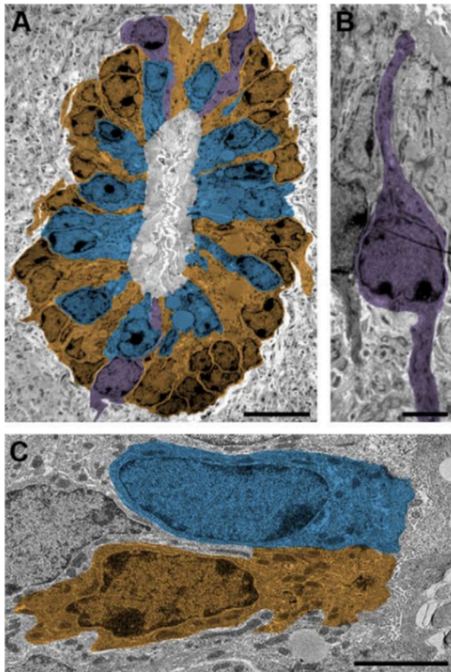
Tomado de Thuret, et al., 2006.

Las particularidades de este pseudo-epitelio son que los extremos apicales de todas las células confluyen hacia la luz del canal y que carece de membrana basal. Las células endimarias están organizadas en dos estratos principales de células. A diferencia de las células de la zona sub-ventricular, en la médula espinal los endimocitos no son multiciliados sino que la mayoría porta dos cilios móviles (9+2) (ocasionalmente uno, tres o cuatro cilios pueden ser encontradas) (Alfaro-

Cervello et al., 2012). Este grupo de células se encuentra a su vez organizado en dominios espaciales. Algunas de las células que tapizan las paredes laterales tienen morfología de célula endotelial cuboidal, con núcleo ovalado y sin proceso basal. Esta estirpe celular ocupa el estrato más próximo a la luz endotelial. Otras células encontradas en las paredes laterales tienen morfología de tanicitos, poseen un largo proceso basal que característicamente contactan la superficie pial o vasos sanguíneos y otra prolongación apical corta que contacta con la luz ventricular. Esta estirpe celular ocupa el segundo estrato (Alfaro-Cervello et al., 2012, Marichal et al., 2012, Hugnot et al., 2011, Hamilton et al., 2009, Bruni et al., 1985, Meletis et al., 2008) y están eléctricamente acopladas por conexina 43 (Marichal et al., 2016). Hay un tercer grupo de células minoritario que tiene morfología de glia radial, con procesos que se extienden desde el lumen del canal central hasta la piamadre. Estas células residen en los polos dorsal y ventral de la capa endotelial (Fig. 7) (Meletis et al., 2008). Si bien las células residentes del polo dorsal y ventral comparten la morfología, expresan distintos marcadores. Mientras que las células que residen en el polo dorsal expresan marcadores típicos de progenitores neurales como nestina, y proteína ácida fibrilar glial (GFAP), las células que residen en el polo ventral no (Hamilton et al., 2009). En las ratas neonatales, las células que contactan los polos del canal central tienen fenotipos electrofisiológicos complejos y se encuentran eléctricamente desacopladas (Marichal et al., 2012, 2016). En condiciones normales, la mayoría de las células endoteliales que incorporan BrdU (bromodeoxiuridina, análogo de la timidina que se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo celular) se encuentran de a pares, lo que indica que la mayoría de las mitosis resultan en duplicación de las células del canal, más que en la generación de otra célula que se va del epéndimo. No parece que en condiciones normales las células abandonen el epéndimo incluso después de bastante tiempo (Meletis et al., 2008).

La capacidad de auto-renovación de las células progenitoras se puede estudiar mediante el cultivo de neuroesferas y su pasaje sucesivo. Las células progenitoras con limitada capacidad de auto-renovación pueden dar lugar a neuroesferas pero son incapaces de generar nuevas neuroesferas cuando son repicadas más de dos veces. El cien por ciento de las neuroesferas derivadas de los endotelios pueden ser re-cultivadas por lo menos ocho veces. El análisis del potencial de

diferenciación de las neuroesferas derivadas de las células endimarias luego de tres pasajes revelan que la totalidad de las neuroesferas son multipotentes y tienen la capacidad para generar *in vitro* neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Meletis et al., 2008). Estos estudios resaltan la potencialidad de las células endimarias como progenitores endógenos en un estado normalmente quiescente.



**Figura 7.** Estructura del canal central. El análisis ultraestructural revela la heterogeneidad morfológica entre las células ciliadas que contactan el lumen, con algunas células que tienen una morfología típica de células endimarias cúbicas, con núcleos ovales (azules) y otras con morfología típica de tanicitos con núcleos irregulares (amarillos). Hay otro tipo celular menos numeroso integrado por las células endimarias radiales (violetas), estas tienen un largo proceso basal orientado a lo largo del eje dorso ventral y residen en el polo dorsal o ventral de la capa endimaria. Existen también fenotipos intermedios entre estos tres grupos.

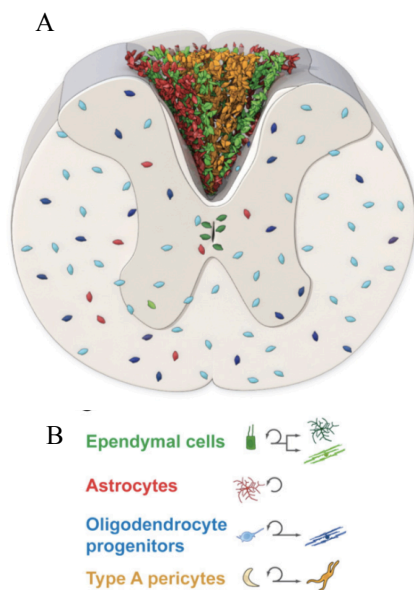
Modificado de Meletis et al., 2008.

### Respuesta de las células endimarias de la médula espinal frente a la lesión

A pesar de que los endimocitos en la médula espinal de roedores adultos parecen estar mitóticamente quiescentes, éstos se dividen activamente en respuesta a un trauma (Mothe y Tator, 2005) generando progenie que migra hacia el sitio de la lesión espinal (Meletis et al., 2008). En la médula lesionada las células endimarias comienzan a visualizarse fuera del epéndimo luego de 4 días de lesión. Las células que migran pierden su fenotipo endimario y dejan de ser inmunorreactivas para Sox2 y Sox3. El análisis ultraestructural revela que el citoplasma de las células endimarias que migran es más oscuro por el gran contenido de filamentos (Meletis et al., 2008).

En respuesta a la lesión la progenie derivada de las células endimarias *in vivo* se diferencian mayoritariamente en astrocitos que integran la cicatriz glial y en unos

pocos oligodendrocitos mielinizantes (Sabelström et al., 2013). Los factores ambientales parecen ser los responsables que impiden que las células derivadas del epéndimo se diferencien en neuronas y en un número suficiente de oligodendrocitos *in situ* (Stenudd et al., 2015). La activación de las células endimarias es requerida para restringir la ampliación secundaria de la lesión (Sabelström et al., 2013), sin embargo el hecho de que se generen poco oligodendrocitos hace que sea una respuesta fisiológica ineficaz.



**Figura 8.**

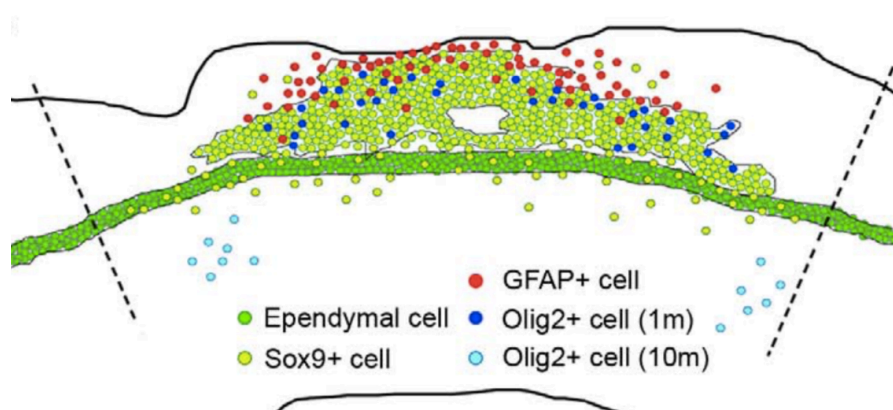
Componentes celulares de la cicatriz glial. A. Distribución de la progenie inducida por la lesión a partir de células endimarias (verdes), astrocitos (rojas), progenitores de oligodendrocitos (azules), pericitos tipo A (naranjas) 4 meses después de una incisión del funículo dorsal.

B. Representación esquemática que muestra el destino de las células endimarias, los astrocitos, los progenitores de oligodendrocitos y los pericitos de tipo A en una lesión de la médula espinal.

Modificado de Sabelstrom et al., 2013.

Las células derivadas del epéndimo se acumulan en la cicatriz glial permaneciendo por lo menos diez meses luego del insulto, ocupando el 18.3 por ciento del área total de la cicatriz, concentrándose en el centro de la misma. En la cicatriz glial, además de las células derivadas del epéndimo hay astrocitos y oligodendrocitos residentes y células derivadas de los pericitos (Fig. 8). La reacción de las células endimarias se restringe al segmento lesionado y no a los segmentos adyacentes. Como algunas células endimarias tienen procesos en la línea media dorsal, es posible que su activación sea desencadenada por la ruptura de esos procesos. Sin embargo, las lesiones laterales en la medula espinal (sin tocar los procesos distales de algunas células endimarias), genera también progenie y migración de las células endimarias hacia el lado lesionado. A pesar de ello, la reacción es menor, lo que sugiere que si bien no es necesaria la lesión de los procesos, ésta aumenta la respuesta (Meletis et al., 2008).

El análisis del destino de las células derivadas del epéndimo revela que la mayoría de las células son inmunoreactivas para Sox9 y vimentina. Una población más pequeña de células derivadas del epéndimo expresan GFAP y nestina pero la mayoría de las células con este fenotipo no son derivadas del epéndimo, sino que son astrocitos residentes. Dentro de las células que derivan del epéndimo, las células que expresan GFAP y nestina típicamente se localizan cerca de la superficie de la médula, mientras que las células positivas para Sox9 y vimentina se localizan más en el centro de la cicatriz glial (Meletis et al., 2008). Ninguna de las células derivadas del epéndimo en el tejido lesionado tiene morfología neuronal ni son inmunoreactivas para NeuN. En el primer mes luego de la lesión la población de células que derivan del epéndimo y expresan Olig 2 (marcador de oligodendrocitos) se distribuye alrededor del sitio de la lesión y tiene una ultraestructura correspondiente a oligodendrocitos inmaduros (Fig. 9) (Meletis et al., 2008).



**Figura 9.** Distribución de las células derivadas del epéndimo y su fenotipo molecular en la cicatriz glial.

Modificado de Meletis et al., 2008.

### **Tratamientos existentes para la regeneración de la médula espinal**

Si bien aún no hay tratamientos efectivos para regenerar la médula espinal, existen muchos abordajes clínicos para intentar mitigar el daño secundario y muchos grupos de investigación están estudiando nuevas estrategias y combinaciones de las mismas para llegar a un tratamiento que logre generar una recuperación funcional satisfactoria. Los acercamientos terapéuticos que actualmente se aplican en la clínica, centrados en minimizar el daño secundario luego del trauma primario, son la cirugía temprana de descompresión, el mantenimiento de la presión sanguínea constante y la terapia con metilprednisolona. Hay algunos tratamientos que están en

fase de investigación, como los tratamientos de tipo farmacológico y los tratamientos con células (dentro de los cuales se utilizan células de Schwann, células gliales envainantes olfativas, células madre mesenquimales, células precursoras neurales, macrófagos activados, células progenitoras de oligodendrocitos, entre otras) (Donovan et al., 2018).

Algunos grupos de investigación están estudiando en animales de laboratorio, la combinación de la inoculación de células pluripotentes en el sitio del daño y la introducción de materiales que sirvan como andamio para crear un micro ambiente que aumente la viabilidad celular y provea una guía para los axones en crecimiento (DeBrot et al., 2018). Se ha demostrado que los progenitores de células neurales pueden funcionar reduciendo la inflamación, secretando citoquinas neuroprotectoras, reemplazando células perdidas, proveyendo apoyo trófico local y actuando como andamio para la regeneración axonal, además de reducir la cavitación quística, remielinizar los axones dañados y mejorar la salida comportamental (Donovan et al., 2018).

En este sentido las células endimarias son un componente positivo para la regeneración medular ya que su respuesta es fundamental para la formación de la cicatriz glial, lo que impide que la lesión primaria se expanda. Además las células derivadas del epéndimo secretan factores tróficos que mejoran la supervivencia neuronal (Sabelström et al., 2013). Por lo tanto, es posible que desde el punto de vista terapéutico tenga sentido potenciar la respuesta de los progenitores que yacen en el epéndimo. Para esto es fundamental entender los mecanismos responsables de la reactivación de las células endimarias.

### **Señalización purinérgica y progenitores neurales**

Las células endimarias responden ante una lesión, pero, ¿cuáles son los mecanismos responsables para que dichas células cambien hacia un fenotipo de célula proliferante? Las señales que pueden regular la biología de estos progenitores en la médula normal y lesionada siguen siendo poco conocidas. Se sabe que luego de una lesión hay un aumento masivo del ATP extracelular alrededor del tejido lesionado (Wang et al., 2004). En este trabajo nos planteamos

como hipótesis que el aumento extracelular de ATP puede ser lo que cause la activación de los endoteliales.

La señalización purinérgica es una forma de señalización extracelular mediada por nucleótidos purínicos y nucleosidos como adenosina y ATP e involucra la activación de receptores purinérgicos regulando distintas funciones celulares. El ATP es secuencialmente degradado por ectonucleotidasas a ADP, AMP y adenosinas. Esta señalización juega un rol clave en el sistema nervioso central normal y patológico. Durante el desarrollo, el ATP, regula procesos como la proliferación celular, migración, diferenciación y sinaptogénesis (Marichal et al., 2016). En cuanto a la proliferación y diferenciación, se sabe que en el desarrollo del cerebro y de la médula espinal la señalización purinérgica actúa sinérgicamente con los factores de crecimiento peptídicos para regular la proliferación sincrónica y la especificación final de las células multipotentes neurales a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos (Lecca et al., 2016). En la adultez, algunos mecanismos purinérgicos son silenciados, pero pueden ser restaurados luego de una lesión, lo que sugiere el rol de la señalización purinérgica en la regeneración por medio de la activación de las células progenitoras neurales (Lecca et al., 2016). Los receptores purinérgicos pueden promover o inhibir la proliferación, migración, diferenciación, necrosis y apoptosis de células progenitoras neurales en el adulto (Tang et al., 2016).

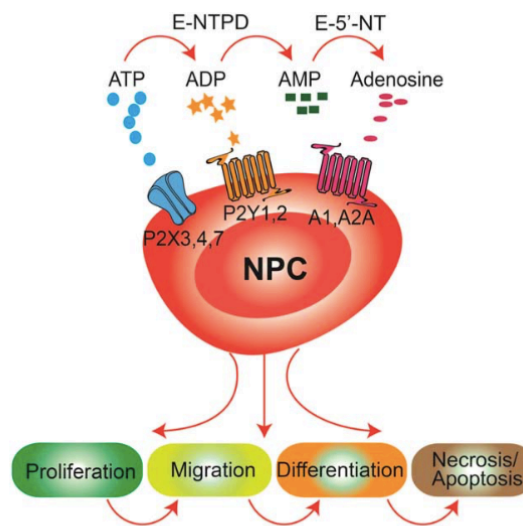
El ATP puede actuar como una señal de peligro que difunde para alertar sobre el daño. Existen varios receptores de tipo ionotrópico (P2X) y metabotrópico (P2Y) para el ATP (Barlett et al., 2014). Comparando con otros receptores P2X, los receptores P2X7 requieren para su activación por lo menos un logaritmo de concentración de ATP más alto que los otros (Barlett et al., 2014). En otras palabras, este receptor posee un alto umbral para ser activado razón por la cual se propone como un receptor candidato para señalar el daño en donde se da una gran liberación de ATP (Marichal et al., 2016). El receptor P2X7 está codificado por el gen P2RX7 y pertenece a la familia P2X de canales catiónicos triméricos, de los cuales hay siete miembros distintos (P2X1-7). Cada subunidad está caracterizada por tener intracelularmente un extremo amino terminal corto respecto al extremo carboxilo terminal, así como también un sitio de unión al ATP formado por dos segmentos transmembrana hidrofóbicos separados por un largo dominio extracelular

glicosilado. La señalización aguas abajo desencadenada por la activación de P2X7 es dependiente de varios factores, incluidos el tipo celular, las condiciones extracelulares, y la concentración extracelular de ATP.

La activación del receptor P2X7 mediante ATP extracelular permite el pasaje de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como también el de otros cationes pequeños, incluido  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{K}^{+}$ , a través de la membrana plasmática. La estimulación prolongada del receptor con ATP lleva a la formación de poros más grandes y reversibles, lo que permite la entrada de iones orgánicos (Barlett et al., 2014). La activación del receptor P2X7 sostenida o repetida induce poros de membrana grandes y no selectivos que eventualmente puede llevar a la muerte celular (Sperlagh et al., 2014). La activación de P2X7 en las células progenitoras en nichos neurogénicos del adulto resulta en una cascada de eventos pudiendo afectar su proliferación, migración y diferenciación, llevando en situaciones extremas a la apoptosis (Fig. 10) (Tang et al., 2016). Algunas vías de señalización asociadas con la activación de P2X7 incluyen la activación de Caspasa-1 y el subsecuente proceso de liberación de moléculas proinflamatorias, como también la formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Barlett et al., 2014).

Estudios de inmunofluorescencia revelaron la presencia de P2X7 en la zona subventricular de los ventrículos laterales (Genzen et al., 2009) y en la zona subgranular del hipocampo (Lesson et al., 2018) en ratones adultos. La totalidad de las células endimarias de los ventrículos laterales responden al BzATP en una concentración de 100 a 1000  $\mu\text{M}$ . El BzATP es un agonista de los receptores P2X que tienen de 5 a 30 veces más potencia por el receptor P2X7 que el ATP (Anderson et al., 2006; Bianchi et al., 1999; Michel et al., 2001). Las corrientes entrantes inducidas por el BzATP fueron mayores a aquellas inducidas por una concentración equimolar de ATP. La respuesta inducida por BzATP fue reducida con una preincubación con los antagonistas de los receptores P2X7 oATP y Brilliant Blue G (BBG). Las corrientes inducidas en las células endimarias de los ventrículos laterales por la aplicación de BzATP están ausentes en el modelo de ratón “knock out” para P2X7. No hay evidencias de que haya una respuesta compensatoria de otro receptor P2X, ya que incluso al aplicar 1 mM de ATP no se registra ninguna corriente entrante (Genzen et al., 2009). La infusión de ATP en los ventrículos

laterales del cerebro de ratón resulta en un incremento de las divisiones celulares en la zona subventricular (Sushama et al., 2012).



**Figura 10.** Receptores purinérgicos en las células progenitoras neurales adultas. El ATP extracelular se descompone sucesivamente en ADP, AMP y adenosina por las familias de ectonucleotidasas: ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NPD-1 y 22) degradan ATP y ADP a AMP, mientras que la ecto-5-nucleotidasa (E-5-NT) degrada el AMP a adenosina. No se muestran las enzimas adicionales involucradas en el metabolismo de ATP, como la pirofosfatasa ectonucleótida (E-NPP) y la fosfatasa alcalina. Mientras que la RT-PCR y la inmunofluorescencia demuestran la existencia de casi todos los subtipos de receptores P2X, P2Y y receptores de adenosina en las células progenitoras neurales adultas, solo P2X3,4,7 y P2Y1,2, así como los receptores de adenosina A1, 2A parecen iniciar/modular ciertas funciones de las células progenitoras neurales adultas. Las purinas extracelulares regulan la proliferación, migración, diferenciación y necrosis/apoptosis de las células progenitoras neurales adultas.

Tomado de Tang, et al., 2016.

Estudios de inmunohistoquímica revelaron también la expresión de P2X7 en la mayoría de las células de la zona endimaria de la médula espinal de ratas neonatales (Marichal et al., 2016). Trabajos recientes muestran que hay un incremento en la expresión de los receptores P2X7 en la médula espinal luego de una lesión (Gómez-Villafuertes et al., 2015). Registros de patch-clamp en el epéndimo de ratas neonatales, revelaron la inducción de una corriente entrante lenta en respuesta a la aplicación sostenida por más de 1 segundo de una alta concentración de ATP (1 mM). Una concentración equimolar de BzATP genera corrientes más grandes, lo que se puede explicar con el hecho de que el BzATP es de 10 a 30 veces más potente que el ATP para activar a los receptores P2X7. Esta corriente tiene una relación lineal corriente/voltaje, es revertida a 0 mV y es bloqueada con BBG, lo que indica que es mediada por activación de los receptores P2X7. La imagenología de Ca<sup>2+</sup> reveló que la aplicación de BzATP produce ondas de Ca<sup>2+</sup> en las células endimarias que se propagan desde el sitio de aplicación del agonista purinérgico (Marichal et al. 2016). Es posible especular que la activación del receptor P2X7 por ATP, mediante la generación de la corriente entrante de Ca<sup>2+</sup> y la liberación de Ca<sup>2+</sup> a partir de los reservorios intracelulares, puede ser un componente importante en la reactivación del nicho latente de células progenitoras en el epéndimo (Marichal et al., 2016). En este trabajo se quiere diseccionar él o los mecanismos que subyacen la activación de células endimarias,

poniendo foco en la señalización purinérgica y los receptores P2X7, apuntando a entender su papel en las lesiones.

# HIPÓTESIS

La señalización purinérgica a través de los receptores P2X7 es parte central de los mecanismos que desencadenan la activación de la proliferación, migración y los cambios fenotípicos de las células endimarias luego de una lesión.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

-Determinar la posibilidad de que la señalización purinérgica juegue un rol en la reactivación del nicho latente de células progenitoras que contactan el canal central .

### Objetivos específicos

-Caracterización del epéndimo de la médula espinal como nicho de células madre latentes con marcadores específicos conocidos de progenitores neurales como marco al estudio de la plasticidad inducida por la lesión.

-Caracterizar la respuesta de las células endimarias frente a una lesión traumática analizando la posible migración de células derivadas del epéndimo, la proliferación, la expresión de marcadores específicos y la redistribución de los filamentos del citoesqueleto.

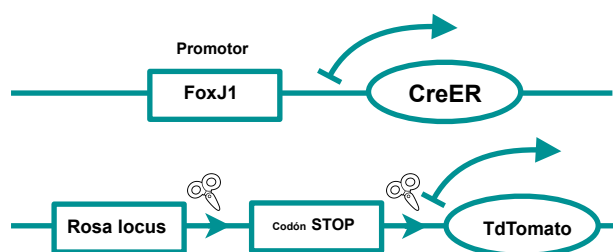
-Caracterizar la respuesta de las células endimarias frente a la exposición de BzATP (agonista específico del receptor P2X7) con el fin de evaluar si esto reproduce los eventos desencadenados por la lesión.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Animales

Los experimentos fueron realizados en ratones adultos (P 90-120) C57Bl/6J (C57 "silvestres"), FoxJ1CreER-R26R tdTomato (donación de Jonas Frisén, Instituto Karolinska, Suecia), GFAP-GFP (donación de Frank Kirchoff, Universidad de Saarland, Alemania) y la cruce de los dos anteriores, FoxJ1CreER-R26R tdTomato x GFAP-GFP. Mientras que los ratones GFAP-GFP expresan constitutivamente la proteína reportera GFP bajo el control del promotor del gen de la proteína GFAP, los ratones FoxJ1CreER-tdTomato son inducibles. Bajo el control del promotor humano de FOXJ1 (que está activo en forma selectiva en las células con cilio mótil) se encuentra la secuencia de la enzima Cre recombinasa (CreER). En el ROSA locus 26 de expresión constitutiva se encuentra la secuencia de la proteína reportera tdTomato con un codón "stop floxeado" que la antecede. Cuando la Cre se une con el tamoxifeno, se transloca al núcleo y recombina entre los sitios LoxP, escindiendo el "codón stop" quedando la proteína reportera con expresión constitutiva por lo que las células recombinadas y su progenie expresarán el tdTomato. En nuestros experimentos, la recombinación se indujo mediante una inyección diaria intraperitoneal de tamoxifeno durante cinco días (Sigma, 2 mg/kg, 20 mg/ml en 1: 9 etanol: aceite de maíz).

En la Figura 11 se esquematiza la construcción de ADN del ratón FoxJ1CreER-tdTomato.



**Figura 11.** Construcción de ADN de los ratones FoxJ1CreER-tdTomato.

## Lesión de la médula espinal

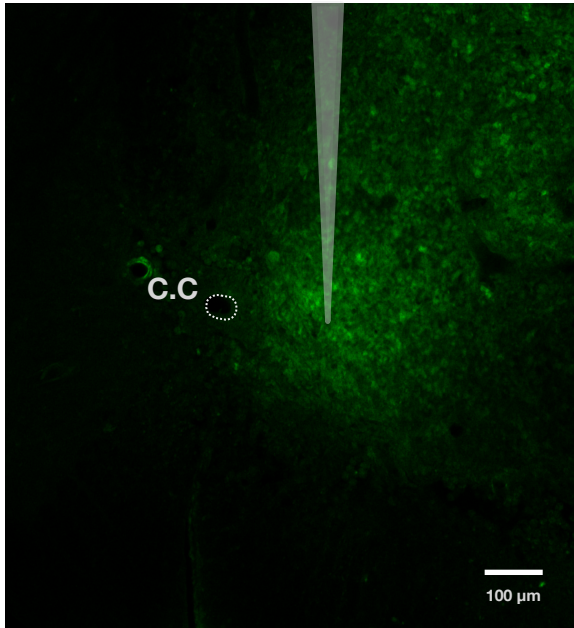
En los ratones FoxJ1CreER-tdTomato, las lesiones se realizaron 5 días luego de la última inyección de tamoxifeno para permitir la depuración de este fármaco y evitar una recombinación espúrea.

El procedimiento quirúrgico utilizado para las lesiones de la médula espinal es similar al descrito por Meletis et al. (2008). En ratones sedados con diazepam (Laboratorio ICU-VITA, 5mg/kg) y anestesiados con ketamina (Laboratorio König, 100 mg/kg) y xilacina (Laboratorio Unimedical, 10 mg/kg), que no respondieron a estímulos dolorosos se les realizó una laminectomía para -luego de abrir la duramadre- realizar una hemisección dorsal de la médula espinal con una tijera de microcirugía. Posteriormente, la lesión se extendió en sentido rostral para abarcar aproximadamente un segmento. Las lesiones fueron realizadas en el segmento lumbar de la médula. En el grupo de animales control (lesión ficticia) se realizó una laminectomía quedando la médula expuesta y se abrió la duramadre sin realizar una lesión traumática (en este trabajo los animales a los que se les realizó este procedimiento se denominan “control”). Tanto los animales lesionados como los controles se mantuvieron aislados y recibieron una inyección intraperitoneal de tramadol (Laboratorio Richmond, 5 mg/kg i.p), flumazenil (Laboratorio Libra, 0,5 mg/kg) y yohimbina (Laboratorio Vetcross, 2 mg/kg) luego de la operación con el fin de sacarlos del plano anestésico y aliviar el dolor post-operatorio. A las 24 horas de la operación se les administró subcutáneamente la misma dosis de tramadol. Los animales fueron sacrificados a los 3, 8, 15 o 30 días luego de la lesión.

Los animales a los que se les denomina “normal” son aquellos animales a los que no se les realizó ni lesión ni laminectomía así como los procedimientos quirúrgicos previos (e.g., anestesia, incisión en la piel, etc).

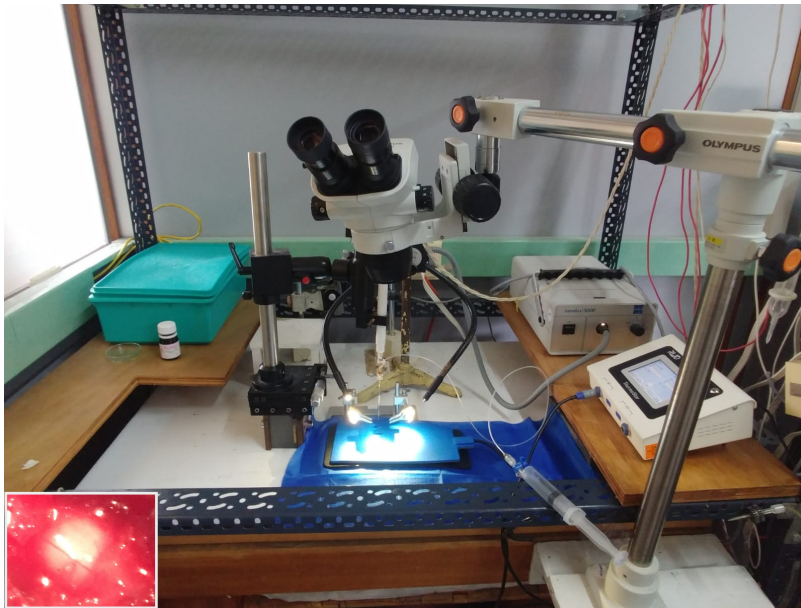
### **Inyección intramedular de BzATP**

Para estudiar el rol de los receptores P2X7 se realizaron inyecciones localizadas de 1  $\mu$ l del agonista selectivo BzATP (Tocris, 1 mM) dentro de la médula. Para las inyecciones intramedulares los animales se sedaron y anestesiaron de la misma manera que para las lesiones. Las inyecciones se realizaron con pipetas de vidrio graduadas (Hirschmann ring caps 9600105) estiradas con un puller Sutter P-87 para obtener una punta de alrededor de 40  $\mu$ m de diámetro. Las micropipetas de inyección fueron montadas en un “holder” fijado a un micromanipulador motorizado controlado digitalmente. Las coordenadas de la inyección fueron 700  $\mu$ m de profundidad desde la superficie dorsal de la médula y a 0.55 mm de distancia de la línea media. Para confirmar la zona de influencia de la inyección, inyectamos junto



**Figura 12.** Corte transversal de la médula espinal en la que se inyectó BzATP con fluoresceína (1  $\mu$ l). En verde se observa el halo que dejó la fluoresceína. La línea punteada marca la luz del canal central (C.C).

con la droga 0.02 g/ml de fluoresceína. En la figura 12 se muestra un corte transversal de una médula espinal que fue inyectada, en verde se observa el halo de fluoresceína. La pipeta se introdujo en el tejido en pasos de 20  $\mu$ m para minimizar la lesión mecánica. La droga se inyectó a una velocidad de 0.1  $\mu$ l/min. Luego de la inyección esperamos 10 minutos antes de retirar la pipeta en pasos de 20  $\mu$ m cada 15 s. En la figura 13 se ilustra el set up utilizado para las inyecciones.



**Figura 13.** Set up utilizado para las inyecciones intraespinales de BzATP o vehículo, En la imagen insertada se observa cómo se visualiza a través de la lupa la médula espinal luego de la laminectomía.

## **Fijación de los tejidos**

La fijación de los tejidos se hace mediante perfusión intracardíaca. Los animales se sedan con diazepam (10 mg/kg) y se anestesian con ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg). El sistema se lava con 25 ml de suero fisiológico suplementado con nitrito de sodio (Backer, 200 µl cada 25 ml al 2%), citrato de sodio (Backer, 200 µl cada 25 ml al 1%) y luego se fija con 50 ml de paraformaldehído al 4% (PFA, Applichem) en buffer fosfato (PB, 0.1 M, pH 7.4).

## **Ensayos de proliferación**

El ensayo estándar de proliferación consiste en dos inyecciones de BrdU (100 mg/kg i.p., Sigma) por día con cuatro horas de diferencia entre sí, durante 3 días (a las 24, 48 y 72 h luego de la operación). Un segundo ensayo de proliferación (ensayo de saturación) consistió en 6 inyecciones de 50 mg/kg de BrdU cada dos horas el día de la perfusión. Luego de la última inyección se deja una hora de sobrevida y luego se fija el tejido. Este último ensayo se realizó únicamente en el protocolo G que se detalla más adelante.

## **Inmunohistoquímica**

Luego de la fijación se disecan las médulas y se incuban por inmersión en PFA durante toda la noche. Posteriormente se lavan y se encastran en una mezcla de gelatina, albúmina y glutaraldehído (1 ml de albúmina al 45%, 500 µl de gelatina al 1,5%, 60 µl de glutaraldehído, Sigma) para cortar en vibrátomo secciones transversales de 70 µm de espesor. Las rodajas se dispusieron de manera seriada en placas de 24 pocillos en PB con 0.1 m/v de azida (Laboratorio Carlo Ebra) para evitar contaminaciones. Posteriormente, las rodajas fueron lavadas con PB e incubadas en la solución de permeabilización por una hora (PB con 0.3% v/v de tritón (PBT) (Sigma) X100) o directamente en el anticuerpo primario diluido en solución de permeabilización (48 horas en agitación a temperatura ambiente). Las rodajas fueron luego lavadas 3 veces en PB durante 10 minutos para ser ulteriormente incubadas con anticuerpos secundarios especie específicos conjugados con Alexa 488, Alexa 633 o Alexa 543. La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó en agitación durante 90 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron nuevamente las rodajas (3 veces en agitación

durante 10 minutos a temperatura ambiente) y en algunos casos se incubaron con DAPI (Invitrogen, 1 mg/10 ml) por 10 minutos para teñir los núcleos. Para el marcaje de los núcleos que incorporaron BrdU se incubaron los cortes 35 min en PBT-HCl (8.5 ml-1.5 ml) y luego se lavaron con PB 10 veces (5 minutos cada vez en agitación) con el fin de exponer el ADN al anticuerpo. En las Tablas 1 y 2 se detallan los anticuerpos primarios, secundarios y fluoróforos que se utilizaron.

**Tabla 1:** Anticuerpos primarios utilizados.

Antígeno	Animal de origen	Concentración utilizada	Laboratorio	Biotinilado
Nestina	Ratón	1:20	Hibridoma bank	No
Vimentina	Ratón	1:10	Hibridoma bank	No
Sox2	Cabra	1:100	Santa Cruz	No
BrdU	Ratón	1:50	Hibridoma bank	No
Ki67	Conejo	1:500	Abcam	No
GFAP	Conejo	1:200	SIGMA	No
RFP	Conejo	1:500	Rockland	Si
Rodamina-faloidina	-	1:100	Invitrogen	-
DAPI	-	1 mg/100ml	Invitrogen	-

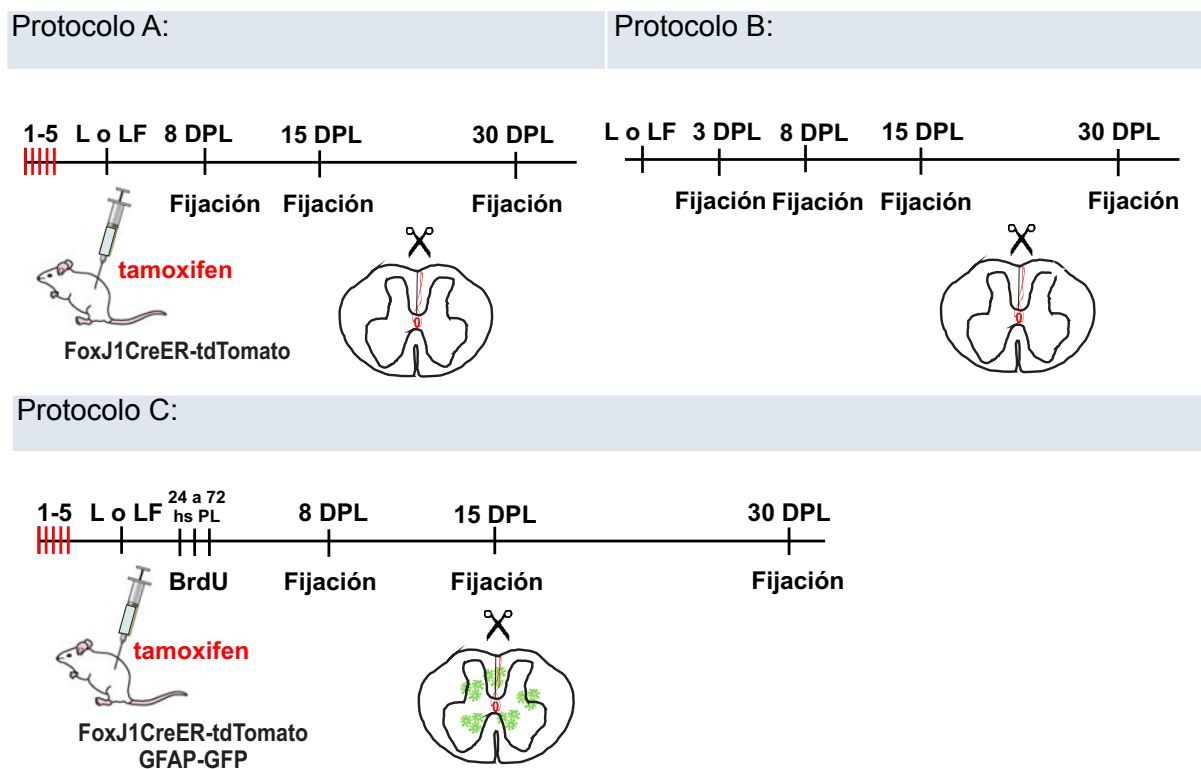
**Tabla 2:** Anticuerpos secundarios y fluoróforos utilizados.

Antígeno	Fluoróforo	Concentración utilizada	Laboratorio
Región Fc de anticuerpos de ratón	Alexa 488nm	1:500	Invitrogen
Región Fc de anticuerpos de ratón	Alexa 633nm	1:500	Invitrogen
Región Fc de anticuerpos de conejo	Alexa 488nm	1:500	Invitrogen
Región Fc de anticuerpos de conejo	Alexa 543nm	1:500	Invitrogen
Región Fc de anticuerpos de cabra	Alexa 488nm	1:500	Invitrogen
Región Fc de anticuerpos de cabra	Alexa 633nm	1:500	Invitrogen
- (Streptavidina)	Alexa 488nm	1:400	Invitrogen

Los preparados se visualizaron con los microscopios confocales Olympus modelo DP 70 y Zeiss modelo LSM 800. Para analizar las imágenes se utilizó el software FIJI y para graficar los resultados y hacer los análisis estadísticos el Prism GraphPad.

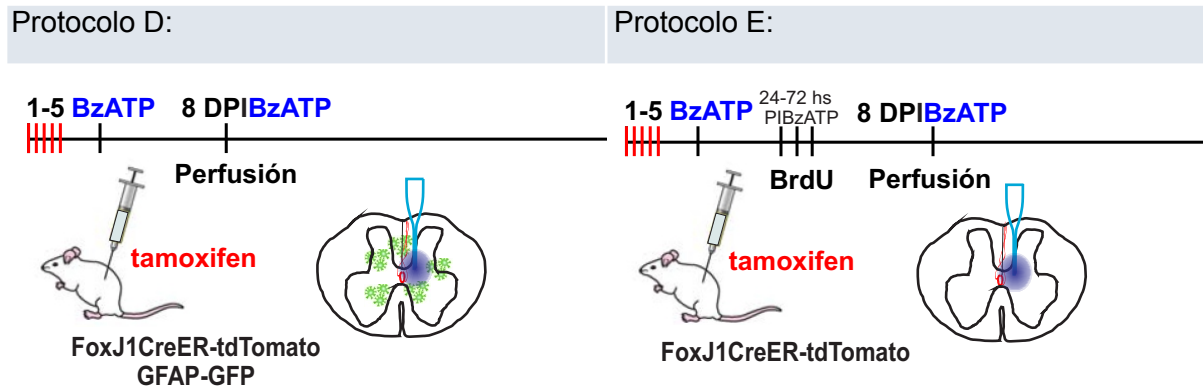
## Diseños experimentales

A continuación se esquematizan los diseños de experimentación utilizados (L: Lesión, LF: Lesión ficticia) para abordar distintos objetivos problema. En primer lugar se muestran los protocolos utilizados para estudiar los cambios morfológicos, fenotípicos y de proliferación de las células endimarias luego de una lesión traumática. Para esto se utilizaron ratones FoxJCreER-tdTomato o FoxJCreER-tdTomato/GFAP-GFP para poder seguir el linaje de los endimocitos (procolo A) y ratones C57 silvestres para el estudio de diferentes marcadores celulares (protocolo B) a distintos tiempos post-lesión. Para el estudio de la proliferación de las células endimarias a distintos tiempos post-lesión se administró a los ratones FoxJ1CreER-tdTomato el análogo de timidina BrdU según se esquematiza en el protocolo C (ensayo se proliferación estándar).

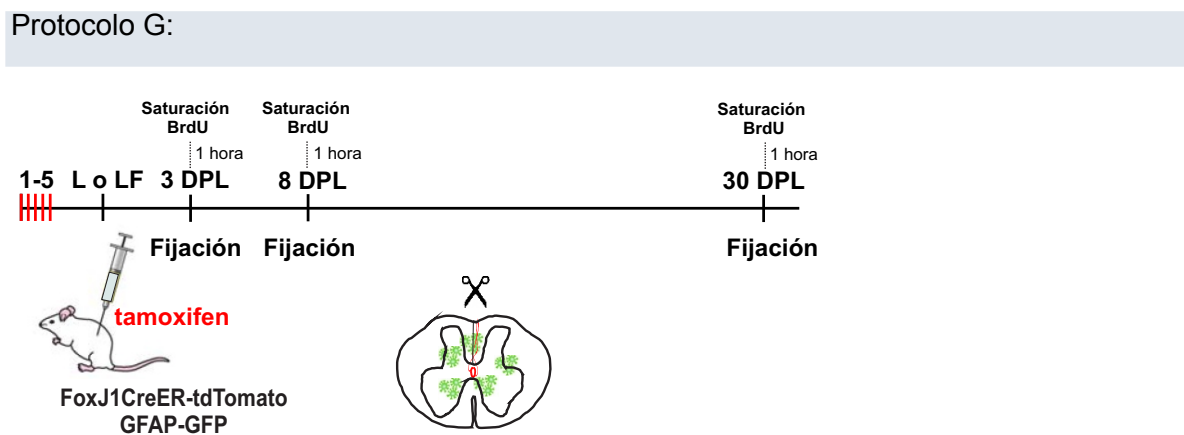
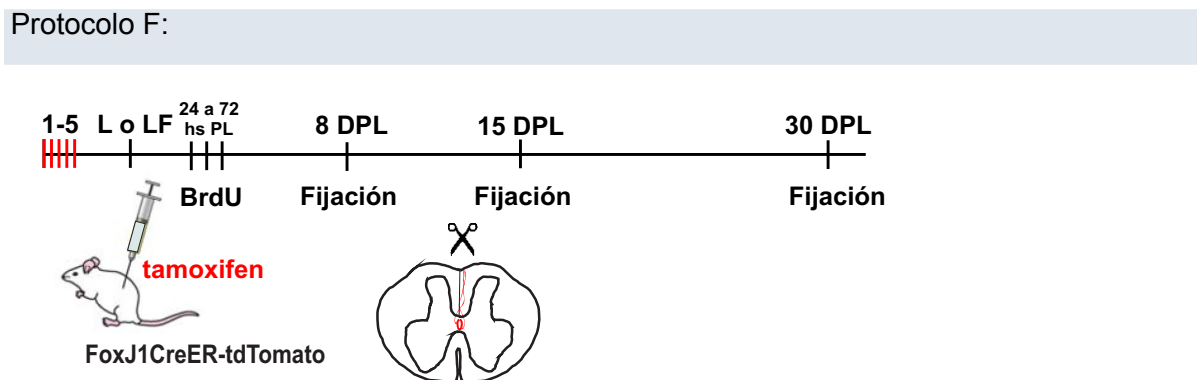


Los efectos de la señalización purinérgica a nivel fenotípico y de la proliferación sobre las células endimarias se estudiaron mediante inyecciones intramedulares de BzATP en ratones FoxJ1CreER-tdTomato/GFAP-GFP según el protocolo D. Además estudiamos si la droga tiene algún efecto en la proliferación de las células

ependimarias según el protocolo E utilizando ratones FoxJ1CreER-tdTomato (ensayo de proliferación estándar).



Para el estudio de la proliferación de las células GFAP positivas y negativas a distintos tiempos post-lesión se administró BrdU a ratones FoxJ1CreER-tdTomato GFAP-GFP según los protocolos F y G, utilizando los ensayos de proliferación estándar y de saturación respectivamente.



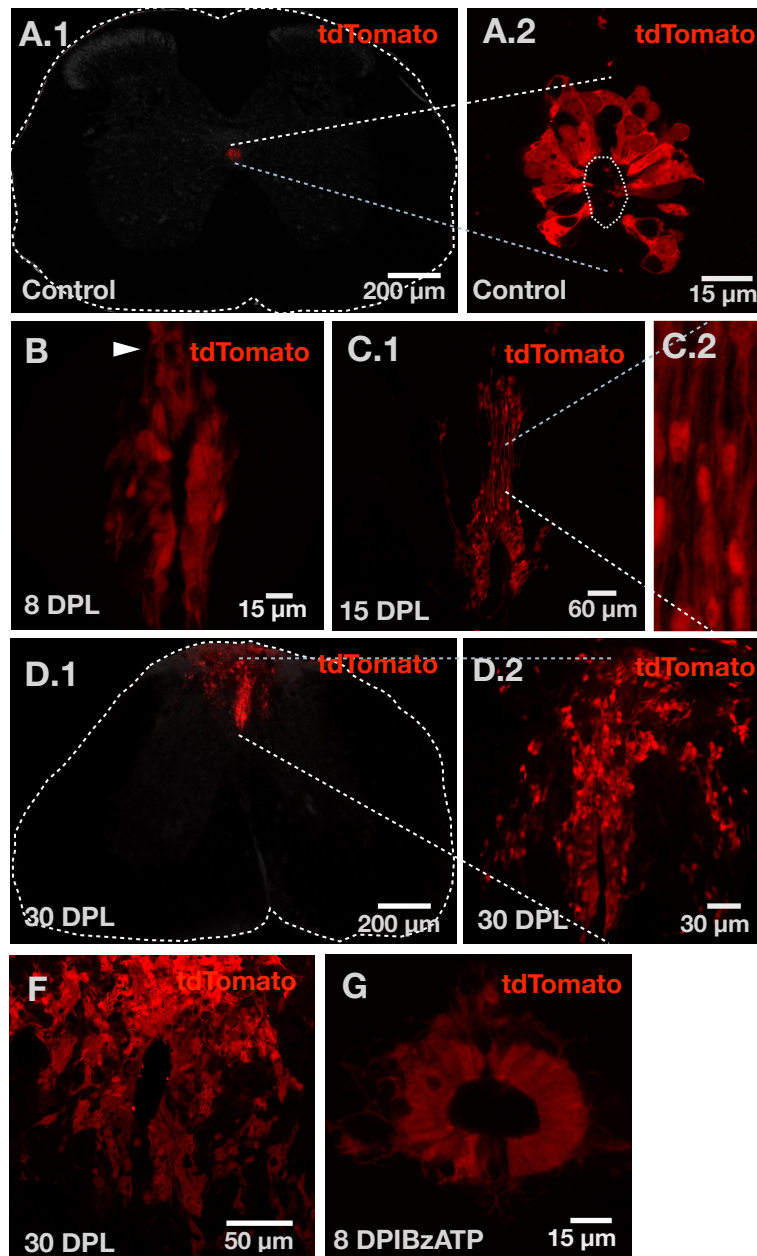
## **Análisis de datos**

Para estudiar la proliferación en las médulas a las que se les inyectó BzATP o vehículo se localizaron los segmentos de médula correspondiente al halo de fluoresceína (aproximadamente de 1 mm). Se procesaron dentro de esos segmento 6 cortes de 70  $\mu\text{m}$ . De cada corte se sacaron fotos en el microscopio confocal de 20 secciones ópticas separados cada 1 $\mu\text{m}$ . Los resultados se expresaron en número de núcleos por sección óptica. Cada grupo experimental está constituido por cuatro animales. En los animales lesionados se procesaron 2 mm de tejido alrededor del epicentro de la lesión (8 cortes de 70  $\mu\text{m}$ ). Las cuantificaciones se realizaron y expresaron de la misma manera que en el caso de las inyecciones. Cada grupo experimental estuvo constituido por tres animales. La expresión de GFAP en el canal central se cuantificó midiendo el área ocupada por la proteína reportera GFP utilizando Fiji (Image J, NIH). El análisis estadístico utilizado en los experimentos cuantitativos con dos grupos fue el nested T test. Para hacer los análisis estadísticos este test tiene en cuenta las replicas de animales y las replicas experimentales de cada grupo experimental. El análisis estadístico utilizado en experimentos con más de dos grupos fue el Nested one way ANOVA, con comparaciones multiples de Turkey. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en Prism GraphPad.

# RESULTADOS

Luego de una lesión traumática de la médula espinal, el epéndimo contribuye con nuevas células que integran la cicatriz glial (Mother y Tator, 2005; Meletis et al., 2008). Para caracterizar la respuesta del canal central frente a la lesión utilizamos ratones FoxJ1CreER-tdTomato, los cuales permiten marcar selectivamente las células endimarias y su eventual progenie mediante la expresión de la proteína reportera tdTomato. En los animales control observamos una robusta expresión de tdTomato exclusivamente en células que tapizan el canal central (Fig. 14 A.1 y 2). El porcentaje de recombinación de las células endimarias es de alrededor del 60% (Meletis et al., 2008), con un conjunto de células del polo ventral y algunas células del polo dorsal tdTomato negativas (Fig. 14 A.1). Ocho días post-lesión (DPL) ya se observa un canal modificado, con células que se desprenden del epitelio endimario (punta de flecha, Fig 14 B). A los 15 DPL (Fig. 14 C.1) se observa una mayor cantidad de células desprendiéndose del canal en su migración hacia el sitio de lesión. Las células endimarias atraviesan un cambio morfológico, pasando de ser células con un fenotipo de célula epitelial o glia radial a tener una morfología fusiforme correspondiente a una célula con capacidad migratoria (Fig. 14 C.2). A los 30 DPL se observa también un canal modificado (Fig. 14 D.1 - F). A este tiempo post-lesión se observan células probablemente ya integradas a la cicatriz glial. La hipótesis que nos planteamos en este trabajo es que los cambios en las células endimarias desencadenados por la lesión son mimetizados por la activación de receptores P2X7. Con el fin de analizar si la activación de los receptores P2X7 puede activar la migración de células derivadas del epéndimo, realizamos inyecciones del agonista selectivo BzATP cerca del canal central. Ocho días post-inyección (DPI) de BzATP intramedular (Fig. 14 G) no se observa un canal modificado desde el punto de vista estructural, y si bien se ven procesos saliendo del canal hacia el parénquima, no se visualizan cuerpos celulares desprendiéndose del epitelio endimario, por lo que concluimos que la inyección de BzATP no produce migración de células tdTomato como ocurre luego de una lesión.

Sox2 es un factor de transcripción esencial para mantener la auto-renovación o pluri-potencialidad de las células madre embrionarias indiferenciadas y juega un

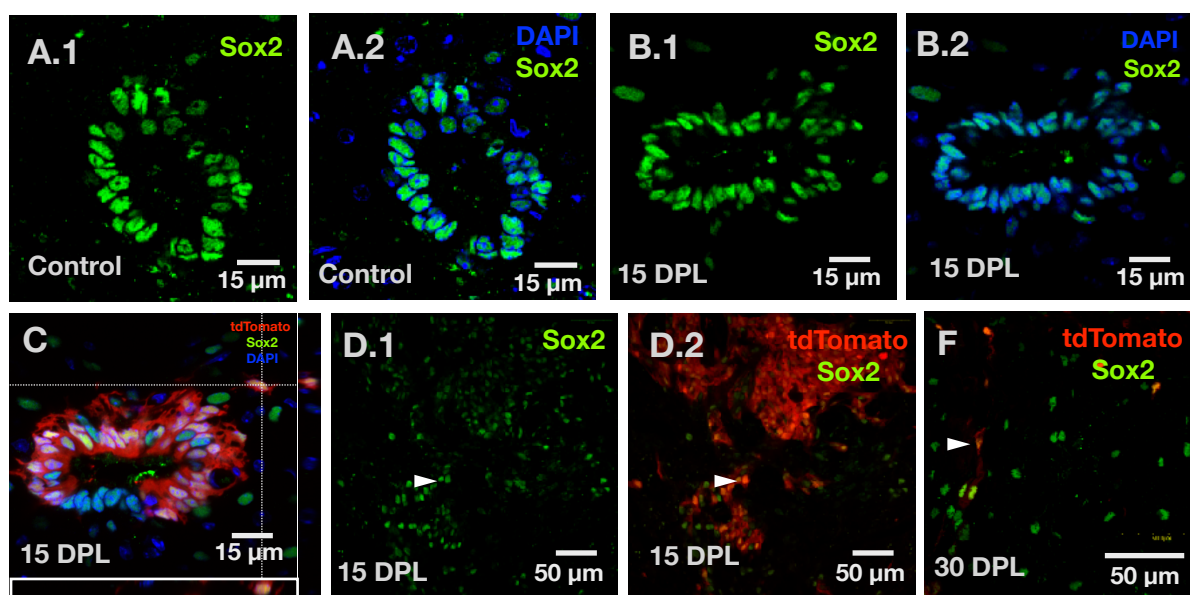


**Figura 14. El epéndimo contribuye con nuevas células a la cicatriz glial.**

**A.1 - A.2:** Imágenes obtenidas de cortes transversales de una médula espinal control. Nótese en A.1 que la expresión de tdTomato luego de la recombinación realizada por la inyección de tamoxifeno se produce en forma selectiva en los endimocitos. En A.2 se muestra una imagen a mayor aumento en la que se aprecia una abundante población de células tdTomato+ delimitando la regiones dorsal y laterales del canal. Nótese la brecha sin teñir en la parte ventral del canal central. La luz del canal se marca con una línea punteada. **B - C.2:** Imágenes obtenidas de un corte transversal de una médula espinal lesionada (tejido procesado 8 y 15 DPL respectivamente). Se visualizan una población de células tdTomato+ más allá del epéndimo, originadas a partir de células endimarias. En C.2 se muestra una imagen a mayor aumento en la que se observa la morfología bipolar de las células migratorias originadas de las células endimarias. **D.1 - F:** Imágenes obtenidas de un corte transversal de una médula espinal lesionada (tejido procesado 30 DPL). En D.2 y F se observan células rojo tomate positivas que pierden todo contacto con el canal central. **G:** Imágenes obtenidas de un corte transversal de una médula espinal inyectada con BzATP (tejido procesado 8 DPI).

papel central en el mantenimiento de las células embrionarias neurales (Komativa et al., 2004). La depleción del Sox2 compromete el estado de pluripotencialidad de las células madre embrionarias (Zhang y Cui. 2014). En este sentido, las células endimarias normalmente expresan Sox2 (Fig. 15 A.1 y 2), lo cual refuerza la idea de que estas células tienen propiedades de células progenitoras. Este perfil de

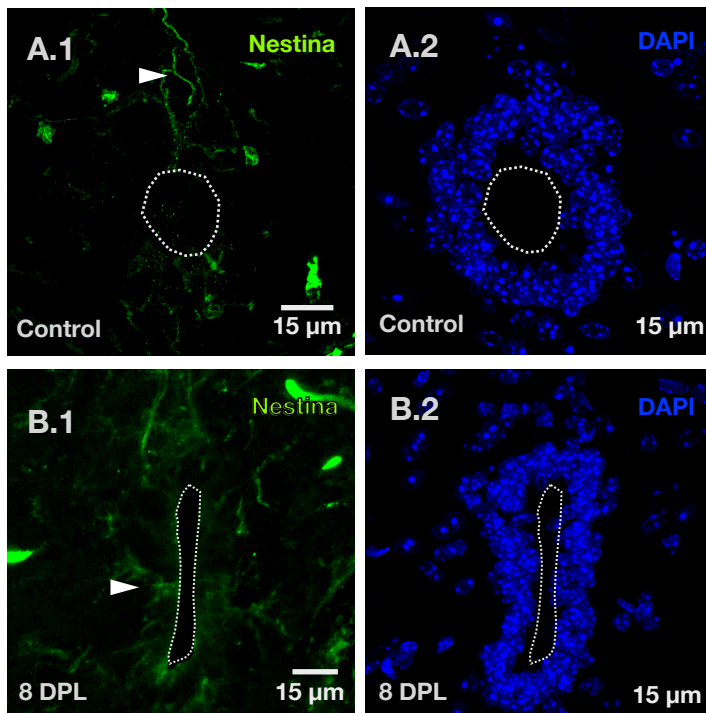
expresión se mantiene en el canal central reactivo (Fig. 15 B.1 y 2). En la figura 15 C observamos una célula tdTomato positiva, que ya no tiene contacto con el epéndimo y continúa expresando Sox2 (se observa co-localización de tdTomato y Sox2). Un buen número de células derivadas del epéndimo en la cicatriz 15 DPL siguen expresando el factor de transcripción Sox2, lo cual sugiere que mantienen algunas características de progenitores neurales (Fig. 15 D.1 y 2). A los 30 DPL se observan algunas células derivadas del epéndimo en la cicatriz glial. Una gran mayoría son positivas para éste factor de transcripción (Fig. 15 F).



**Figura 15: Las células ependimarias y su progenie expresan el factor de transcripción Sox2.**

**A.1 - A.2:** Expresión de Sox2 en el epéndimo de una médula espinal control. En A.1 (tinción con Sox2) se observa que la totalidad de los núcleos de las células ependimarias son positivos para Sox2. En A.2 núcleos de las células ependimarias teñidos con DAPI junto con la señal de Sox2. **B.1 - B.2:** Expresión de Sox2 en el epéndimo de una médula espinal lesionada (tejido procesado 15 DPL). En C se observa a los 15 DPL una célula que perdió el contacto con el canal central y continúa expresando Sox2. **D.1 - D.2:** Corte correspondientes a la zona de la cicatriz. D.2: nótese que un gran número de las células tdTomato+ expresan Sox2 (D.1). **F:** Expresión de Sox2 en células tdTomato+ en la cicatriz glial. Las células migradas permanecen siendo Sox2 positivas a los 30 DPL.

La reactivación del canal central inducido por la lesión es acompañado por cambios en el fenotipo molecular de las células ependimarias (Meletis et al., 2008). Es posible que la activación de los receptores P2X7 mimetice alguno de los cambios en el fenotipo molecular inducidos por la hemisección dorsal de la médula espinal. Para caracterizar el fenotipo molecular de las células ependimarias en el canal central de la médula espinal control, lesionada e inyectada con BzATP realizamos inmunohistoquímica para varias proteínas celulares expresadas en distintos tipos de progenitores (Pinto y Götz, 2007). La nestina es un filamento intermedio que se



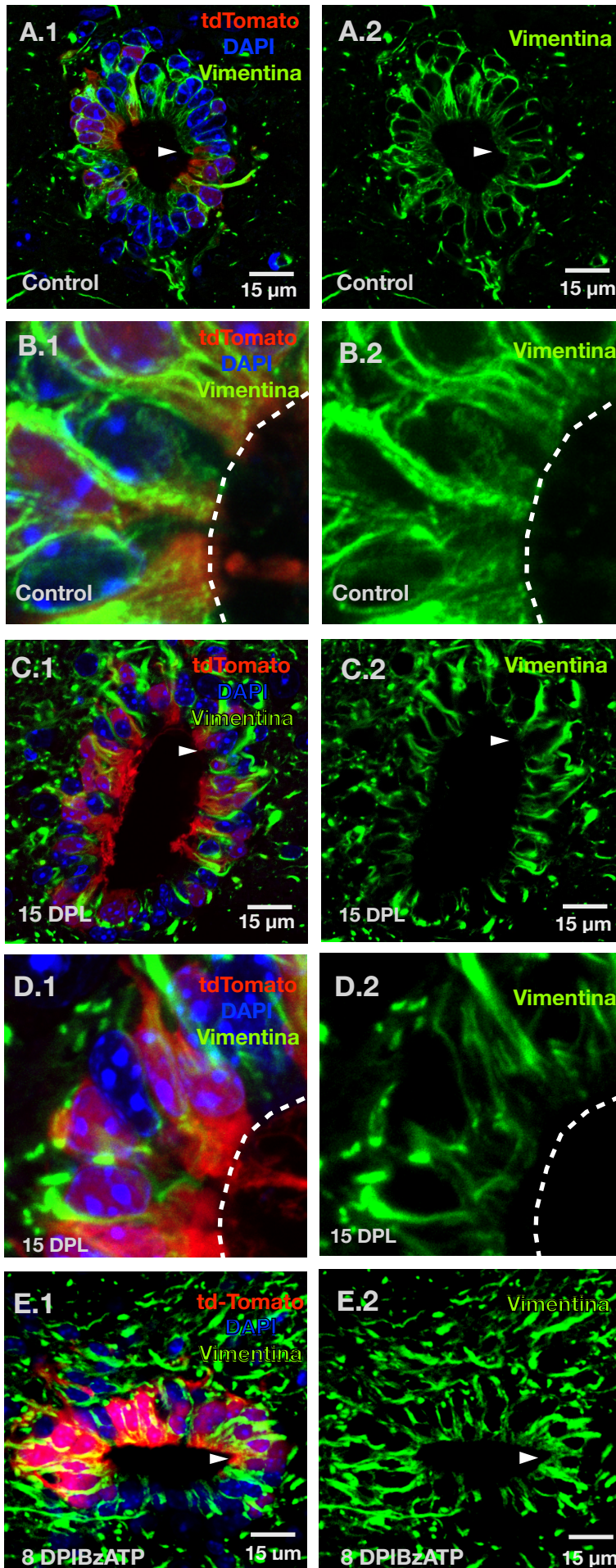
**Figura 16:** La nestina se expresa en el polo dorsal del epéndimo.

**A.1 - A.2:** Imágenes obtenidas de una médula espinal control. Nótese en A.1 que se observa expresión de nestina (verde) únicamente en el polo dorsal del canal central (punta de flecha). En A.2 núcleos de las células ependimarias teñidos con DAPI. **B. 1 - B.2:** Imágenes obtenidas de una médula espinal lesionada (tejido fijado 8 DPL). En B.1 se constata fibras nestina positivas sobre el polo dorsal del canal. Se ve además expresión de nestina en los dominios laterales del canal (punta de flecha). En B.2 núcleos de las células ependimarias teñidos con DAPI.

utiliza como marcador de células progenitoras (Lendahl et al., 1990). La expresión de esta proteína se regula negativamente cuando los progenitores neurales se diferencian a neuronas o a células gliales (Frederiksen y McKay, 1988). Esta proteína también se expresa en las células progenitoras del sistema nervioso central adulto (Morshead et al. 1994). En la médula espinal de ratones adultos normales observamos que la nestina se expresa en unas pocas células del polo dorsal (Fig. 16 A.1, cabeza de flecha), las cuales poseen procesos distales nestina positivos que se

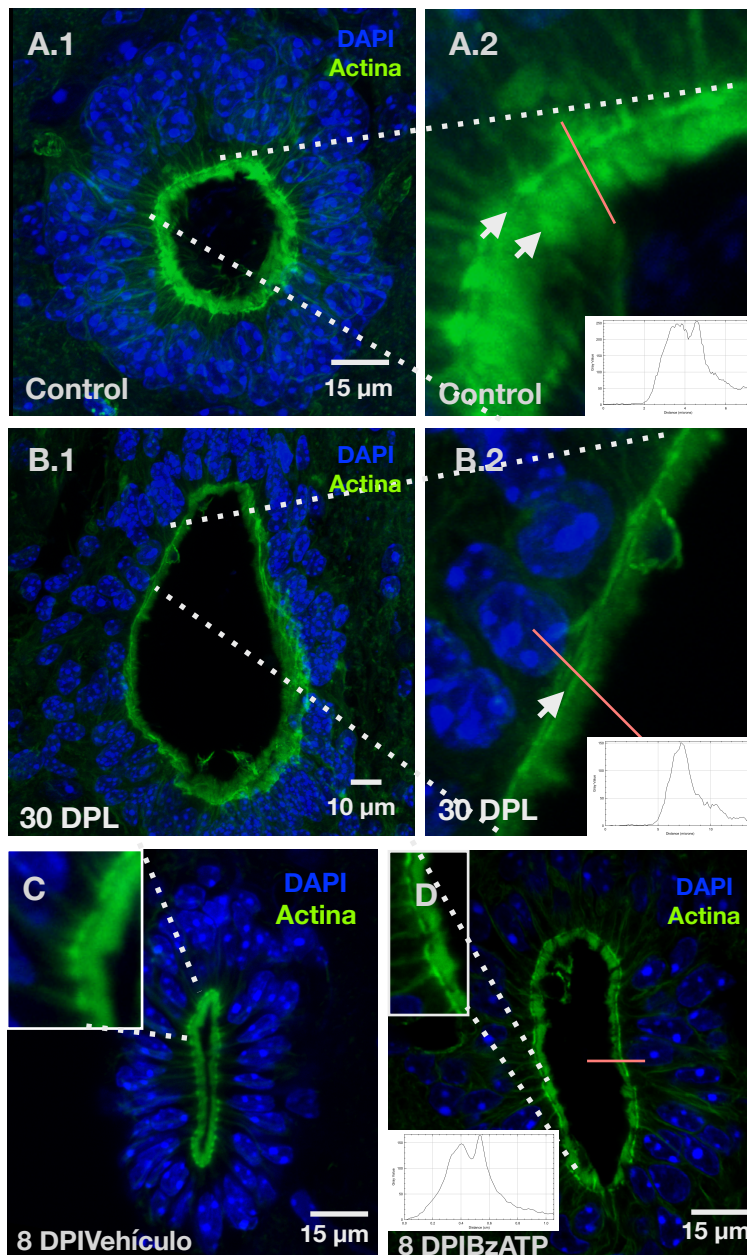
proyectan en la línea media hacia la piamadre y en menor medida en un grupo de células del polo ventral, lo que está de acuerdo con el trabajo de Alvarez-Buylla et al., 2012. Luego de una lesión, aparece cierta expresión de nestina en los dominios laterales a los ocho DPL (Fig. 16 B.1). La activación de los receptores P2X7 por inyección de BzATP no genera cambios robustos en la expresión de nestina (datos no ilustrados).

La vimentina es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto y se expresa típicamente en una subpoblación de células progenitoras (Pinto y Götz, 2007). En el canal central, la vimentina se expresa ampliamente en los distintos dominios. Si bien no se observa una diferencia sustancial en la intensidad de la expresión de la vimentina en condiciones fisiológicas y patológicas, se produce un cambio en la distribución de la misma ya que en las lesiones no



**Figura 17:** La vimentina se expresa en todos los dominios del epéndimo.

**A.1 - A.2:** Imágenes obtenidas de una médula espinal control. Nótese que un gran número de células que limitan el canal central son vimentina positivas (verde). La expresión de vimentina es robusta tanto en el compartimiento basal, como apical de las células endimarias. **B.1 - B.2:** A mayor aumento se observa que los filamentos intermedios de vimentina llegan hasta la línea punteada que señala el dominio apical de las células endimarias. **C.1 - C.2:** En la médula espinal lesionada (15 DPL) la expresión de vimentina se mantiene en la mayoría de las células pero cambia su perfil espacial, retirándose del dominio apical de las células endimarias. **D.1 - D.2:** A mayor aumento se observa que los filamentos intermedios no llegan hasta la línea punteada que señala el dominio apical de las células endimarias. **E.1 - E.2:** El BzATP no afecta el perfil de expresión de vimentina en el epéndimo.



**Figura 18: Actina en el epéndimo.**

**A.1 - A.2:** La actina se expresa en el epéndimo de la médula espinal control, concentrándose en el compartimiento apical de las células endimarias (verde). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). Un análisis más exhaustivo utilizando super-resolución (A.2) muestra que existen dos bandas de actina (marcadas con las flechas) en la parte apical de las células endimarias pertenecientes a la zonula adherens (interna) y microvellosidades (externa). El gráfico de intensidad en función de la distancia (inserto) muestra dos picos.

**B.1 - B.2:** Expresión de actina en el epéndimo de la médula espinal 30 DPL. Se observa sólo una de las bandas de actina (flecha). Nótese que el gráfico de intensidad versus distancia muestra un solo pico. **C:** Expresión de actina 8 días luego de la inyección intraespinal de vehículo. **D:** Expresión de actina 8 días luego de la inyección intraespinal de BzATP. El perfil de expresión de actina no se modifica luego de la inyección.

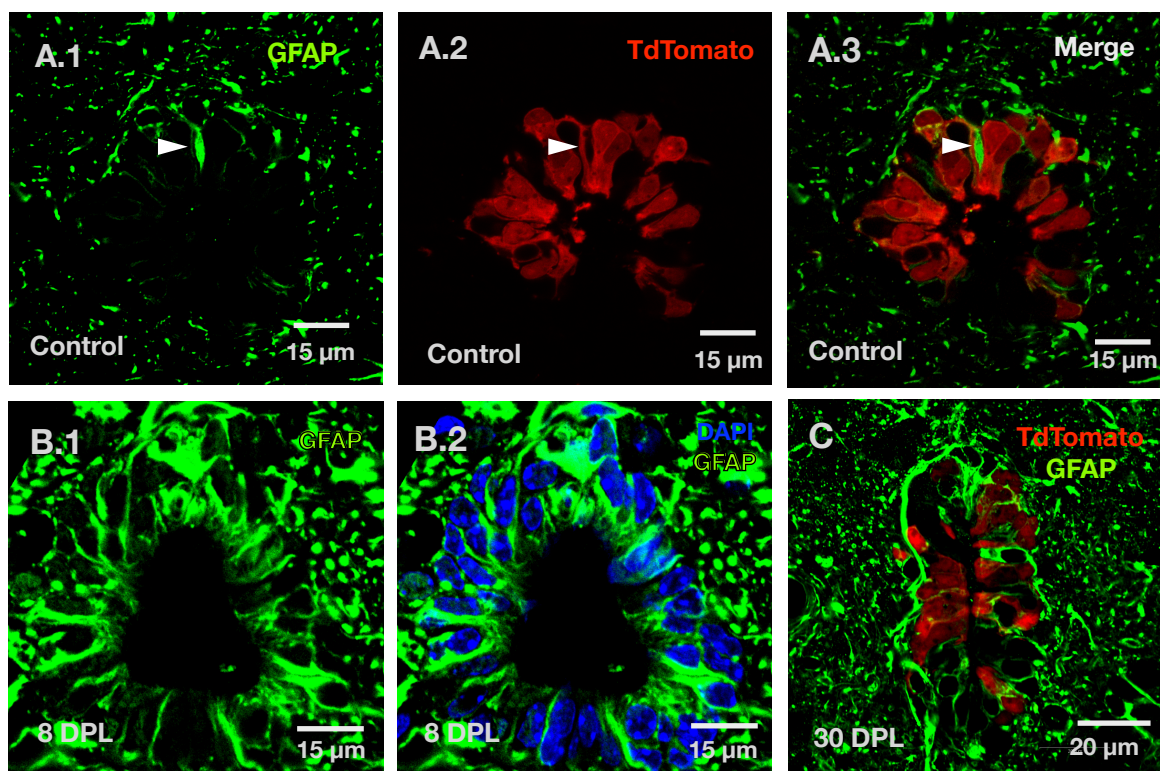
parece expresarse en el dominio apical de las células endimarias (Fig. 17 C.1 y 2, D.1 y 2 puntas de flechas) como ocurre tanto en los animales animales control (Fig. 17 A.1 y 2, B.1 y 2 puntas de flecha). En formar similar a la nestina, la inyección

intramedular de BzATP no parece generar cambios notorios en la distribución de la vimentina (Fig. 17 D.1 y 2, puntas de flecha). Otro de los cambios que se logra visualizar observando esta proteína del citoesqueleto es que tanto en la lesión como en la inyección intramedular de BzATP hay un aumento de los procesos vimentina positivos en el parénquima con respecto a los que se visualizan en el control.

La actina es una proteína que forma los microfilamentos del citoesqueleto y juega un rol importante en la migración celular (Blanchoin et al., 2014). Por este motivo estudiamos los posibles cambios estructurales de esta proteína en el canal central luego de una lesión. En secciones de médula de animales control se visualizan dos bandas de actina paralelas a la luz del canal en la zona apical (Fig. 18 A.1 y 2, flechas). El gráfico de la figura 18 A.2 muestra los valores de intensidad de la actina en función de la distancia a lo largo del trazo de la recta rosada mostrada en la imagen, presentando dos picos de intensidad correspondientes a las dos bandas de actina. Inferimos que la primera banda corresponde a la actina vinculada a la zonula adherens, lugar en donde se anclan los microfilamentos, en tanto la segunda banda corresponde a las microvellosidades. En las secciones de médula de animales con lesión (30 DPL) la expresión de actina a nivel apical es menos robusta (Fig. 18 B.1) y se constituye en una sola banda (Fig. 18 B.2, flecha). El gráfico de intensidad en función de la distancia en la figura 18 B.2 presenta un solo pico. Estos cambios inducidos por la lesión en la expresión de actina en las células ependimarias podrían ser debidos a la fusión de las microvellosidades a la membrana apical o a la pérdida de las mismas. A pesar de los cambios claros en el citoesqueleto de actina inducidos por la lesión, la activación de receptores P2X7 por la inyección local de BzATP no indujo cambios con respecto a la inyección de vehículo. El gráfico de intensidad en función de la distancia presenta dos picos (Fig. 18 D) de manera análoga a la situación control.

Otro marcador ampliamente utilizado en nichos de células madre es la proteína glial fibrilar ácida (GFAP). La GFAP es un componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto (Hol y Pekny 2015). La expresión de esta proteína se utiliza como marcador de estirpe astrocitaria y de un subtipo de progenitores del cerebro adulto (Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009). El perfil de expresión de GFAP en el canal central control y el de médula lesionada resultó distinto (Fig. 19). En condiciones

normales y animales control sólo unas pocas células endimarias en el polo dorsal del canal central expresan GFAP (Fig. 19 A.1 - A.3). Cabe destacar que generalmente las células del polo dorsal que expresan GFAP son tdTomato negativas (observado secciones de cuatro animales control). Luego de una lesión se produce un aumento en la expresión de GFAP, tanto en el polo dorsal, como en los dominios laterales y en el polo ventral del epéndimo (Fig. 19 B.1 y 2). El aumento de la expresión de GFAP se extiende más allá del sitio directamente afectado con la lesión (la figura 19 C muestra la expresión de GFAP a 600  $\mu\text{m}$  de distancia del epicentro de la lesión).

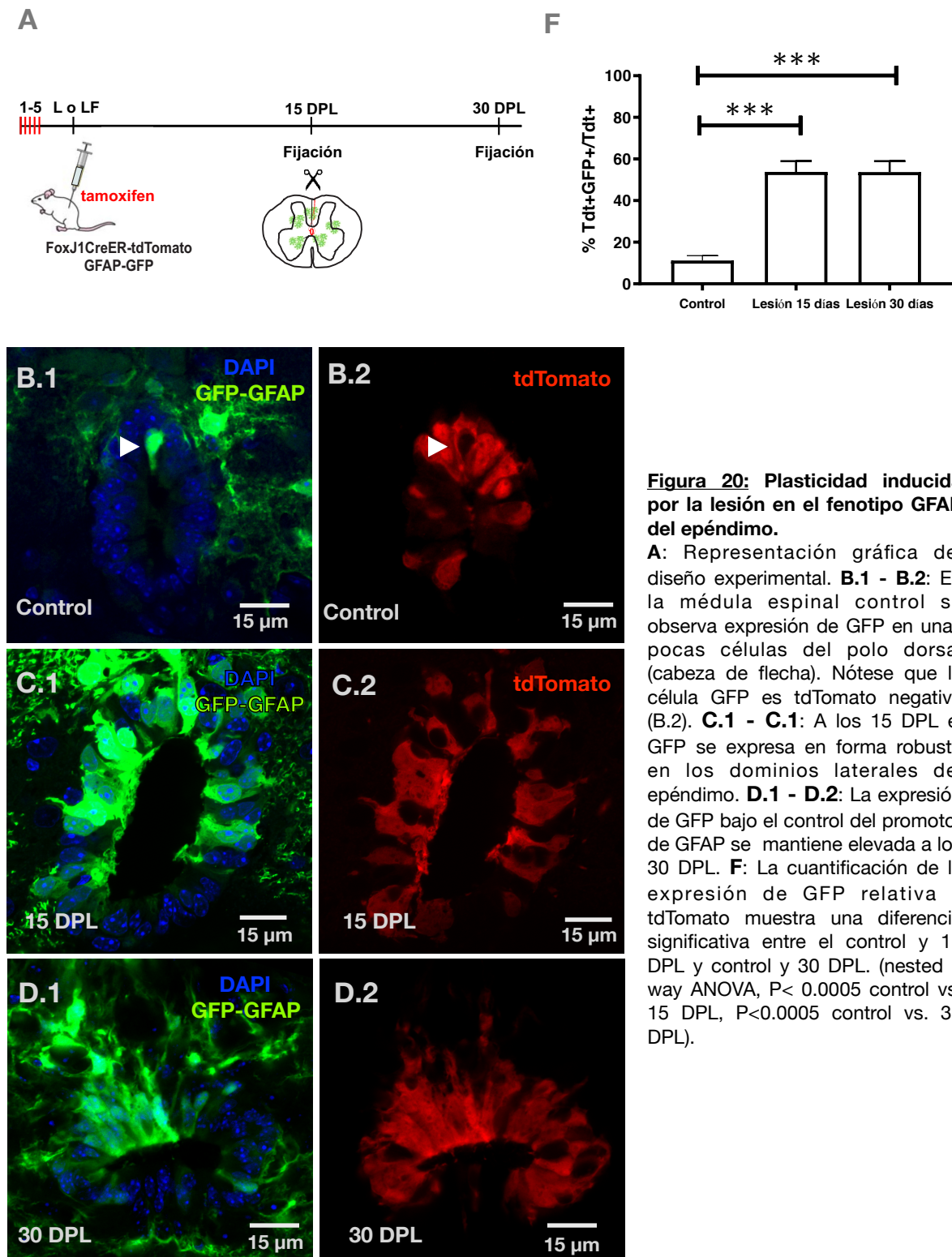


**Figura 19:** La expresión de GFAP de las células endimarias aumenta luego de la lesión.

**A.1 - A.3:** Inmunofluorescencia para el GFAP en la médula espinal control. Se observa en el polo dorsal una única prolongación celular GFAP positiva intensamente teñida (punta de flecha). Esta célula corresponde a una célula tdTomato negativa (punta de flecha en A.2 y 3). **B.1 - B.2:** La expresión de GFAP aumenta luego de la lesión (8 DPL) apareciendo en los distintos dominios del canal central. **C:** Expresión de GFAP en la médula espinal lesionada a 600 micrómetros del epicentro de la lesión (30 DPL).

Para evaluar el cambio de fenotipo GFAP en el canal central utilizamos una segunda estrategia que consistió en la cruce de los ratones FoxJ1CreER-tdTomato (que permiten visualizar selectivamente las células endimarias) con ratones GFAP-GFP (que permiten visualizar las células en las que el promotor GFAP está activo). Con la utilización de este modelo transgénico FoxJ1CreER-tdTomato/GFAP-GFP observamos los mismos resultados que los obtenidos con la inmunofluorescencia

para GFAP (Fig. 20). En efecto, en condiciones control la expresión de GFP se restringe a una subpoblación de células en el polo dorsal con morfología de glia radial (Fig. 20 B.1) que es tdTomato negativas (Fig. 20 B.2). La expresión de la proteína reportera GFP se hace robusta luego de la lesión apareciendo en los dominios laterales del canal central a los 15 DPL (Fig. 20 C.1 y 2) y manteniéndose al menos hasta los 30 DPL (Fig. 20 D.1 y 2). La cuantificación del porcentaje de

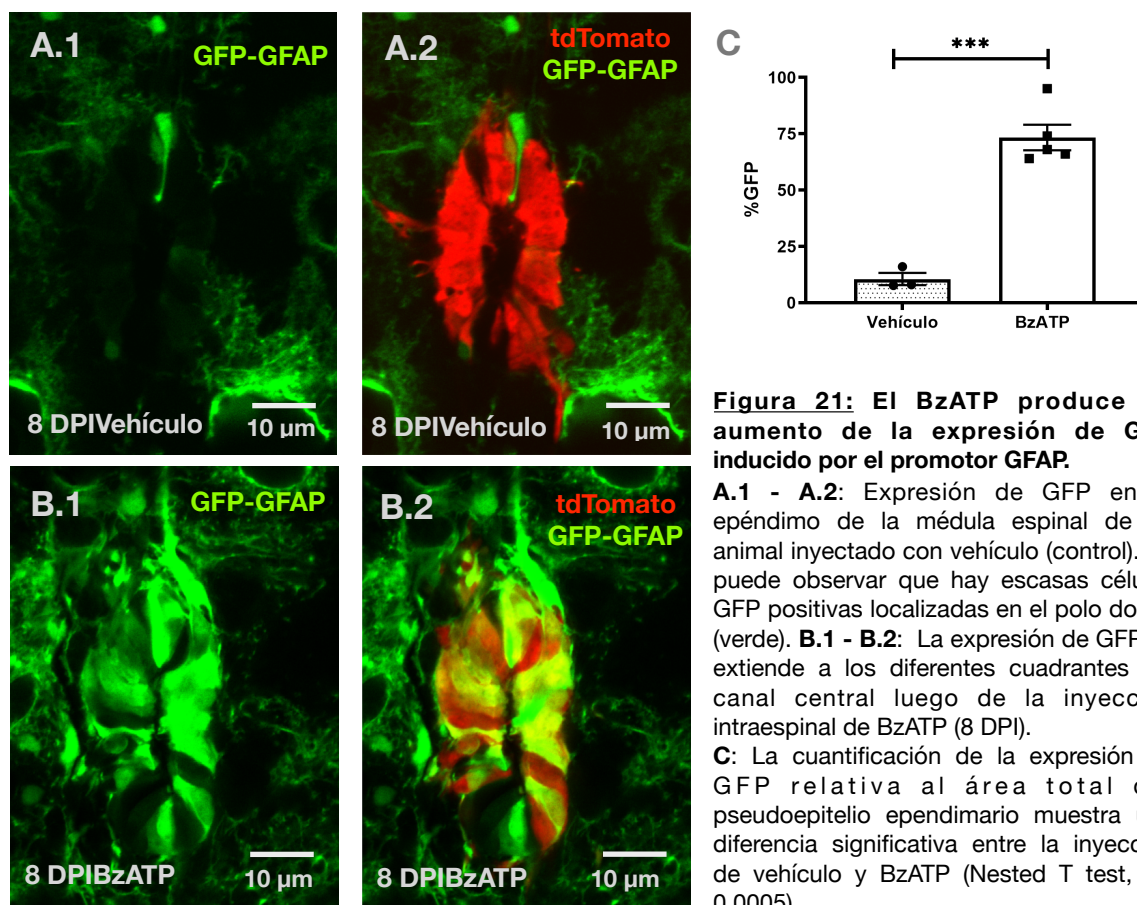


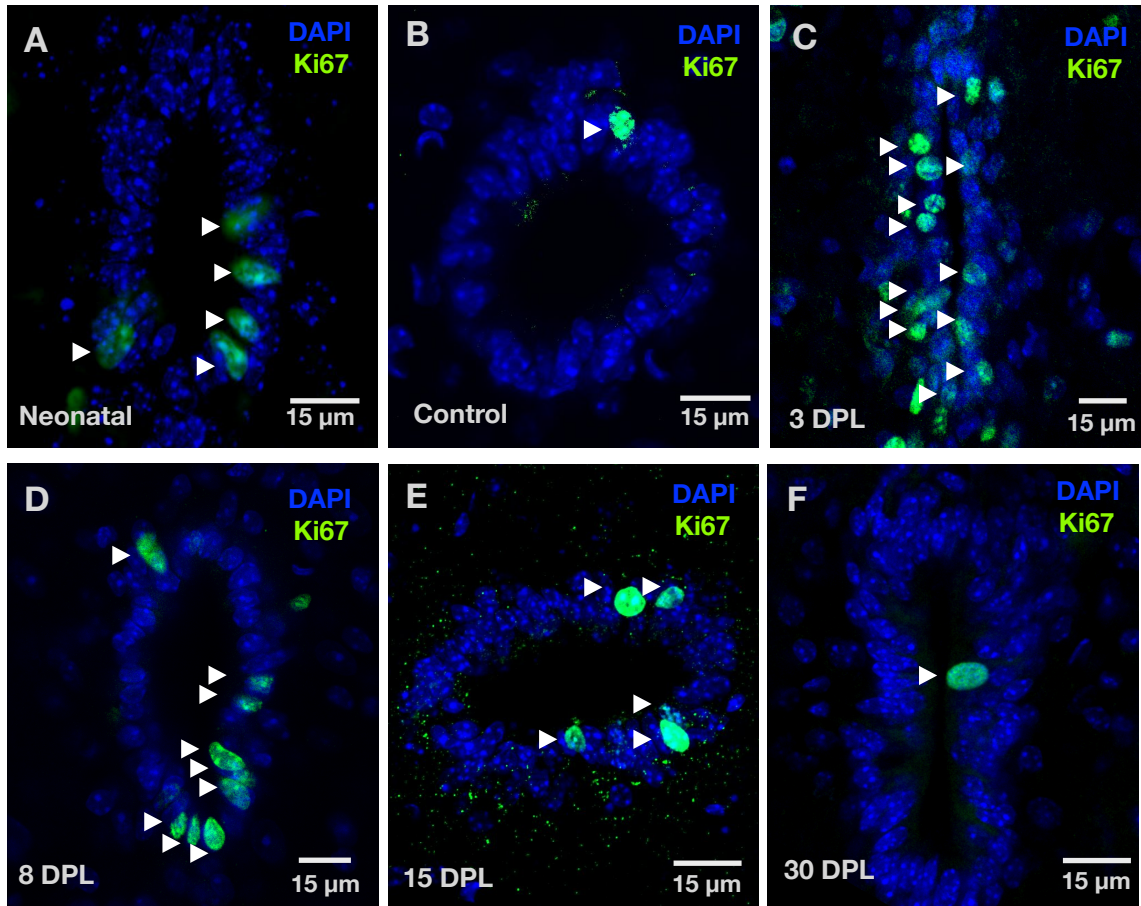
**Figura 20: Plasticidad inducida por la lesión en el fenotipo GFAP del epéndimo.**

**A:** Representación gráfica del diseño experimental. **B.1 - B.2:** En la médula espinal control se observa expresión de GFP en unas pocas células del polo dorsal (cabeza de flecha). Nótese que la célula GFP es tdTomato negativa (B.2). **C.1 - C.2:** A los 15 DPL el GFP se expresa en forma robusta en los dominios laterales del epéndimo. **D.1 - D.2:** La expresión de GFP bajo el control del promotor de GFAP se mantiene elevada a los 30 DPL. **F:** La cuantificación de la expresión de GFP relativa a tdTomato muestra una diferencia significativa entre el control y 15 DPL y control y 30 DPL. (nested 1 way ANOVA,  $P < 0.0005$  control vs. 15 DPL,  $P < 0.0005$  control vs. 30 DPL).

área de canal que expresa GFP (proteína reportera de la expresión de GFAP) en relación a la expresión de tdTomato (Fig. 20 F) reveló que la diferencia de expresión a los 15 y 30 DPL es significativamente mayor a aquella observada en el control (Nested one way ANOVA,  $P < 0.00005$  control vs. 15 DPL,  $P < 0.0005$  control vs. 30 DPL).

A continuación nos preguntamos si el cambio de las células endimarias a un fenotipo GFAP inducido por la lesión puede ser replicado por la activación de receptores P2X7. Utilizando ratones FoxJ1CreER-tdtomato/GFAP-GFP encontramos que la inyección local de BzATP indujo un cambio hacia un fenotipo GFAP (Fig. 21 A.1 - B.2) esencialmente similar al inducido por la lesión (ver Fig. 20). El análisis cuantitativo comparando el porcentaje de área del canal ocupada por GFP en inyecciones de vehículo y BzATP mostró una diferencia estadísticamente significativa (Nested T test,  $P < 0.0005$ . Fig. 21 C).

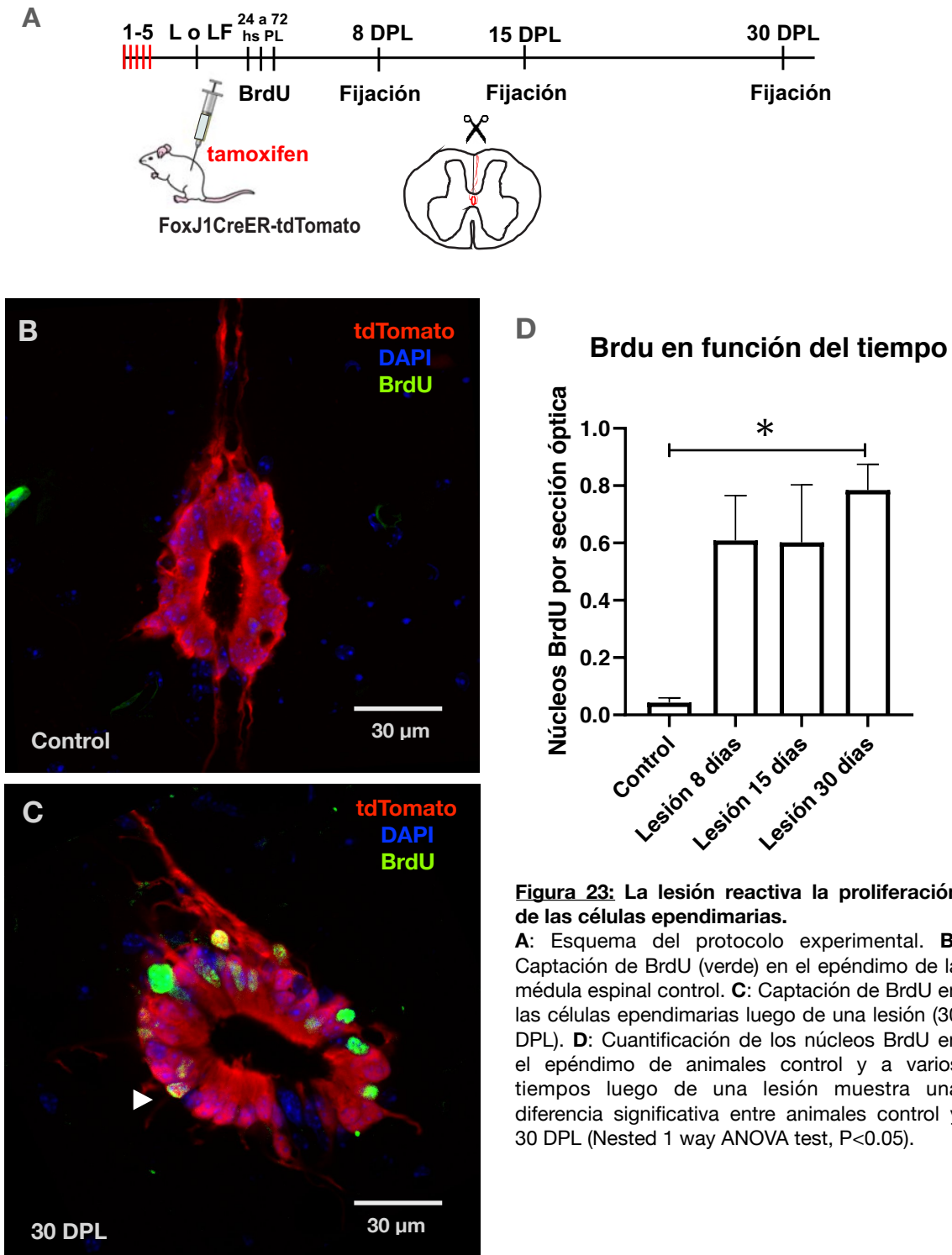




**Figura 22: Potencial para la proliferación estimado por la expresión de Ki67.**

**A:** Ki67 en la médula espinal de un animal neonatal. Nótese la presencia de varios núcleos Ki67 positivos (cabezas de flecha). **B:** Ki67 en la médula espinal control de un ratón adulto. Nótese la presencia de un solo núcleo Ki67 positivo (verde). **C - F:** El número de núcleos Ki67+ aumenta en forma dramática a los 3 DPL (C). Este aumento se reduce a los 8 DPL (D) y 15 DPL (E) para asemejarse al control a los 30 DPL (F). **G:** La cuantificación de los núcleos Ki67 muestra una diferencia significativa entre animales control y 3 DPL (Nested 1 way ANOVA,  $P < 0.005$ ), entre 3 DPL y 15 DPL (nested 1 way ANOVA,  $P < 0.05$ ) y entre 3 DPL y 30 DPL (nested 1 way ANOVA,  $P < 0.05$ ).

Uno de los eventos clave luego de la lesión de la médula espinal es la reactivación de la proliferación celular de los progenitores “dormidos” en el canal central (Mothe y Tator, 2005). Como paso previo al análisis de la participación de los receptores P2X7 en la respuesta proliferativa del canal central, caracterizamos en nuestro modelo la respuesta proliferativa inducida por la lesión utilizando dos estrategias: la inmunohistoquímica para la ciclina Ki67 (Fig. 22) y un ensayo de proliferación

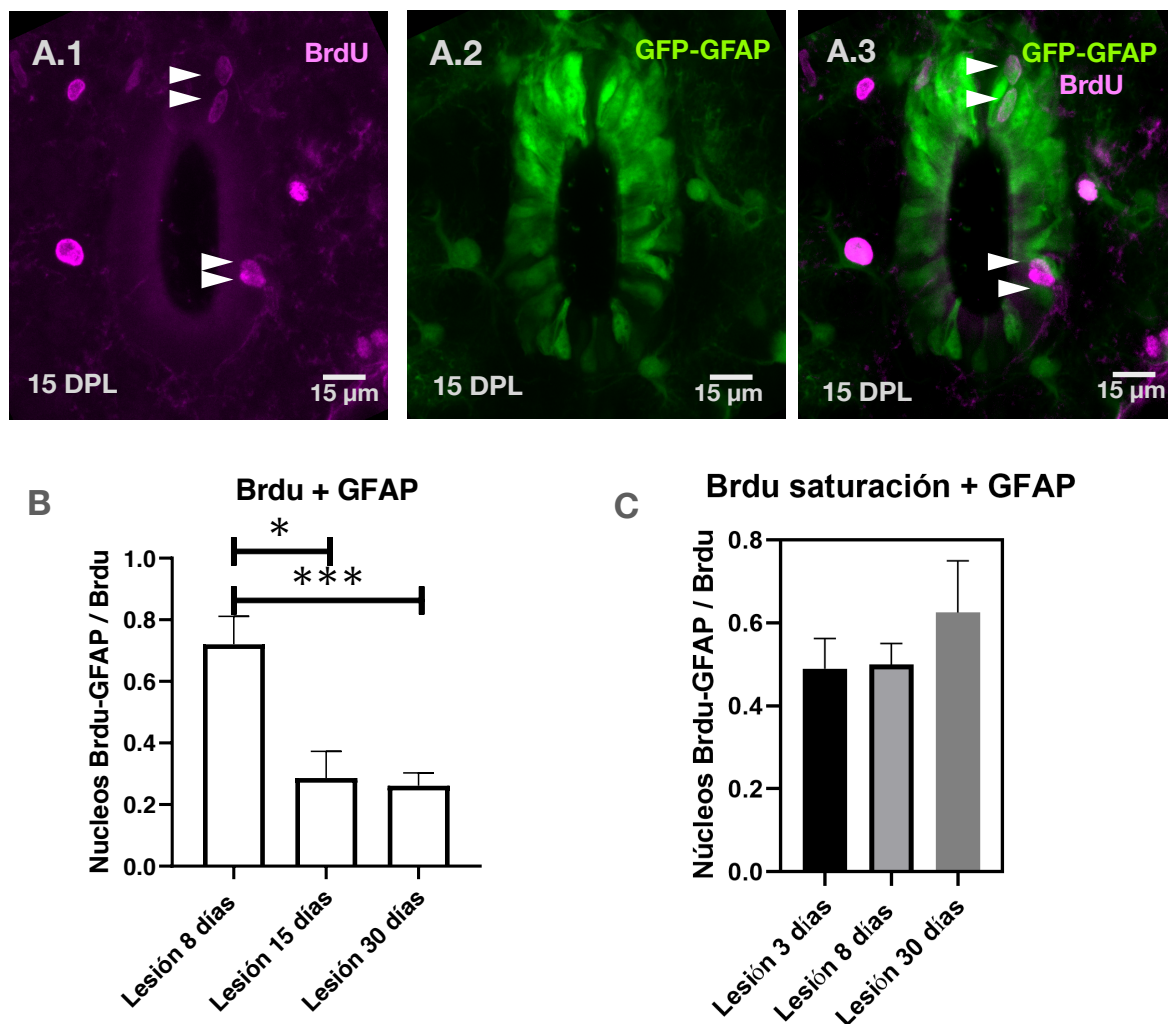


**Figura 23: La lesión reactiva la proliferación de las células endimarias.**

**A:** Esquema del protocolo experimental. **B:** Captación de BrdU (verde) en el epéndimo de la médula espinal control. **C:** Captación de BrdU en las células endimarias luego de una lesión (30 DPL). **D:** Cuantificación de los núcleos BrdU en el epéndimo de animales control y a varios tiempos luego de una lesión muestra una diferencia significativa entre animales control y 30 DPL (Nested 1 way ANOVA test,  $P < 0.05$ ).

utilizando el marcado con BrdU (Fig. 23). La inmunohistoquímica para la Ki67 muestra que si bien en el canal central inmaduro de animales neonatales existen células que expresan esta ciclina (Fig. 22 A), en los animales adultos hay núcleos positivos para el Ki67 sólo en forma ocasional (Fig. 22 B). Sin embargo, el número

de núcleos Ki67 en el canal central de la médula espinal lesionada de ratones adultos aumenta en forma dramática luego de la lesión, con un pico a los 3 DPL (Fig. 22 C) y atenuándose gradualmente hasta ser comparable con el control a los 30 DPL. La cuantificación de los núcleos Ki67 muestra una diferencia significativa entre animales control y 3 DPL (Nested 1 way ANOVA,  $P < 0.005$ ), entre 3 DPL y 15 DPL (nested 1 way ANOVA,  $P < 0.05$ ) y entre 3 DPL y 30 DPL (nested 1 way ANOVA,



**Figura 24: Proliferación y fenotipo GFAP.**

**A.1 - A.3:** Imágenes obtenidas de una médula espinal lesionada (tejido procesado 15 DPL). Se observa un ejemplo de las imágenes procesadas para construir las gráficas B y C. En A.1 se ven las células BrdU positivas, en A.2 las GFAP positivas. En A.3 se combinan A.1 y A.2. **B:** Gráfico que muestra la cuantificación de las células BrdU+GFAP+ relativas a la totalidad de las células BrdU+ en el epicentro de la lesión. El protocolo de suministro de BrdU utilizado fue el protocolo estándar de proliferación (a las 24, 48 y 72 horas post-lesión). Ver protocolo experimental F en materiales y métodos. Hay una diferencia estadísticamente significativa entre la proporción de células a los 8 DPL con respecto a los 15 y 30 DPL (Nested 1 way ANOVA,  $P < 0.05$  8 DPL vs. 15 DPL,  $P < 0.0005$  8 DPL vs. 30 DPL). **C:** Gráfico que muestra la cuantificación de la proporción las células BrdU+ GFAP+ relativas a la totalidad de las células BrdU+ en el epicentro de la lesión. El protocolo de suministro de BrdU utilizado fue un protocolo de saturación durante 6 horas previas al sacrificio del animal. Ver protocolo experimental G en materiales y métodos. El test estadístico utilizado fue el nested 1 way ANOVA. Ninguna diferencia entre las medias de los distintos grupos dio estadísticamente significativa.

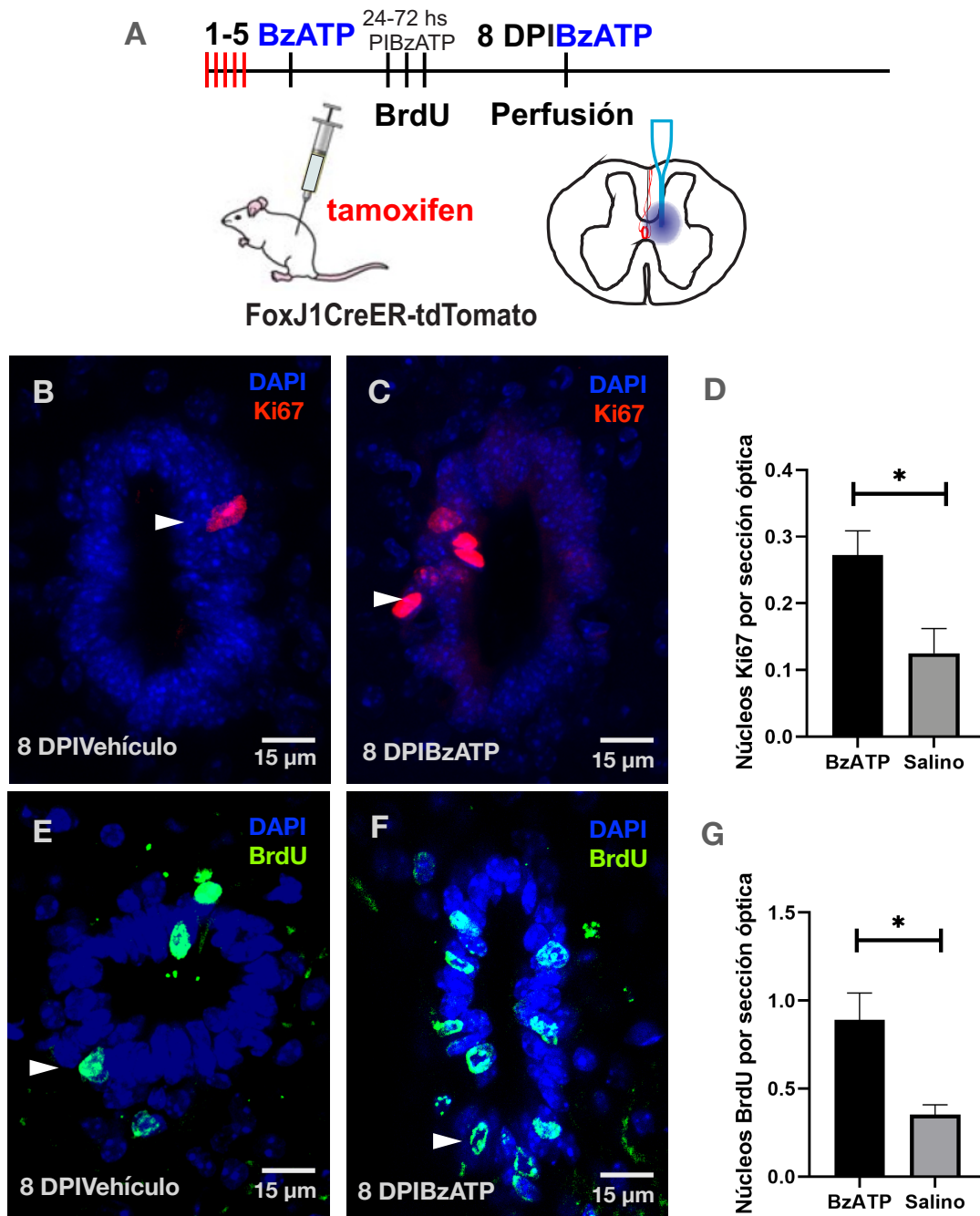
$P < 0.05$ ). Estos resultados sirvieron para definir la ventana temporal en la que se inyectó BrdU luego de la lesión (ensayo estándar de proliferación) con el fin de optimizar la detección de proliferación celular en el canal central.

En condiciones normales las células endimarias de ratones adultos controles son quiescentes, por lo que no captan BrdU con el ensayo estándar de proliferación (Fig. 23 B). Sin embargo, el mismo protocolo de administración de BrdU en animales lesionados (ventana temporal en que el número de núcleos Ki67 en el canal es máximo luego de una lesión) revela varios núcleos marcados con BrdU en el canal central (Fig. 23 C, cabeza de flecha). La cuantificación del número de núcleos BrdU+ muestra que el número de núcleos BrdU+ se mantiene elevado desde el día 8 hasta el día 30 luego de la lesión con respecto al control (Nested 1 way ANOVA test,  $P < 0.05$ ). El análisis de la proliferación de las células endimarias en el eje rostrocaudal muestra que el aumento de la actividad mitótica está espacialmente restringido a aproximadamente 1 mm alrededor del epicentro de la lesión, disminuyendo más abruptamente hacia caudal (datos no ilustrados).

Dado que el incremento de la proliferación celular inducido por la lesión se correlaciona con un cambio hacia un fenotipo GFAP en muchas células endimarias, nos preguntamos si las células que proliferan corresponden a las células GFAP+. Para eso utilizamos dos protocolos de administración de BrdU (detallados como F y G en materiales y métodos) en animales doble transgénicos FoxJ1CreER-tdTomato/GFAP-GFP. En el protocolo F detallado en materiales y métodos el BrdU se administra de la misma forma que los ensayos de proliferación mencionados anteriormente (24-72 hs post-lesión), y luego cada grupo experimental se fija a los ocho, quince o treinta DPL. Este ensayo de proliferación tiene como finalidad marcar aquellas células que se dividen en el pico de proliferación luego de la lesión. En el protocolo G detallado en materiales y métodos la administración de BrdU se hace el mismo día del sacrificio, con cuatro inyecciones separadas por dos horas y a la hora de la última se fija el tejido. Esto se realizó a los 3, 8 o 30 DPL. Este ensayo de proliferación tiene como objetivo estudiar la población de células en división en las horas previas a la perfusión. En el gráfico mostrado en la Figura 24 B, utilizando el protocolo F se muestra que la proporción de células GFAP+/BrdU+ a los 8 DPL es significativamente mayor que a los 15 y 30 DPL (Nested 1 way

ANOVA,  $P < 0.05$  8 DPL vs. 15 DPL,  $P < 0.0005$  8 DPL vs. 30 DPL). En el gráfico mostrado en la Figura 24 C, utilizando el protocolo G se muestra que proporción de células GFAP+/BrdU+ no presenta diferencias significativas entre los distintos tiempos post-lesión (Nested one way ANOVA).

Partiendo de la base que la lesión produce un aumento de la proliferación de las células endimarias, estudiamos si la inyección intramedular de BzATP también produce este efecto. Para esto, utilizamos las mismas estrategias que para dilucidar la respuesta proliferativa del canal central frente a la lesión: inmunohistoquímica para Ki67 y marcado con BrdU. El BrdU se administró también entre las 24 y 72 hs post-inyección de BzATP. Evaluando los dos protocolos se desprende como resultado que la inyección intramedular de la droga aumenta la proliferación (de manera estadísticamente significativa) de las células endimarias con respecto a la inyección de vehículo (Nested T test,  $P < 0,05$  tanto para Ki67 como para BrdU) (Fig. 25).



**Figura 25: La activación de los receptores P2X7 “despierta” a las células endimarias.**

**A:** Esquema del protocolo experimental. **B:** Núcleos Ki67+ en el epéndimo de la médula espinal inyectada con vehículo y con BzATP (**C**). El número de núcleos Ki67+ aumenta notablemente luego de la inyección intraespinal de BzATP (8 DPI). **D:** La cuantificación de los núcleos Ki67+ muestra que hay una diferencia significativa entre BzATP y el vehículo (nested T test,  $P < 0,05$ ). **E:** Captación de BrdU en endimocitos de la médula espinal inyectada con vehículo y con BzATP (**F**). El número de núcleos BrdU+ aumenta notablemente luego de la inyección intraespinal de BzATP (8 DPI). **G:** La cuantificación de los núcleos marcados con BrdU muestran una diferencia significativa entre la inyección de BzATP y el vehículo (nested T test,  $P < 0,05$ ).

# DISCUSIÓN

En las lesiones traumáticas de la médula espinal se libera una alta concentración de ATP alrededor del epicentro de la lesión (Wang et al., 2004). El objetivo central de este trabajo fue estudiar la posibilidad de que la señalización purinérgica a través de receptores P2X7 juegue un papel en la reactivación de los progenitores endógenos que se encuentran en forma latente en el epéndimo. Con este fin evaluamos los cambios producidos en estas células ante la aplicación del agonista selectivo de P2X7 BzATP, simulando la liberación de ATP que ocurre luego de una lesión. Encontramos que la activación de los receptores P2X7 modula la potencialidad proliferativa de los progenitores y algunos de sus aspectos fenotípicos en forma similar a lo que ocurre luego de una lesión.

## **Los endimocitos como células madre latentes**

Ostrowski et al. (2003) sostienen que las células que expresan el factor de transcripción FoxJ1 son únicamente aquellas que presentan cilio mótíl o flagelo (en espermatozoides). El ratón transgénico FoxJCreER-tdTomato expresa en forma condicional la proteína reportera tdTomato en aquellas células que tienen activo el promotor del factor de transcripción FoxJ1. En la médula espinal las células que expresan tdTomato son únicamente las que tapizan el canal central. Mediante la utilización de distintos marcadores en el epéndimo observamos que los endimocitos y los tanicitos, células que ocupan los dominios laterales, expresan Sox2 y vimentina, la mayoría no expresa nestina y algunas tienen una expresión mínima de GFAP. En el polo dorsal del epéndimo reside otra estirpe celular (células tipo glia radial, Meletis et al., 2008) que expresa nestina, GFAP, vimentina, Sox2 y no expresa tdTomato. Algunos autores consideran a este tipo celular como las verdaderas células madre del epéndimo por su potencial para resistir varios pasajes de neuroesferas y por expresar marcadores típicos de células progenitoras neurales de la zona subventricular como nestina y GFAP (Hamilton et al., 2009, Fiorelli et al., 2013). El hecho de que no expresen tdTomato está de acuerdo con que presentan un único cilio no motil con configuración de microtubulos 9+0 (Fiorelli et al., 2013). Es tentador especular que este sub-tipo celular corresponde a células

indiferenciadas similares a las de tipo neuroepitelial. Fiorelli et al. (2013) describen que si bien son células multipotentes, tienen una capacidad de autorenovación incluso luego de la lesión más limitada a la de las células del espacio subventricular de los ventrículos laterales. Finalmente, el polo ventral del epéndimo a su vez está constituido por otra estirpe de células con morfología similar a las glías radiales que expresan vimentina y sox2, tiene una débil expresión de nestina y no expresan tdTomato por lo que también se podría inferir que no tienen cilio motil. La mayoría de las células que tapizan el canal presentan dos cilios móviles (Alfaro-Cervello et al., 2012), mientras que las células del polo dorsal presentan un único cilio no móvil, con configuración de microtúbulos 9+0 (Fiorelli et al., 2013). Alfaro-Cervello et al. (2012) describen que algunas células que residen en el polo ventral también presentan un único cilio aunque no especifican la configuración de los microtubulos (9+0 vs 9+2).

### **Migración de células derivadas del epéndimo hacia la cicatriz glial**

Utilizando el transgénico Foxj1CreER-tdTomato confirmamos datos previos (Meletis et al., 2008) que demuestran que la hemisección dorsal de la médula espinal desencadena la migración de células derivadas del epéndimo hacia el sitio de la lesión. En nuestro modelo observamos los primeros indicios de migración de células tdTomato+ a partir de los 8 DPL. La progenie de las células endimarias en la cicatriz glial continúan expresando el factor de transcripción Sox2, dato que difiere de lo descrito en el trabajo de Meletis et al. (2008) en donde observan que las células que migran pierden la inmunoreactividad para este marcador.

Partiendo de la base que las células endimarias tienen la capacidad de migrar, y sabiendo que la actina y sus proteínas asociadas son consideradas el motor del movimiento celular (Blanchoin et al., 2014), estudiamos el perfil de expresión de la actina tanto en el control como en la lesión. Encontramos que luego de la lesión se producen cambios notorios en el dominio apical de las células endimarias, pasando de tener dos bandas paralelas a la luz de máxima intensidad de actina en el control a tener una única banda en la lesión. Las microvellosidades del dominio apical de las células epiteliales polarizadas son estructuras con un citoesqueleto de actina bien definidas (Sauvet et al., 2015) por lo que es razonable pensar que la banda más apical corresponde a la actina presente en las microvellosidades. Es probable que la segunda banda de concentración de actina más intensa se

corresponda a la actina vinculada a la zonula adherens (trabajo en preparación). La interpretación más parsimoniosa de este resultado es que luego de una injuria las células endimarias pierden las microvellosidades. Esto ocurre en paralelo con la pérdida de la polaridad morfológica que sufre el pseudo-epitelio endimario cuando la médula es lesionada.

La activación de los receptores P2X7 a través de la inyección intramedular de BzATP no provocó cambios en la distribución la actina en las células endimarias, lo que va en línea con el hecho de que la inyección de la droga tampoco indujo la migración de las células derivadas del epéndimo. Concluimos entonces que la cascada de mecanismos intracelulares desencadenados por la activación de los receptores P2X7 no tiene un efecto en la polimerización de este filamento. Es posible que se requiera la activación de otros receptores purinérgicos para que se desencadene los cambios en el citoesqueleto necesarios para la migración celular. Por ejemplo, Grimm et al. (2010) muestran que para que los progenitores neurales embrionarios migren desde la zona subventricular hacia la zona ventricular es necesaria la activación de los receptores P2Y. Por otra parte, es posible que para que se desencadene la migración de las células endimarias se requiera otro tipo de señalización además de la purinérgica. El tejido lesionado secreta un conjunto de moléculas que actúan como señales quimio-atrayentes. Un ejemplo de molécula candidata para inducir la migración celular de progenitores neurales es el factor quimio-atrayente derivado de células estromales SDF-1, que puede ser producido por los astrocitos activados por la lesión (Müller et al., 2006). Esta molécula se une al receptor 4 de quimiocinas CXC (CXCR4) (Müller et al., 2006, Imitola et al., 2004). En el trabajo de Tysseling et al. (2011) reportan que en la médula espinal intacta el CXCR4 se expresa únicamente en las células endimarias. Por otra parte Jaerve et al. (2012) muestran que hay un incremento en los niveles de SDF-1 en el sitio de lesión de la médula espinal y que esto aumenta el reclutamiento de progenitores neurales mediante la señalización SDF-1/CXCR4.

### **Filamentos intermedios y plasticidad fenotípica de las células endimarias**

La lesión espinal además de traer aparejados cambios morfológicos, también trae asociados cambios fenotípicos en las células endimarias. Dentro de éstos, observamos modificaciones en la expresión y distribución de algunos filamentos

intermedios del citoesqueleto. La dinámica de los filamentos intermedios es regulada por un amplio rango de cascadas de señalización desencadenadas por estímulos intracelulares y extracelulares, como por ejemplo el estrés celular. Estos filamentos tienen un rol protector contra la apoptosis y facilitan el movimiento celular sirviendo como andamios. Por ejemplo, la depleción de este tipo de filamentos en los astrocitos reduce la velocidad de migración (Etienne-Manneville, 2018).

La nestina aumenta su expresión luego de la lesión. Este resultado está de acuerdo con el trabajo de Cawsey et al. (2015) en donde demuestran que luego de la lesión espinal en humanos la cantidad de células endimarias que expresan nestina aumenta. En nuestro estudio encontramos que la lesión genera un cambio en el perfil espacial de la expresión de vimentina, la cual se retrae del dominio apical de las células endimarias. La membrana plasmática apical y las proteínas de uniones adherentes juegan un rol muy importante en la determinación del linaje de la progenie derivada de las células madre neurales e.g., hacia la autorrenovación o la diferenciación (Götz y Huttner, 2005). El retiro de la vimentina del polo apical de las células endimarias podría implicar un cambio en la biología de estos progenitores y regular eventos celulares como la proliferación o la selección del linaje celular de las nuevas células generadas en el epéndimo. La inyección intramedular de BzATP no generó cambios en la expresión ni distribución de la nestina ni de la vimentina lo que sugiere que la activación de los receptores P2X7 no es parte de los mecanismos que reorganizan la estructura sub-celular de los filamentos intermedios.

La GFAP es una proteína de los filamentos intermedios típica de algunos progenitores en nicho de células madre. Nuestro trabajo muestra que la lesión genera un aumento de la población de células que expresan GFAP, lo cual se ve tanto con técnicas de inmunofluorescencia como con el uso del ratón transgénico GFAP-GFP. Posiblemente el aumento de la expresión de esta proteína se deba a su implicancia en el movimiento celular y en la migración (Middeldorp y Hol, 2011). Este aumento se observa tanto en los dominios laterales como en los polos dorsal y ventral del epéndimo. Estos resultados coinciden con los trabajos de Ren et al. (2017) y Meletis et al. (2008) en los cuales describen que hay células en el epéndimo que pasan a ser inmunoreactivas para GFAP luego de la lesión.

La inyección intramedular de BzATP produce también un aumento de la expresión de GFAP en las células endimarias. En este caso no podemos pensar que este cambio esté asociado a la migración ya que las células no migran al inyectar la droga. Sin embargo el GFAP está involucrado en diversas funciones celulares que pueden explicar su sobreexpresión. Como ejemplos de estas funciones, protege al sistema nervioso contra el estrés mecánico (Nawashiro et al., 1998) y tienen un rol protector frente a la isquemia (regulando el flujo sanguíneo) y la neurotoxicidad, reduciendo los niveles de neurodegeneración (Middeldorp y Hol, 2011). El GFAP se ha asociado también a la creación de barreras físicas para limitar el tejido lesionado, la contribución a la barrera hematoencefálica, la remielinización y la generación de resistencia mecánica (Brenner, 2014). Por otra parte, regula la endocitosis y la movilidad de los endosomas en los astrocitos además de la movilidad y posición lisosomal (Etienne-Manneville, 2018), lo que también podría ocurrir en las células endimarias “activadas”. Se sabe además que el GFAP y la vimentina están involucrados en el control del tamaño y de la forma nuclear (Etienne-Manneville, 2018). Existen evidencias de que los niveles de vimentina se correlacionan con la rigidez nuclear y la organización de la cromatina, sugiriendo que los filamentos intermedios transmiten fuerzas a la envoltura nuclear controlando la expresión génica. Mutaciones en el GFAP afecta la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (Etienne-Manneville 2018). Por lo tanto, es posible que la sobreexpresión de ésta proteína podría estar relacionada con un cambio en la maquinaria de transcripción que se requiere para que las células respondan al trauma.

Algunos de los cambios fenotípicos que sufren las células endimarias en las lesiones medulares y en las inyecciones de BzATP, entre ellos el aumento de la expresión de GFAP, se asemejan al fenotipo de los progenitores neurales de los nichos neurogénicos del cerebro adulto (Doetsch et al., 1999), lo cual plantea la posibilidad de que los progenitores del epéndimo son reprogramados por la lesión - en parte por activación de receptores P2X7- a un estado similar a células progenitoras “bona fide”.

## **El despertar del epéndimo: reactivación de la proliferación mediante receptores P2X7**

En los mamíferos adultos la actividad proliferativa de las células endimarias es prácticamente nula. La lesión espinal aumenta significativamente la cantidad de células que pasan a encontrarse dentro del ciclo celular, lo que se traduce en la activación de varias ciclinas, como la proteína nuclear asociada a la proliferación Ki67. La Ki67 se encuentra presente en las fases S, G2 y M del ciclo celular (Gerdes et al., 1984) y por lo tanto representa una imagen instantánea del potencial proliferativo al momento del sacrificio del animal. A juzgar por la expresión de Ki67, a los 3 DPL es el momento con el mayor número de células endimarias ciclando. El potencial proliferativo del epéndimo luego decae progresivamente hasta que a los 30 DPL se asemeja al de los animales control. Estos datos coinciden con los reportados por McDonough et al. (2012) y Namiki y Tator (1999), en donde muestran que la respuesta proliferativa en la médula espinal tiene también un pico a los 3 DPL tanto en el ratón como en la rata adulta. Estos resultados demuestran que la respuesta proliferativa de las células endimarias es acotada en el tiempo. Teniendo en cuenta que la migración celular (dentro de los tiempos post-lesión estudiados) se observa a partir de los 8 DPL podemos suponer que hay una primera fase de amplificación de la población celular y luego una fase de migración hacia la cicatriz glial.

La proliferación se estudió administrando BrdU, un análogo de la timidina que se incorpora en las células en la fase S del ciclo celular. El BrdU se administra en el pico de máxima replicación (entre las 24 y 72 h post-lesión) y las células una vez que lo incorporan permanecen marcadas hasta el día de la fijación. La eventual progenie de las células que incorporan el marcador también quedan marcadas. Por lo tanto, el BrdU evidencia la cantidad de células que se replicaron en el pico de proliferación y las derivadas de éstas que permanecen en el epéndimo en los distintos tiempos post-lesión estudiados. En este trabajo encontramos un aumento de las células endimarias que captan BrdU con respecto al control en todos los tiempos post-lesión estudiados, lo cual apoya los resultados obtenidos con Ki67. El hecho de que no se observen diferencias en el número de células que captan BrdU entre los distintos tiempos post-lesión (8, 15, 30 DPL), puede deberse a que algunas

células que se dividen dentro del período de biodisponibilidad de BrdU migran, y otras vuelven a dividirse, manteniéndose constante el número de células marcadas con BrdU en el epéndimo.

Dado que la lesión provoca un aumento en la expresión de GFAP (efecto reproducido por la activación de receptores P2X7) en algunas células endimarias, es razonable pensar que éstas podrían ser la subpoblación que prolifera. Sin embargo, nuestros datos revelaron que de las células que captan BrdU al rededor del 50% son GFAP lo que estaría en contra con la idea de que el GFAP esté causalmente relacionado con la proliferación. El descenso de la proporción de células GFAP+/BrdU+ a los 8 y 15 DPL podría ser debido a que algunas dejan de expresar GFAP o a que migran más las GFAP+ que las GFAP-. Dado que la expresión de GFAP permanece constante en el canal a los 8, 15 y 30 DPL (datos no ilustrados), nos inclinamos por la segunda alternativa. El protocolo de saturación de BrdU 1 h antes de sacrificar al animal indica que la proporción células GFAP+ y - que continúan dividiéndose a lo largo del tiempo permanece relativamente constante.

Con respecto a la señalización purinérgica, el aumento de proliferación de las células por la lesión es mimetizado con la inyección intramedular de BzATP lo cual sugiere que la activación de los receptores P2X7 es suficiente para reactivar el ciclo celular en los progenitores “dormidos” que yacen en el epéndimo. Los mecanismos subyacentes a la re-activación de la proliferación aún se desconocen. Utilizando imagenología de calcio, Marichal et al. (2016) demostraron que la aplicación de BzATP genera una corriente entrante en células que contactan el canal central de ratas neonatales, con un influjo de calcio que desencadena a su vez una onda de calcio sostenida por la liberación de calcio de depósitos intracelulares por receptores de rianodina. Varios estudios convergen en la idea de que un aumento intracelular de calcio (ya sea proveniente del espacio extracelular como de la liberación de compartimentos intracelulares) desencadena la proliferación celular mediante segundos mensajeros (Munaron, 2003, Munaron et al., 2004., Berridge 1995, Resende et al., 2013). El aumento de calcio intracelular desencadenado por la activación de los receptores P2X7 mediante la aplicación de BzATP podría estar desencadenando la proliferación de las células endimarias. Como las células

ependimarias de los dominios laterales están acopladas por conexina 43, la onda de calcio se podría propagar a su vez hacia células vecinas (Marichal et al., 2016). Es posible que los mecanismos que desencadenan la proliferación de estas células mediante la aplicación de BzATP sean similares a los que generan la proliferación en otras células del sistema nervioso mediante la activación de los receptores P2X7. Monif et al. (2009) por ejemplo afirman que la activación de los P2X7 en la microglia en cultivos primarios de hipocampo de rata desencadena la formación de poros de membrana por los que se liberan varias sustancias proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), lo cual de manera autocrina promueve la activación de más células de microglia.

Resumiendo, a nivel del epéndimo el escenario más probable es que la activación de los receptores P2X7 por la aplicación intramedular de BzATP produce un aumento de la concentración intracelular de calcio a nivel local, la cual genera una onda de calcio a partir de las reservas intracelulares que se propaga en forma regenerativa al resto de la célula, invadiendo compartimientos clave como el núcleo y el polo apical (Marichal et al., 2016). La señal de calcio inducida por la activación de receptores P2X7 podría desencadenar cambios en la transcripción génica dando lugar a cambios fenotípicos y activando la proliferación de los progenitores dormidos (Fig. 26).



# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De los resultados presentados en esta tesis se desprende que la señalización purinérgica a través de los receptores P2X7 está implicada en algunos eventos que dispara una lesión de la médula espinal en las células endimarias: el cambio a un fenotipo molecular GFAP y el aumento de proliferación. La reactivación de la proliferación de las células endimarias es uno de los eventos clave en la respuesta a la lesión ya que es la responsable de generar progenie que se integrará a la cicatriz glial. Nuestro trabajo sugiere que la activación de los receptores P2X7 es suficiente para explicar la respuesta proliferativa de los endimocitos frente a una lesión, aunque no descarta otros mediadores que podrían contribuir a la proliferación. La contribución de los receptores P2X7 parece ser selectiva ya que varios aspectos de la biología de los endimocitos modificados por la lesión, entre ellos la migración, no fueron modificados por la inyección intraespinal del agonista BzATP.

El ATP liberado alrededor del epicentro de la lesión así como el BzATP inyectado intraespinalmente actúan sobre receptores P2X7 de otros tipos celulares (e.g., astrocitos, microglía, neuronas) además de actuar sobre los receptores de las células endimarias. Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que la activación de receptores P2X7 en otros tipos celulares genere la liberación de moléculas difusibles (e.g., neurotransmisores, factores de crecimiento) que afecten a las células endimarias contribuyendo a alguno de los cambios observados en esta tesis. Una estrategia para descartar esta posibilidad podría ser el uso de cultivos organotípicos de médula espinal y desenjaular ATP en las inmediaciones de las células endimarias con una alta resolución espacial utilizando un láser bajo control visual (colaboración con el Dr. Federico Trigo del Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular, IIBCE). Luego de desenjaular ATP en zonas específicas del epéndimo se podría evaluar los cambios fenotípicos así como la actividad mitótica de las células endimarias activadas. Una estrategia poderosa para evaluar la participación de los receptores P2X7 en la respuesta a la lesión sería el uso de ratones transgénicos con el gen que codifica el receptor P2X7 flanqueado por sitios loxP. La cruce de este ratón con el transgénico FoxJ1CreER-tdTomato

haría posible la eliminación selectiva del receptor P2X7 de las células ependimarias en las que se produce la recombinación por inyección de tamoxifeno. Otras de las incógnitas a resolver en el futuro es si existe una regulación homeostática en la expresión de los receptores P2X7 luego de su activación por agonistas o inactivación mediante antagonistas. Finalmente, en futuros estudios será necesario abordar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la proliferación y los cambios fenotípicos desencadenados con la activación de los receptores P2X7. Se sabe que la expresión de Ki67 es regulada positivamente en las inyecciones de BzATP en las células ependimarias, pero se desconoce la modulación de la expresión de otras ciclinas y factores de transcripción que podrían estar regulando la entrada de estas células al ciclo celular. Nos planteamos estudiar entonces cómo se modula la expresión de proteínas clave para el control del ciclo, como por ejemplo el factor de transcripción EF2, regulador de los genes necesarios para entrar a la fase S. Se podría evaluar además si se dan cambios ultra-estructurales del polo apical de las células ependimarias luego de la inyección de BzATP, por ser clave en el destino del linaje celular.

Por otra parte, sería interesante además abordar los mecanismos que activan la migración de las células ependimarias en las lesiones, estudiando en primer lugar si interfiere en este evento celular la modulación del receptor CXCR4 utilizando agonistas conocidos como RSVM y ASLW (Sachpatzidis et al., 2004).

# BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro-Cervello C., Soriano-Navarro M., Mirzadeh Z., Alvarez-Buylla A., García-Verdugo J. M. Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth (2012). *The Journal of Comparative Neurology*. 520(15): 3528-3552.
- Anderson C. M., Nedergaard M. Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons (2006). *Trends in Neurosciences* 29(5). 257-262.
- Barnabe-Heider F., Goritz C., Sabelström H., Takebayashi H., Pfrieger F. W., Meletis K., Frisén, J. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord (2010). *Cell Stem Cell* 7, 470-482.
- Bartlett R., Stokes L., Sluyter R. The P2X7 Receptor Channel: Recent Developments and the Use of P2X7 Antagonists in Models of Disease (2014). *Pharmacological Reviews* 66. 638–675.
- Berridge M. J. Calcium signalling and cell proliferation (1995). *BioEssays* 17 (6): 491:500.
- Bianchi B. R., Lynch K. J., Touma E. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes (1999). *European Journal of Pharmacology* 376(1-2). 127-138.
- Bjornsson C. S., Apostolopoulou, M., Tian Y., Temple S. It Takes a Village: Constructing the Neurogenic Niche (2015). *Developmental Cell* 32, 435-446.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., Plastino, J. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility (2014). *Physiological Reviews*, 94(1), 235–263.
- Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries (2014). *Neuroscience letters*, 565: 7-13.

- Bruni J. E., Del Bigio M. R., Clatienburgi R. E. Ependyma: Normal and Pathological. A Review of the Literature (1985). *Brain Research Reviews*, 9: 1-19.
- Cawsey T., Duflou J., Weickert C. S., Gorrie C. A. Nestin-Positive Ependymal Cells Are Increased in the Human Spinal Cord after Traumatic Central Nervous System Injury (2015). *Journal of Neurotrauma*. 2015 Sep 15;32(18):1393-402.
- DeBrot, A., Yao, L. The combination of induced pluripotent stem cells and bioscaffolds holds promise for spinal cord regeneration (2018). *Natural regeneration research*, 1677-1684.
- Doetsch F., Caille I., Lim D. A, Garcia-Verdugo J. M, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain (1999). *Cell* 97:703–716.
- Donovan J., Kirshblum S. Clinical Trials in Traumatic Spinal Cord Injury (2018). *Clinical Trials in Traumatic Spinal Cord Injury*. 1-15.
- Etienne-Manneville S. Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology (2018). *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34:11.1–11.28.
- Fiorelli, R., Cebrian-Silla, A., Garcia-Verdugo, J.-M., Raineteau O. The adult spinal cord harbors a population of GFAP-positive progenitors with limited self-renewal potential. *Glia* (2013). 61(12), 2100–2113.
- Fitch M. T., Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure (2008). *Experimental Neurology* 209. 294-301.
- Frederiksen K, McKay RD (1988) Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci* 8:1144–1151.
- Fu H., Qi Y., Tan M., Cai J., Hu X., Lui Z., Jensen J., Qui M. Molecular Mapping of the Origin of Postnatal Spinal Cord Ependymal Cells: Evidence That Adult Ependymal Cells Are Derived from Nkx6.1 Ventral Neural Progenitor Cells (2003). *The journal of comparative neurology* 456. 237–244.

- Ganzen J. R., Platel J-C, Rubio M. E., Bordey A. Ependymal cells along the lateral ventricle express functional P2X7 receptors (2009). *Purinergic signaling*. 5(3): 299-307.
- Gerdes J., Lemke H., Bausch H., Wacker H. H., Schwas U., Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 (1984). *The Journal of Immunology*. 133(4):1710-5.
- Gómez-Villafuertes R., Rodríguez-Jiménez F. J., Alastrue-Agudo A., Stojkovic M., Miras-Portugal M. T., Moreno-Manzano V. Purinergic Receptors in Spinal Cord-Derived Ependymal Stem/Progenitor Cells and Their Potential Role in Cell-Based Therapy for Spinal Cord Injury (2015). *Cell Transplantation*, Vol. 24, pp. 1493–1509.
- Grimm I., Ullsperger S., N., Zimmermann H. Nucleotides and epidermal growth factor induce parallel cytoskeletal rearrangements and migration in cultured adult murine neural stem cells (2010). *Acta Physiologica*. 199: 181-189.
- Hamilton L. K., Troung M. K. V., Bednarczyk M. R., Aumont A., Fernandes K. J. L. Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord (2009). *Neuroscience* 164 1044–1056.
- Hol E. M., Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system (2015). *Current Opinion in Cell Biology*. 32: 121-130.
- Hugnot J. P., Franzen R. The spinal cord ependymal region: A stem cell niche in the caudal central nervous system (2011). *Frontiers in bioscience*. Enero. 16(3): 1044-59.
- Hugnot J. P., Sabourin J. C., Ohayon D., Perrin F. E., Bauchet L., Pattyn A. The spinal cord ependymal region: A stem cell niche in the caudal central nervous system (2012). Poster.
- Imitola, J., Raddassi, K., Park, K. I., Mueller, F.-J., Nieto, M., Teng, Y. D., Khoury, S. J. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal

cell-derived factor 1 /CXC chemokine receptor 4 pathway (2004). Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(52), 18117–18122.

- Jaerve A., Schira J., Müller H. W. Concise Review: The Potential of Stromal Cell-Derived Factor 1 and Its Receptors to Promote Stem Cell Functions in Spinal Cord Repair (2012). Stem Cells Translational Medicine. 1:10.
- James L. S., Theadom A. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 (2019). Lancet Neurol 2019; 18: 56–87.
- Kang Y., Ding H., Zhou H., Liu Z. L., Pan D., Feng S. Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review (2018). Journal of Neurorestoratology 2018:6 1–9.
- Komativa M., Ericsson P. S. Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. Neuroscience Letters 369 (2004) 24–27.
- Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells (2009) Annual Reviews 32.149–84.
- Lecca D., Fumagalli M., Ceruti S., Abbracchio M. Interwining extracellular nucleotides and their receptors with Ca<sup>2+</sup> in determining adult neural stem cell survival, proliferation and final fate (2016). P.Phil. Trans. R. Soc. B 371: 20150433.
- Leeson H. C., Kasherman M. A., Chan-Ling T., Lovelace M. D., Browline J. C., Topping K. M., Gu B. J., Weible M. W. P2X7 Receptors Regulate Phagocytosis and Proliferation in Adult Hippocampal and SVZ Neural Progenitor Cells: Implications for Inflammation in Neurogenesis (2018). Stem cells 9999. 1–14 .
- Mao Y., Mathews K., Gorrie C. A. Temporal Response of Endogenous Neural Progenitor Cells Following Injury to the Adult Rat Spinal Cord (2016). Frontiers in cellular neuroscience.

- Marichal N., Fabbiani G., Trujillo-Cenóz O., Russo R. Purinergic signalling in a latent stem cell niche of the rat spinal cord (2016). *Purinergic Signalling* 12:331–341.
- Marichal N., García G., Radmilovich M., Trujillo-Cenóz O., Russo R. Spatial Domains of Progenitor-Like Cells and Functional Complexity of a Stem Cell Niche in the Neonatal Rat Spinal Cord (2012). *Stem cells* 30: 2020-2031.
- Maynard F. M., Bracken M. B., Creasey G., Ditunno J. F., Donovan W. H., Ducker T. B., Garber S. L., Marino R. J., Stover S. L., Tator C. H., Waters R. L., Wilberger J. E., Young W (1997) International standards for neurological and functional classification of spinal cord injury. *Spinal Cord* 35:266-274.
- McDonough A., Martínez-Cerdeño V. Review Article Endogenous Proliferation after Spinal Cord Injury in Animal Models (2012). *Stem Cells International* Volume 2012, Article ID 387513.
- Meletis K., Barnabe-Heider F., Cerlén M., Evergren E., Tomilin M., Shupliakov O., Frisén J. Spinal Cord Injury Reveals Multilineage Differentiation of Ependymal Cells (2008). *Plos biology*. Volume 6. Issue 7. 1494-1507.
- Michel A. D., Xing M., Humphrey P. P. Serum constituents can affect 2'-& 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP potency at P2X7 receptors (2001). *British Journal of Pharmacology*. 132(7), 1501-1508.
- Middeldorp J., How E. M. GFAP in health and disease (2011). *Progress in Neurobiology* 93, 421–443.
- Monif M., Reid C. A., Powell K. L., Smart M. L., Williams D. A. The P2X7 Receptor Drives Microglial Activation and Proliferation: A Trophic Role for P2X7R Pore (2009). *Journal of Neuroscience*, 29 (12) 3781-3791.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, et al. (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071–1082.

- Mothe A. J., Tator C. H. Proliferation, migration and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat (2005). *Neuroscience* 131: 177-187.
- Müller F.-J., Snyder E. Y., Loring J. F. Gene therapy: can neural stem cells deliver? (2006). *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 75–84.
- Munaron L., Antoniotti S, Lovisolo D. Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms? (2004). *Journal of Cell and Molecular Medicine*; 8 (2): 161-168.
- Munaron L. Calcium signalling and control of cell proliferation by tyrosine kinase receptors (2002). *International Journal of Molecular Medicine* 10: 671-676.
- Nakano N., Kanekiyo K., Yamada Y., Tamachi M., Suzuki Y., Fukushima M., Saito F., Abe S., Tsukagoshi C., Miyamoto C., Ide C. Structures of filum terminale and characteristics of ependymal cells of its central canal in rats (2018). Accepted manuscript.
- Namiki J., Tator C. H. Cell proliferation and nesting expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury (1999). *Journal of neuropathology and experimental neurology*. Vol. 58. No. 5. Pp. 489-498.
- Nawashiro H., Messing A., Azzam N., Brenner M. Mice lacking GFAP are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury (1998). *NeuroReport*: 9(8): 1691-1696.
- Nori S., Abuja C. S., Feelings M. G. Translational Advances in the Management of Acute Spinal Cord Injury: What is New? What is Hot? (2017). *Clinical Neurosurgery*. Volume 64. Number 1. 119-128.
- Ostrowski L. E., Hutchins J. R., Zakel K., O’Neal W. K. Targeting Expression of a Transgene to the Airway Surface Epithelium Using a Ciliated Cell-Specific Promoter (2003).

- Panayiotou E., Malas S. Adult spinal cord ependymal layer: a promising pool of quiescent stem cells to treat spinal cord injury. *Frontiers in physiology*. November 2013. Volume 4. Article 340. 1-3.
- Pinto L., Götz M. Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS (2007). *Progress in Neurobiology* 83(1):2-23.
- Qin Y., Zhang W., Yang P. Current States of Endogenous Stem Cells in Adult Spinal Cord (2014). *Journal of Neuroscience Research*.
- Ren Y., Ao Y., O'Shea T. M., Burda J. E., Bernstein A. M., Brumm A. J., Muthusamy N., Ghashghaei T., Carmichael T., Cheng L., Sofreniew M. Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury (2017). *Scientific reports*. 7: 41122.
- Resende R. R., Andrade L. M., Oliveira A. G., Guimarães E. S., Guatimosim S., Leite M. F. Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus (2013). *Cell Communication and Signaling* 11:14.
- Russo R. E. Functional properties of progenitor-like cells in the spinal cord: implications for self-repair. Capítulo 10. 1-16. Perale G., Rossi F. *Spinal cord injury. Repair strategies* (2019).
- Sabelström H., Stennud M., Réu P., Dias DO., Elfineh M., Zdunek S., Damberg P., Göritz C., Frisén J. Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice (2013). *Science* 1;342(6158):637-40.
- Sabelström H., Stenudd M., Frisén J. Neural stem cells in the adult spinal cord. *Experimental neurology* (2013). 1-6.
- Sabourin J. C., Ackema K. B., Ohayon D., Guichet P-O., Perrin F. E., Garces A., Ripoll C., Charite J., Simonneau L., Kettenmann H., Zine A, Privat A., Valmier J., Pattyn A., Hugnot J-P. A Mesenchymal-Like ZEB11 Niche Harbors Dorsal Radial Glial Fibrillary Acidic Protein-Positive Stem Cells in the Spinal Cord (2009). *Stem Cells*, 27(11), 2722-2733.

- Sachpatzidis A., Benton B., Manfredi J. P., Wang H., Hamilton A., Dohlman H. G., Lolis E. Identification of Allosteric Peptide Agonists of CXCR4 (2002). *The Journal of Biological Chemistry*. 278, 896-907.
- Sauvanet C., Wayt J., Pelaseyed T., Bretscher A. Structure, Regulation and Functional Diversity of Microvilli on the Apical Domain of Epithelial Cells (2015). *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Vol. 31:593-621.
- Simpson L. A., Eng J. J., Hsieh, J. T., Wolfe D. E., and the Spinal Cord Injury Rehabilitation Evidence (SCIRE) Research Team. Health and Life Priorities of Individuals with Spinal Cord Injury: A Systematic Review. (2012). *Journal of neurotrauma*, 29:1548–1555.
- Singh A., Tetreault L., Kalsi-Ryan S., Nouri A., Fehlings M. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury (2014). *Clinical Epidemiology* 2014;6 309–331.
- Spassky N., Merkle F. T., Flames N., Tramontin A. D., García-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis (2005). *Journal of Neuroscience* 25 (1) 10-18.
- Sperlagh B., Illes P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases (2014). *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol. 35, No. 10. 537-547.
- Stenudd M.; Hanna Sabelström H., Frisén J. Role of Endogenous Neural Stem Cells in Spinal Cord Injury and Repair (2015). *JAMA Neurology*. Volume 72, Number 2. 235-237.
- Tang Y., Illes P. Regulation of Adult Neural Progenitor Cell Functions by Purinergic Signaling (2017). *Glia*. 65(2):213-230.
- Thuret S., Moon L. D., Gage F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury (2006). *Nature Reviews, Neuroscience*. Volume 7, 628-643.

- Tysseling V. M., Mithal D., Sahni V., Birch D., Jung H., Miller R. J., Kessler J. A. SDF1 in the dorsal corticospinal tract promotes CXCR4+ cell migration after spinal cord injury (2011). *Journal of Neuroinflammation*. 8: 16.
- Wang X., Arcuino G., Takano T., Lin J., Peng W. G., Wan P., Li P., Xu Q., Liu Q. S., Goldman S. A., Nedergaard M. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury (2004). *Nature Medicine*. 10: 8. 821-827.
- Xing, L., Anbarchian, T., Tsai, J. M., Plant, G. W., & Nusse, R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates ependymal cell development and adult homeostasis (2018). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(26), E5954–E5962.
- Young M. T., Pelegrin P., Surprenant A. Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP (2007). *Molecular Pharmacology* 71(1). 92-100.
- Yu Y., Ugawa S., Ueda T., Inoue K., Kyaw N., Umemura A., Tase M., Yamada K., Shimada S. Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain (2008). *Brain Research*. 1194:45-55.
- Zhang, S., Cui, W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotent and neural differentiation (2014). *World J Stem Cells*. 6(3): 305-311.
- Zhong Y., Dunn, P. M., Xiang Z. Pharmacological and molecular characterization of P2X receptors in rat pelvic ganglion neurons (1998). *British Journal of Pharmacology* 125(4).771-781.

# AGRADECIMIENTOS

- A Raúl, por abrirme las puertas de su laboratorio y tutorearme en la tesis.
- A los miembros del tribunal, por aceptar ser parte del mismo e invertir su tiempo en corregir la tesis.
- A Victoria Falco, por acompañarme en todas las etapas del trabajo, ayudándome mucho en los experimentos y apoyándome anímicamente en todo momento.
- A Spring Valdivia por haberme ayudado siempre que lo necesité.
- A Omar Trujillo y Ma. Inés Rehermann, por haber formado un grupo de trabajo tan lindo y por siempre haberme nutrido mucho de biología y de experiencias de vida.
- A Gabriela Fabbiani por todo el apoyo, los momentos y charlas de laboratorio compartidas.
- A Reni, Jime, Cata, Liz y Vicky, que si bien estuvimos en distintos momentos en el laboratorio creo que formamos un grupo de mujeres en la ciencia muy especial.
- A Maximiliano Torres y Lucía Fernandez por su apoyo incondicional en todo momento.
- A Andrés Di Paolo por toda la ayuda en el microscopio.
- A Adrián Valentin, Cecilia Reali, Federico Trigo y todo NFCM.
- A los “pecesitos”.
- A mi familia, que lo son todo.

