



Tesina para optar por el título de Licenciada en Ciencias
Biológicas:

**Estudio de las propiedades de membrana de las células
ependimarias en la médula espinal de ratones adultos
normales y luego de una lesión**

Br. Jimena Fagetti Methol

Orientadores: Dr. Raúl E. Russo y Dra. Cecilia Realí

Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

2019

Tabla de contenido:

Agradecimientos:	3
Abreviaturas:	4
Resumen:	5
Regeneración del sistema nervioso en distintas especies	7
Respuesta a una lesión espinal en mamíferos adultos	9
El CC como nicho de células madre	11
Células progenitoras del SNC	14
Objetivos:	16
Objetivo general:	16
Objetivos específicos:	16
Materiales y Métodos:	17
Disección de la médula espinal	17
- Ratones control:	17
- Ratones lesionados:	19
Registros electrofisiológicos	20
Identificación morfológica de las células registradas	23
Resultados:	25
Propiedades electrofisiológicas encontradas en las células del CC	25
Acoplamiento funcional entre células endimarias	28
Neuronas inmaduras alrededor del CC	30
Conclusiones y Discusión:	32
Perspectivas:	39
Bibliografía:	45

Agradecimientos:

A las evaluadoras Adriana y Verónica por acceder y tomarse el tiempo de leer y evaluar mi Tesina final de Grado.

A Raúl, por permitirme formar parte de tan lindo grupo de trabajo y por darme la oportunidad de realizar mi pasantía en el laboratorio en una línea de investigación tan rica e interesante.

A Ceci, por enseñarme todo con tanta dedicación y paciencia, y por compartir conmigo todo su conocimiento en electrofisiología. También por siempre darme para adelante, por su entusiasmo y energía y por las charlas compartidas.

Al resto del grupo, Vicky, Ceci. M, Spring, Reni, Gabi, Ine, Adrián, Omar y Federico por la buena disposición siempre para resolver cualquier inquietud, por la calidez humana y el compañerismo que me transmitieron desde el primer día.

A mis amigos de la facultad que me acompañaron durante toda la carrera y que siempre estuvieron ahí, ya sea para juntarse a estudiar o para distraerse de tanto estudio. Sin duda hicieron del pasaje por la facultad una experiencia mucho más disfrutable y única, de la cual me llevo grandes amigos.

A mis amigas del liceo por acompañar en todo sentido el proceso y convertirse en un soporte fundamental para lograrlo. Al resto de mis amigos del liceo, y de la vida que también siempre estuvieron y supieron entender las ausencias en períodos de parciales y exámenes.

A mi familia, que me apoyó siempre en todo y que bancó malhumores, crisis y colapsos pero que también festejó logros y metas cumplidas. Sin duda son el sostén emocional y afectivo que hace más fácil todo.

A Guille, por su compañerismo y cariño de siempre, por creer en mí más que yo misma y por haber estado para lo que necesitara durante todo este tiempo.

Abreviaturas:

4AP – 4-aminopiridina.

5DPL – 5 días post-lesión.

BrdU – Bromodeoxiuridina, análogo de Timidina.

Cbx – Carbenoxolona.

CC - Canal central.

Cm – Capacidad de membrana.

Cx – Conexina.

DAPI – 4',6-diamino-2-fenilindol, marcador nuclear.

DIC – Contraste de interferencia diferencial.

EdU - Etildeoxiuridina, análogo de Timidina.

GR – Glía Radial.

HEPES - Ácido hidroxietilpiperazin etanosulfónico, amortiguador pH.

I_A – Corriente de K⁺ de tipo A (rápida activación e inactivación).

I_{KD} – Corriente de k⁺ de lenta inactivación (rectificador retardado).

K_V – Canal de potasio dependiente de voltaje.

LME - Lesión de médula espinal.

NMDG - N-metil-D-glucamina, sustituto del Na⁺.

PB – Buffer fosfato.

PFA – Paraformaldehído.

PM – Potencial de membrana.

PM_R – Potencial de membrana.en reposo

ROI – Región de interés.

SNC – Sistema nervioso central.

TEA – Tetraetilamonio.

TTX – Tetrodotoxina.

VC – Fijación de voltaje (*voltage clamp*).

Resumen:

Las células que rodean el canal central de la médula espinal derivan de la zona ventral del tubo neural y podrían tener la información necesaria para reconstruir la médula espinal luego de una lesión. De hecho, estas células reaccionan frente a una lesión incrementando su proliferación y migrando hacia el sitio de injuria, aunque en los mamíferos esta reacción no es suficiente para reparar los circuitos espinales. Una estrategia prometedora para lograr una recuperación funcional es la manipulación de estas células progenitoras endógenas. Sin embargo, se sabe poco sobre las propiedades de membrana de las células que forman este nicho, siendo la mayoría de los estudios realizados en roedores neonatales y no en adultos. Nos propusimos estudiar las propiedades de membrana de las células del canal central en ratones adultos realizando registros de “patch-clamp” en rodajas mantenidas in vitro. Para evaluar la posible plasticidad de estas propiedades en los progenitores en respuesta a una lesión, realizamos registros en animales control y los contrastamos con aquellos en animales 5 días post lesión. Encontramos que las células del canal central son en general pasivas, con una subpoblación que presentan corrientes de K^+ voltaje-dependientes. Estas propiedades no cambiaron de forma significativa luego de la lesión. Sin embargo, en los ratones lesionados la mayoría de las células registradas en los aspectos laterales del canal central se encontraban acopladas por uniones de tipo “gap” a diferencia de los ratones sin lesionar en donde la mayoría de células están aisladas. Nuestros resultados sugieren que el acople funcional a través de conexinas, estaría involucrado en la reacción temprana de las células ependimarias frente a una lesión espinal.

Introducción:

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la incidencia mundial de las lesiones de médula espinal (LME) -tanto traumáticas como no traumáticas- se sitúa entre 40 y 80 casos por cada millón de habitantes. Sobre la base de la población mundial estimada en 2012, esto significa que cada año, entre 250.000 y 500.000 personas sufren lesiones medulares en todo el mundo. El 90% de los casos se deben a causas traumáticas prevenibles (como accidentes de tránsito, caídas o actos de violencia), aunque la proporción de lesiones medulares sin origen traumático (intervenciones quirúrgicas, enfermedades degenerativas, entre otras) parece ir en aumento. Este tipo de lesiones ocurren con mayor frecuencia en los jóvenes: en las mujeres el riesgo más alto es entre los 15 y los 19 años de edad y en los hombres entre los 20 y los 29. También ocurre con menor frecuencia en adultos mayores (en mujeres a partir de los 60 años y en hombres a partir de los 70). Según estudios publicados, la relación hombres:mujeres es al menos de 2:1 en la población adulta. Las lesiones medulares comprometen severamente la calidad de vida de la persona y están asociadas a menores tasas de escolarización y participación económica. Esto, además de los altos gastos médicos supone un costo importante tanto para quienes las padecen como para la sociedad en su conjunto. Por este motivo, además de que las personas que padecen una LME son más propensas a morir prematuramente, las menores tasas de supervivencia corresponden a los países de ingresos más bajos. Actualmente no existe una cura satisfactoria para las personas con lesiones espinales, por esto y por todo lo mencionado anteriormente, es que resulta necesario y urgente desarrollar nuevas estrategias o terapias efectivas para su tratamiento. Una aproximación interesante para seguir investigando, es la manipulación de los progenitores endógenos de la médula espinal que permitan una auto-reparación satisfactoria de las estructuras dañadas (Organización Mundial de la Salud, 2013; Rossignol y col., 2007).

Regeneración del sistema nervioso en distintas especies

La habilidad de muchos animales de regenerar partes sustanciales del cuerpo es un fenómeno remarcable de la biología. Un aspecto particularmente fascinante es la posibilidad de reconstruir un sistema nervioso funcional (Tanaka y Ferretti, 2009). Actualmente sabemos que la neurogénesis en nichos discretos del cerebro adulto representa una remarcable forma de plasticidad (Lledo y col., 2006; Ming y Song, 2005) pero ¿qué sucede con el poder regenerativo en la médula espinal? Un paradigma clásico para inducir la regeneración de la médula espinal es la amputación caudal (Tanaka y Ferretti, 2009). En respuesta a la misma, varios anamniotas acuáticos como lampreas, salamandras y peces, y también reptiles como lagartijas son capaces de regenerar la médula espinal (Anderson y Waxman, 1981; Iten y Bryant, 1976; Mochii y col., 2007; Niazi, 1963). Más recientemente se utilizó la lesión de la médula espinal como mecanismo para evaluar la regeneración espinal en animales sin cola, o donde la médula espinal termina antes que la cola. Utilizando este modelo, se descubrió que algunos vertebrados amniotas también presentan capacidades regenerativas, como el caso de la tortuga *Trachemys dorbignyi* que tiene la habilidad de organizar la reconexión de la médula espinal incluso luego de una sección completa (Rehermann y col., 2009). Esta extraordinaria habilidad regenerativa desafortunadamente se encuentra restringida en aves y mamíferos, lo que puede ser consistente con la noción de que sea un rasgo ancestral que fue reducido, perdido o bloqueado durante la evolución (Tanaka y Ferretti, 2009). Otra importante dimensión de la regeneración es su dependencia con la edad: los anfibios, las aves y los mamíferos muestran una regeneración parcial en estadios larvales y embrionarios respectivamente, pero en todos los casos pierden esta capacidad en el curso de la maduración. Esto sucede no solo en el paradigma de amputación de cola sino en varios contextos de regeneración tales como: lesión de médula espinal, lesión cerebral y regeneración de estructuras no-neurales como las extremidades (Garcia-Ovejero y col., 2015; Mizzel, 1968; Nicholls y Saunders, 1996).

El sistema nervioso central (SNC) de mamíferos adultos, fue considerado durante mucho tiempo un tejido relativamente estático con escasa renovación

celular. Posteriormente, el descubrimiento de células madre neurales residentes cambió la visión sobre la plasticidad y el potencial regenerativo de este sistema. El hecho despertó un gran entusiasmo por estudiar y tratar de aprovechar dicho potencial en nuevas terapias regenerativas basadas en el reclutamiento de células madre endógenas o progenitoras, para afecciones tales como la depresión, los accidentes cerebrovasculares, la lesión de la médula espinal y la enfermedad de Parkinson (Göritz y Frisén, 2012).

Actualmente está bien establecido que en el cerebro adulto se producen nuevas neuronas continuamente desde células madres que se encuentran confinadas en dos nichos bien definidos: 1) la zona subventricular (SVZ) que aporta interneuronas al bulbo olfatorio y 2) la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo (Lledo y col., 2006; Ming y Song, 2005). A pesar de que hubo mucho progreso en la investigación de células madre neurales en los nichos neurogénicos del cerebro anterior, todavía se sabe poco sobre las células madre y progenitoras en otras regiones, como por ejemplo en la médula espinal. La presencia de células madres neurales fuera de estos nichos neurogénicos conocidos se sugirió, en primer lugar por la demostración de la existencia de células que presentan capacidad de auto-renovación *in vitro* y el potencial de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Weiss y col., 1996) (Fig. 1 D). Hoy se sabe que los progenitores de oligodendrocitos constituyen la población celular proliferativa dominante en la médula espinal adulta intacta. Éstos se auto-renuevan y dan lugar a nuevos oligodendrocitos maduros. Por el contrario, los astrocitos y las células ependimarias, estarían restringidos a una limitada auto-duplicación (Barnabé-Heider y col., 2010) (Fig. 1).

En la médula espinal adulta de los mamíferos, la generación de nuevas neuronas *in vivo* es un hecho controversial. La mayoría de los estudios afirman que no habría diferenciación hacia el linaje neuronal (Horner y col., 2000; Meletis y col., 2008). Sin embargo, algunos sugieren que las células ependimarias que contactan el canal central (CC) podrían llegar a generar nuevas neuronas, en determinadas condiciones (Danilov y col., 2006; Ke y col., 2006; Shechter y col., 2007)

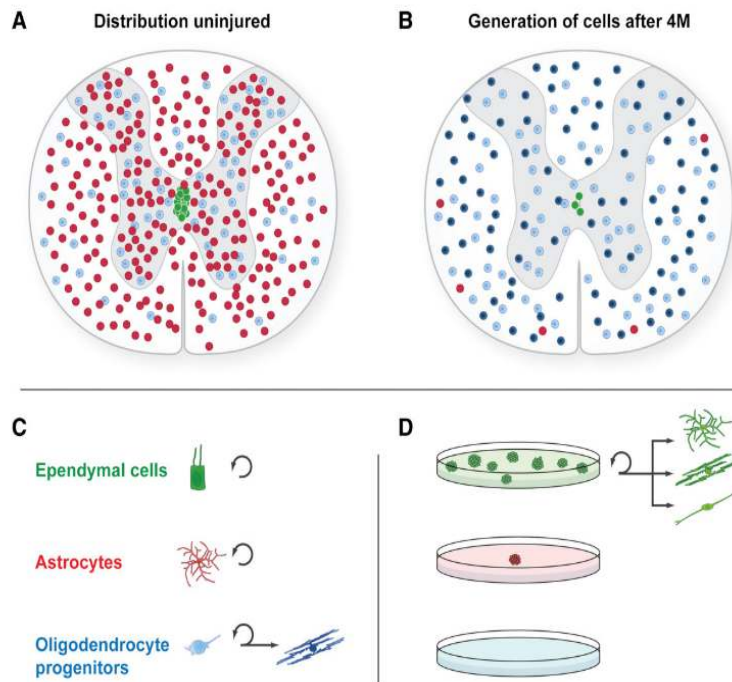


Figura 1: A–B: Distribución de células ependimarias (verde), astrocitos (rojo), progenitores de oligodendrocitos (azul), en la médula espinal sana (A), y la progenie generada en 4 meses en ausencia de lesión (B). Las células están ilustradas al 50% de su número estimado. C: Representación esquemática mostrando el destino de las células mencionadas en la médula espinal intacta. D: El potencial de células madres neurales in vitro en la médula espinal adulta está confinado a la población de células ependimarias. Sólo las células ependimarias son multipotentes y generan progenie que se autorenewa. Los astrocitos generan muy poca progenie *in vitro* que no resisten varios pasajes *in vitro*. Basados en datos de Barnabé-Heider y col., 2010.

Respuesta a una lesión espinal en mamíferos adultos

La médula espinal, que junto con el cerebro forman el SNC, es un cordón nervioso que se extiende desde el tronco encefálico hasta la región lumbar, protegida por la columna vertebral. Es responsable de la transmisión de señales entre el cerebro y el cuerpo y está organizada segmentalmente. Cada segmento espinal conecta con partes del cuerpo discretas a través de proyecciones que van por las raíces sensoriales y motoras, y a su vez las funciones sensoriales, motoras y autonómicas de cada segmento dependen crucialmente de conexiones con sitios supra-espinales para todas las acciones conscientes o voluntarias (Fig. 2). El daño de estas conexiones deja aislados a los segmentos espinales caudales al sitio de la lesión (Bradbury y McMahon, 2006). Cuando la información transportada por vías descendentes es interrumpida por una lesión, por ejemplo traumática, sus consecuencias son más o menos graves según la localización de la lesión. Por ejemplo, las lesiones que ocurren a nivel cervical provocan una pérdida o disminución de la sensibilidad y de la movilidad de las extremidades superiores e inferiores, del tronco, y de la funcionalidad de los

órganos torácicas y abdominales (cuadriplejia o tetraplejia). Lesiones cervicales altas (nivel C2) incluso pueden afectar la función respiratoria. A nivel torácico y lumbar provoca pérdida de la sensibilidad y de la movilidad de las extremidades inferiores y de parte del tronco, y también de la funcionalidad de las vísceras abdominales provocando disfunción sexual y de la vejiga (paraplejia). A nivel lumbar bajo (cola de caballo) provoca parálisis de las extremidades inferiores (Bradbury y McMahon, 2006). La mayoría de las lesiones medulares traumáticas no presentan una sección completa de la médula, sino que la lesión se produce por compresión, laceración o contusión de la médula espinal.

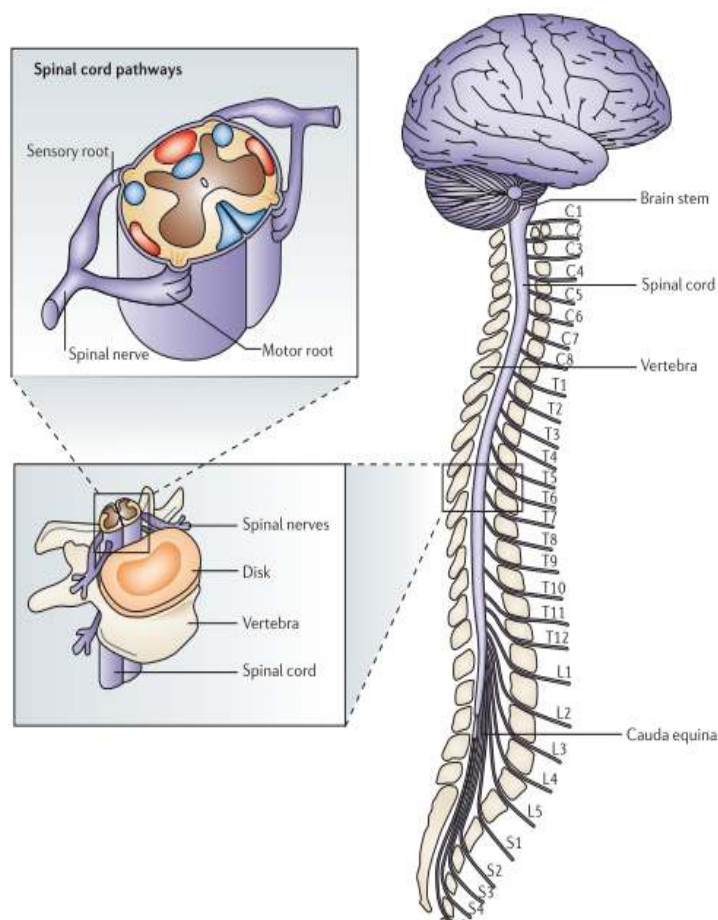


Figura 2: Estructura de la médula espinal. Los segmentos espinales están conectados con el cerebro a través de largas vías axonales que mayormente corren por la periferia de la médula. Las principales vías ascendentes (las que transmiten información sensorial al cerebro) están indicadas en rojo y las principales vías descendentes (las que transmiten información motora al cuerpo) están indicadas en azul. Una lesión en la médula espinal tiene consecuencias devastantes debida a la disrupción de estas señales que pasan entre el cerebro y el cuerpo, resultando en, esencialmente, la pérdida de sensación y control funcional por debajo del nivel de la injuria. Por lo tanto, cuanto más cervical es la injuria, más severos los efectos (Bradbury y McMahon, 2006).

Además del daño inicial en el tejido medular, se produce una degeneración postraumática de la médula, que en gran medida es consecuencia de un proceso secundario a la lesión, en el que intervienen múltiples factores: estrés oxidativo por síntesis excesiva de óxido nítrico; activación de la microglía; inflamación local; microcirculación alterada; disfunción de la barrera hematoencefálica; y, según se ha descubierto recientemente, un mecanismo de muerte celular

diferida. Todo ello sucede durante los primeros minutos, horas, días o incluso meses después del trauma inicial.

Experimentalmente, diferentes paradigmas de injuria han sido utilizados ya sea para remover selectivamente poblaciones neuronales específicas (a través de la inyección de toxinas) o para remover no selectivamente muchas capas celulares (injuria mecánica) (Endo y col., 2007; Molowny y col., 1995). El daño físico podría ser el criterio más demandante y más variable, muchas veces requiere que el tejido provea respuestas adicionales para finalmente lograr la regeneración (Tanaka y Ferretti, 2009). Una lesión en la médula espinal resulta en una pérdida significativa de células (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos principalmente), en la disrupción de circuitos espinales y en impedimentos funcionales crónicos. El proceso de cicatrización requiere de células madres que migren y restablezcan los contactos celulares, que se auto-renueven y que se diferencien, formando la diversidad requerida para que neuronas y glías se integren en el tejido, reemplazando elementos celulares en la estructura dañada. En este proceso, una estrategia podría ser la recapitulación de los pasos llevados a cabo durante el desarrollo embrionario temprano en el establecimiento del SNC en primer lugar (Tanaka y Ferretti, 2009).

El CC como nicho de células madre

Las células que rodean el CC de la médula espinal derivan de la zona ventral del tubo neural del embrión (Fu y col., 2003) y parecen haber preservado propiedades fundamentales de los progenitores presentes en el desarrollo embrionario y en los nichos de células madres del cerebro adulto (Hugnot y Franzen, 2011). Estas células podrían haber retenido parte de los programas necesarios para reconstruir la médula espinal luego de una lesión (Russo y col., 2008). Las extraordinarias capacidades regenerativas de la tortuga *Trachemys dorbignyi* se deben a que las células que rodean el canal CC de la médula espinal, tienen la capacidad de proliferar y generar nuevas neuronas y glías (Fernández y col., 2002; Russo y col., 2008).

Desafortunadamente, la reacción normal frente a una lesión en la médula espinal de los mamíferos no es adecuada para reparar los circuitos espinales, sin embargo algunas células endoteliales del CC todavía pueden reaccionar frente a una lesión incrementando su proliferación y migrando hacia el sitio de injuria (Johansson y col., 1999). Allí se diferencian dando lugar principalmente a astrocitos que contribuyen a la formación de la cicatriz, y a algunos oligodendrocitos capaces de remielinizar axones (Barnabé-Heider y col., 2010; Meletis y col., 2008) (Fig. 3). El proceso de remielinización es fundamental ya que la desmielinización axonal resulta en un mal funcionamiento neuronal y, con el tiempo, en la degeneración de la neurona si el axón no es remielinizado (Göriz y Frisén, 2012). El problema es que aunque los axones dañados podrían tener la habilidad de regenerarse, no pueden cruzar la zona de la lesión por el desfavorable ambiente molecular generado por los astrocitos reactivos residentes y otras células gliales que forman la cicatriz (Rolls y col., 2009; Sabelström y col., 2013; Yiu y He, 2006).

Los astrocitos derivados de las células madres neurales del epéndimo son diferentes a los astrocitos reactivos residentes derivados de los preexistentes en el sitio de la lesión. Los primeros resultan en un mayor beneficio, ya que no generan la inhibición del crecimiento axonal y además producen factores de crecimiento que podrían ayudar a la supervivencia de las neuronas y de los oligodendrocitos alrededor de la lesión (Sabelström y col., 2013). La cicatrización por los astrocitos derivados de células endoteliales también es requerida para restringir el aumento secundario de la lesión y por lo tanto, disminuir la pérdida axonal que sucede luego de ella (Sabelström y col., 2013). Por otra parte, las células derivadas del epéndimo parecen restringir la infiltración de células inflamatorias del sistema inmune (Sabelström y col., 2013). La cicatriz glial está normalmente compartimentalizada, con los astrocitos residentes formando la periferia y los astrocitos derivados de células endoteliales formando la parte central de la cicatriz (Barnabé-Heider y col., 2010) (Fig. 3). Podemos decir entonces, que los astrocitos y las células endoteliales generan el mayor número de células luego de una lesión espinal, convirtiéndose en las poblaciones proliferativas dominantes. Sin embargo, sólo las células endoteliales se auto renuevan y generan progenie de múltiples destinos (multipotencialidad) por eso

se podría asignar a esta población celular el papel de células madres en la médula espinal intacta y lesionada (Barnabé-Heider y col., 2010) (Fig. 3).

Además de las células endimarias mencionadas, existen otras células que contactan el CC que tienen características moleculares y funcionales similares a neuronas inmaduras en nichos neurogénicos adultos. Por este motivo, se propone que el CC de la médula espinal de roedores podría también ser un reservorio de neuronas inmaduras en “pausa”, las cuales bajo ciertas circunstancias (por ejemplo, una lesión) podrían migrar y continuar su diferenciación para incorporarse a los circuitos espinales dañados (Marichal y col., 2009). Podemos decir entonces, que a pesar de que los mamíferos perdieron la capacidad regenerativa de su SNC en general, la médula espinal todavía mantiene cierta plasticidad y potencial regenerativo, y podría reaccionar frente a una lesión con una limitada reparación endógena (Meletis y col., 2008).

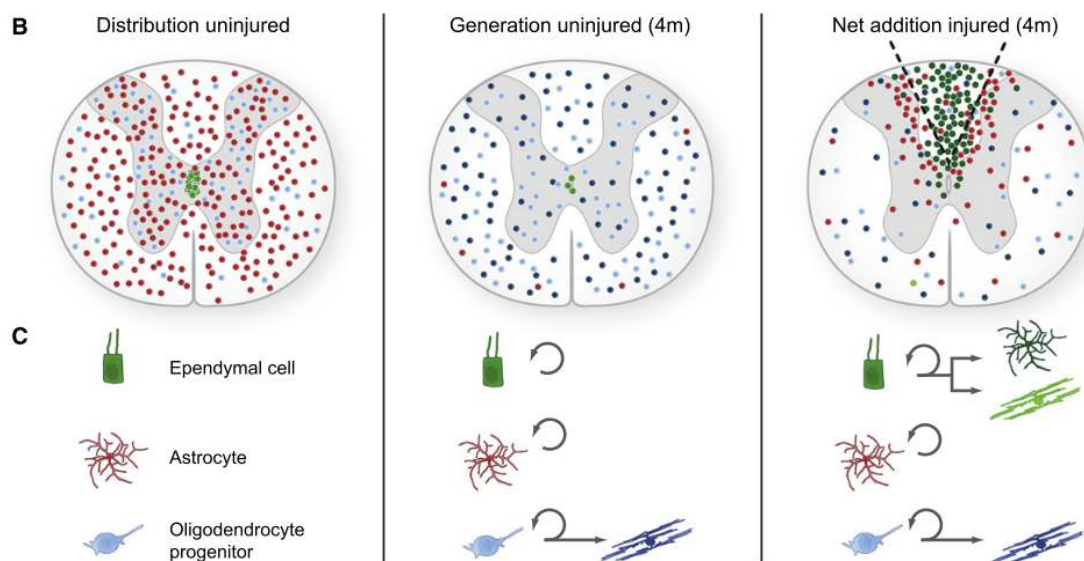


Figura 3: Contribución relativa de las células endimarias, los astrocitos, y los progenitores de oligodendrocitos a nuevas células gliales en la médula espinal adulta. B: Distribución de células endimarias (verde), astrocitos (rojo), y progenitores de oligodendrocitos (azul) y su progenie son mostrados al 50% de su número estimado. Notar que el panel a la derecha muestra la adición neta de nuevas células luego de una lesión, y que la adición de los paneles a la izquierda y a la derecha dan una imagen completa de todas las células presentes luego de la lesión. **C:** Representación esquemática del destino de las células endimarias proliferativas, los astrocitos y los progenitores de oligodendrocitos en la médula espinal intacta y lesionada. Editado de Barnabé-Heider y col. (2010)

Células progenitoras del SNC

Los primeros progenitores neurales en el desarrollo embrionario son células neuroepiteliales que al comienzo de la neurogénesis se convierten en glías radiales (GR), las fundadoras de la mayoría de los linajes neurogénicos durante el desarrollo del SNC. Tanto las células neuroepiteliales como las GR tienen una pronunciada polaridad con un polo apical que posee un cilio único primario que sobresale hacia la luz ventricular y un proceso distal en contacto con la pía (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Esta polaridad es crítica para determinar y regular el fenotipo de las células madre neurales (Alvarez-Buylla y col., 2001; Pinto y Götz, 2007). Las glías radiales tienen un fenotipo molecular y funcional característico, y expresan proteínas celulares específicas (Hartfuss y col., 2001; Noctor y col., 2002). Los registros electrofisiológicos mostraron que tienen baja resistencia de entrada (R_{IN}) y que no tienen conductancias voltaje-dependientes, consistente con un tipo celular precursor. En cambio, los neuroblastos muestran R_{IN} más altas y conductancias voltaje-dependientes, consistentes con una identidad neuronal inmadura (Alvarez-Buylla y col., 2001).

Durante el desarrollo de la médula espinal, los progenitores en el tubo neural se organizan en dominios que generan tipos celulares específicos (Briscoe y col., 2000; Jessell, 2000). Las células en el dominio lateral combinan rasgos morfológicos y moleculares de endimocitos y GR y están eléctricamente acopladas vía conexina 43 (Cx43) (Marichal y col., 2012). Las células alineadas en los polos ventral y dorsal expresan marcadores de células madre neurales y tienen morfología de GR con finos procesos que del mismo modo, se extienden desde el lumen del CC hasta la pía (Marichal y col., 2012; Petit y col., 2011). Estas células parecen desacopladas y despliegan fenotipos electrofisiológicos complejos (Marichal y col., 2012).

Las células progenitoras en general son células morfológica y molecularmente heterogéneas, siendo el potencial linaje determinado por las diferentes moléculas que expresan (Pinto y Götz, 2007). Además de esta señalización molecular compleja, los progenitores tienen propiedades funcionales que regulan su comportamiento. Por ejemplo, los progenitores neurales expresan varios

canales de K⁺ voltaje-dependientes (Noctor y col., 2002), cuya actividad parece ser particularmente importante en la regulación de la proliferación (Schaarschmidt y col., 2009). Estas conductancias de membrana podrían también ser importantes en la diferenciación neuronal (Shi y col., 2007). La expresión de canales iónicos y sus propiedades fisiológicas son moduladas durante la diferenciación celular (Ribera, 1999; Spitzer y col., 2000) y a su vez, éstos están involucrados también en la regulación de esta diferenciación celular (Ben-Ari, 2002). Otro rasgo de los precursores es su acople funcional vía uniones tipo “gap” o “en hendidura” (Bittman y col., 1997; Noctor y col., 2002) lo cual parece crítico para el mantenimiento de su fenotipo y su capacidad de proliferar (Bruzzone y Dermietzel, 2006).

A pesar de que hay muchos trabajos que muestran que el CC contiene células progenitoras, y que se comporta como un nicho latente de células madre que pueden activarse en respuesta a una lesión (Göritz y Frisén, 2012), la complejidad funcional y la organización de este nicho en mamíferos se entiende sólo parcialmente, con la mayoría de los estudios realizados en roedores neonatales o juveniles y no en adultos. Entender la biología de los progenitores espinales con el potencial de generar nuevas neuronas y glías “in situ” es fundamental para el diseño de terapias de reposición celular (Russo y col., 2008). Las células gliales colaboran con la función neuronal en muchos sentidos. Se ha sugerido que la recuperación funcional está mediada por la diferenciación glial, más que por la de las neuronas (Göritz y Frisén, 2012). La reparación funcional luego de una LME requeriría el remplazo de las células perdidas, el crecimiento y navegación de los axones regenerantes en una matriz permisiva y la remielinización axonal para la conducción eficiente de los impulsos nerviosos. Una estrategia prometedora para lograrlo sería la manipulación de las células progenitoras endógenas del CC. Para implementar este tipo de terapias es necesario primero conocer las propiedades funcionales de los progenitores en mamíferos adultos antes y luego de una lesión y determinar los mecanismos funcionales y moleculares que regulan la proliferación, migración y diferenciación de los progenitores espinales (Horner y Gage, 2000; Rossignol y col., 2007; Thuret y col., 2006). En este trabajo nos propusimos contribuir a una mejor

comprensión de la biología de los progenitores que yacen en el CC de ratones adultos y evaluar cómo cambian estas propiedades luego de una lesión.

Objetivos:

Objetivo general:

En este trabajo, se pretende contribuir al conocimiento de las propiedades electrofisiológicas y morfológicas de las células progenitoras en el CC de la médula espinal de ratones adultos sanos y lesionados.

Objetivos específicos:

- 1) Evaluar las propiedades electrofisiológicas de las células endimarias del CC haciendo registros de “*patch-clamp*” en modo “*whole-cell*” en rodajas de médula espinal de ratones adultos.
- 2) Estudiar el acoplamiento funcional de las células registradas.
- 3) Comparar dichas características entre la condición control y a los 5 días de una lesión espinal.

Materiales y Métodos:

Disección de la médula espinal

Se utilizaron ratones transgénicos de la cepa FoxJ1CreER-R26RtdTomato adultos ($P > 90$) para facilitar la visualización e identificación de las células endimarias. En la médula espinal adulta el promotor FoxJ1 se expresa específicamente en células endimarias (ciliadas) y es usado como un marcador específico de estas células. Para inducir la recombinación y la expresión selectiva del gen reportero tdTomato mediante dicho promotor, los ratones fueron inyectados con tamoxifeno (2 mg, 20 mg/ml en aceite de maíz) por 5 días consecutivos (Meletis y col., 2008). Se dejaron pasar 5 días luego de la última inyección de tamoxifeno para asegurar su depuración antes de los experimentos (Fig. 4).

Los ratones fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y se manipularon siguiendo los protocolos experimentales establecidos por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA, protocolo #006-5-2017). Se tomaron todas las precauciones necesarias para minimizar el estrés y el número de animales utilizados.

- Ratones control:

Cada animal utilizado fue anestesiado (ketamina 100 mg/kg y xilacina 10 mg/kg) y luego sacrificado por decapitación. Posteriormente se aisló la región torácica de la columna vertebral y se expuso mediante una laminectomía la médula espinal. Luego de liberar la médula y de extraerle las raíces restantes y la piamadre, se obtuvieron rodajas transversales de 300µm de espesor mediante el uso de un micrótopo vibratorio (HM 650 V, Microm International GmbH).

Debido a la fragilidad del tejido adulto, utilizamos un Ringer protector para la disección y el corte de rodajas (Tabla 1- Ringer disección), el cual está suplementado, entre otros, con HEPES, tiourea y ascorbato, los cuales parecen

ser componentes críticos para reducir el edema y el daño oxidativo en las rodajas (Brahma y col., 2000; MacGregor y col., 2001). Durante todo el proceso de disección y obtención de rodajas, el tejido se mantuvo frío (4°C) para disminuir la actividad metabólica al mínimo.

Para su recuperación, las rodajas obtenidas primero pasaron por el mismo “Ringer de disección”, pero a una mayor temperatura (32-34°C) por ≤10-15 minutos. Este brusco cambio de temperatura determinaría el desprendimiento de las células en vías de muerte o dañadas durante la sección de las rodajas, lo cual mejora la superficie y provee una mejor visualización de las células. Dicho Ringer contiene N-metil-D-glucamina (NMDG) como sustituto del Na⁺, lo cual reduce la actividad neuronal de forma considerable, reduciendo la excitotoxicidad y mejorando la viabilidad de la rodaja para los posteriores registros electrofisiológicos (Zhao y col., 2011). Posteriormente, las rodajas se transfirieron a otra solución de Ringer (Tabla 1-Ringer reposo) a temperatura ambiente (22–25°C), donde reposaron por 1 hora previo a los registros electrofisiológicos. Dicha solución fue suplementada también con tiourea, ascorbato y piruvato para mejorar el estado y la longevidad de las rodajas. Todas las soluciones utilizadas se saturaron con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) durante todo el proceso para mantener un pH de 7.3-7.4 mediante el sistema principal de amortiguación bicarbonato-ácido carbónico según la ecuación de Henderson-Hasselbalch ($\text{pH} = \text{pK} + \log \left(\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} \right)$). La duración del período de recuperación parece ser crítica para lograr el óptimo balance entre la preservación morfológica y funcional de las rodajas, la viabilidad de las rodajas durante los experimentos fue de al menos 6 hs.

Ringers	NMDG	KCL	NaH ₂ PO ₄	NaHCO ₃	HEPES	Glucosa	Thiourea	Na- Ascorbato	Na- piruvato	NaCl	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂ 4H ₂ O	MgSO ₄ 7H ₂ O
<u>Disección</u> [] mM	92	2,5	1,25	30	20	25	2	5	3	-	-	0,5	10
<u>Reposo</u> [] mM	-	2,5	1,25	26	-	12,5	2	5	3	119	-	2	2
<u>Registro</u> [] mM	-	2,4	-	26	1,25	10	-	-	-	124	1,2	2,4	1,3

Tabla 1: Composición de las soluciones de Ringer utilizadas en los experimentos (Zhao y col., 2011)

- Ratones lesionados:

Algunos ratones se utilizaron para hacer registros 5 días post-lesión (5DPL). La LME en la región dorsal fue realizada como lo describió Frisén y col., (1993) al menos 5 días después de a la última inyección de tamoxifeno (Fig. 4). Para ello se anestesió el animal (ver arriba) y luego de exponer la región torácica de la columna vertebral se realizó una pequeña laminectomía (nivel T13) luego de la cual se realizó una hemisección dorsal de la médula espinal (0.8mm de profundidad). La lesión fue extendida longitudinalmente con tijeras de microcirugía para abarcar alrededor de un segmento. Una vez lesionada la médula, suturamos los planos y la piel. Al recuperarse de la anestesia (promovido con flumazenil (0.5 mg/kg) y yohimbina (2 mg/kg), los animales muestran paraplejia con distintos grados de compromiso funcional. Para el alivio del dolor, a los animales se le inyectó intraperitonealmente tramadol (3 mg/kg) luego de la recuperación de la anestesia y a las 24hs luego de la cirugía. Luego de 5 días de realizada la lesión se siguió el mismo protocolo que el descrito previamente para la obtención de rodajas de la zona torácica de la médula espinal sana para obtener las rodajas de la región adyacente (1.2 mm a cada lado) al epicentro de la lesión. Se utilizaron las mismas soluciones de Ringer descritas anteriormente.

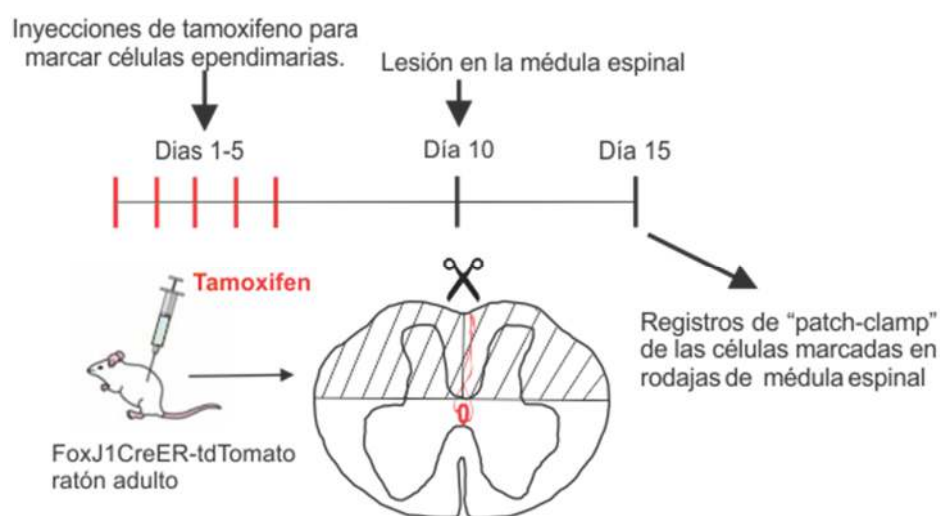


Figura 4: Diseño experimental para estudiar las propiedades de las células endoteliales luego de una lesión espinal.

Registros electrofisiológicos

Luego del período de recuperación y reposo (>1h), las rodajas se colocaron una a la vez en una cámara de registro (1mL de volumen) con una solución de Ringer a temperatura ambiente (22-25°C), que simula el medio extracelular (Tabla 1- Ringer de registro). Dicho Ringer se circuló con flujo constante (1mL/min) mediante una bomba peristáltica y al igual que en la disección, fue barbotado con 95% O₂ y 5% CO₂ (Fig. 5). Las células se visualizaron *in vitro* con un microscopio Leica DM LFS (Leica, Wetzlar, Germany) equipado con contraste de interferencia diferencial (DIC) con un objetivo de inmersión al agua 40X (0.8 de apertura numérica).

Se realizaron registros de “*patch-clamp*” del tipo “*whole-cell*” en células del CC, utilizando micropipetas de vidrio de borosilicato (5-10 MΩ de resistencia) obtenidas en un “*puller*” horizontal (P-87, Sutter Instruments). Se utilizó una solución de “*patch*” con biocitina (Tabla 2) para llenar las pipetas, con el fluoróforo Alexa 488 o 546 hidrazida (500μM).

Sol. de Patch	Biocitina	K-gluconato	Na ₂ -ATP	MgCl ₂	CaCl ₂	Mg-gluconato	K-HEPES	H-HEPES	EGTA
[] mM	10	122	5	2,5	0,003	5,6	5	5	2

Tabla 2: Composición de la solución de “Patch” utilizada en los registros.

Para la obtención de los registros, el electrodo se aproximó a las células del CC bajo control visual con la ayuda de un micro-manipulador motorizado (MP 225, Sutter). Para mantener la punta libre de contaminación se aplicó una ligera presión positiva al interior de la pipeta a través del cuerpo de una jeringa conectada por un tubo al soporte del electrodo (Fig. 5). Al constatar el contacto con la membrana de la célula por la formación del “*dimpling*” o hundimiento de membrana y el aumento de la resistencia, se liberó la presión y luego se aplicó levemente presión negativa. Luego de establecido el sello (resistencia en el orden de los GΩ), se aplicaron pequeños pulsos de presión negativa para lograr

la ruptura de parche de membrana y acceder a la configuración “*whole-cell*” (Fig. 6).

Las células se estudiaron bajo condiciones de fijación de voltaje y/o de corriente usando un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, Palo Alto, CA) y el programa pClamp10 (Molecular Devices, Palo Alto, CA) para adquirir las señales eléctricas y para el posterior análisis de las mismas (Fig. 5). En fijación de voltaje, las células fueron mantenidas a -70 mV y el potencial de membrana en reposo fue estimado a partir de la relación corriente-voltaje (en $I=0$) (Barry y Diamond, 1970). Los valores se expresaron como la media $\pm$ E.E.M. (error estándar de la media). El acceso a las células registradas fue monitoreado continuamente, y solo los registros con resistencia en serie estable se incluyeron para los análisis.

Se analizaron las distintas corrientes iónicas que presentaron las células y los tipos de canales que podrían haberlas generado. Para evaluar esto, en algunos experimentos se utilizaron drogas o sustituciones iónicas en el “Ringer de registro” (Tabla 1) para bloquear las corrientes entrantes o salientes. Las drogas fueron: tetrodotoxina (TTX, $2 \mu\text{M}$; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) para bloquear canales de Na^+ , tetraetilamonio (TEA, 10 mM ; Sigma-Aldrich) que a esa concentración bloquea canales de K^+ de tipo I_{KD} , 4-aminopiridina (4-AP, $1\text{--}2 \text{ mM}$; Sigma-Aldrich) que bloquea corrientes de K^+ de tipo A. Como se sabe que las células progenitoras podrían estar unidas a través de uniones gap, también se utilizó carbenoxolona (Cbx $100\mu\text{M}$; Sigma-Aldrich, MO) que funciona como bloqueante inespecífico para este tipo de uniones.

Además, se analizaron los valores de los potenciales de membrana (PM) de las células registradas, así como la resistencia de entrada (R_{IN}), la capacitancia de la membrana (C_{m}) y la resistencia de acceso (R_{a}).

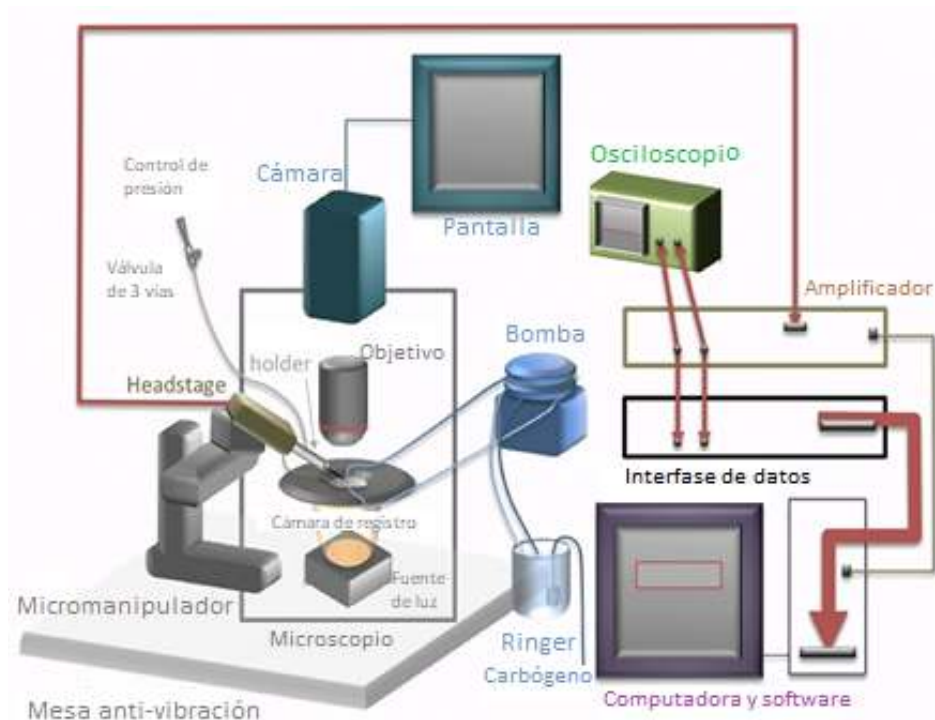


Figura 5: “Set up” para registros de “patch-clamp whole-cell”. Esquema ilustrativo del set up donde se realizaron los registros electrofisiológicos. Las flechas rojas muestran la dirección de la señal eléctrica registrada (editado de: protocolo de whole-cell-patch-clamp disponible en Axol Bioscience).

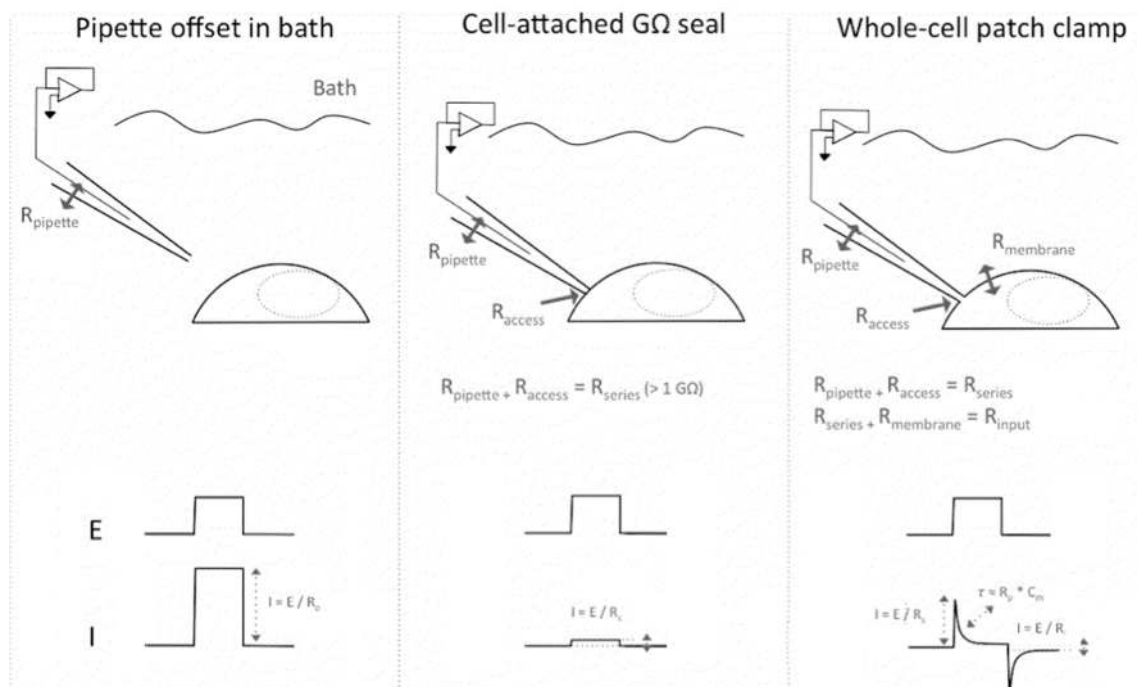


Figura 6: Los 3 pasos principales en los procedimientos de “patch-clamp whole-cell”. 1) cuando se establece el “offset” de la pipeta en el baño (Ringer) antes de alcanzar la célula a registrar. 2) Cuando la pipeta entra en contacto con la membrana de la célula “cell-attached” y se logra el sello gigaohmico. 3) cuando se rompe el parche de membrana dentro de la pipeta y se logra el acceso al interior celular “whole-cell”. Se muestra en los 3 casos la lectura del osciloscopio, donde E es el voltaje e I la corriente. Frente a un mismo pulso de voltaje la amplitud de la respuesta va a depender de la resistencia de la pipeta según la ley de ohm ($I=E/R$). (tomado de: protocolo de whole-cell-patch-clamp disponible en Axol Bioscience).

Identificación morfológica de las células registradas

Durante los registros de “*patch-clamp*” en modo “*whole-cell*”, las células registradas fueron teñidas con el fluoróforo Alexa 488 o 546 hidrazida (500 μ M) y se visualizaron *in vitro* con una fuente de epifluorescencia (Leica EL 6000). También se llenaron con biocitina (10 mM) para facilitar el posterior estudio morfológico de la/s célula/s marcadas al revelarla con estreptavidina conjugada con un fluoróforo (Fig. 7). Las imágenes fueron adquiridas a través del programa Imaging Workbench (INDEC BioSystems) y el posterior análisis de las imágenes se realizó con el programa Fiji (ImageJ).

Luego de los registros, las rodajas se fijaron por inmersión en paraformaldehído (PFA 4%) en buffer fosfato (PB 0.1M) por 12-24 h y se guardaron a 4°C hasta el momento de su revelado. Para el revelado de la biocitina, luego de los lavados con PB, las rodajas se incubaron en una solución 1/400 del complejo estreptavidina-fluoróforo (estreptavidina-Alexa 488 o 546) en PB-Tritón-X100 0.3% por 2 h. En la mayoría de los casos las rodajas se incubaron posteriormente con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) por 10 min, para el marcado nuclear de las células con el fin de estimar el número aproximado de células marcadas.

Las rodajas se montaron en glicerina para examinarlas con microscopía confocal (Olympus FV 300 y/o Zeiss Airyscan LSM800) utilizando los láseres correspondientes para visualizar el canal central (tdTomato), la/s células registradas (488 o 546) y el DAPI (azul-405). Se realizaron apilados de secciones confocales en el eje z (z-stacks) del CC (con objetivo 40X o 63X de inmersión) para luego calcular el volumen de las células acopladas. Utilizando el programa Fiji (NIH) se realizaron reconstrucciones 3D de los z-stacks de imágenes en las cuales se midió el área teñida en cada plano transversal (x,y) seleccionando una región de interés (ROI), y luego multiplicándolo por la profundidad en el eje rostro-caudal (z). De esta manera se puede realizar el cálculo del volumen aproximado de los clusters (en μm^3).

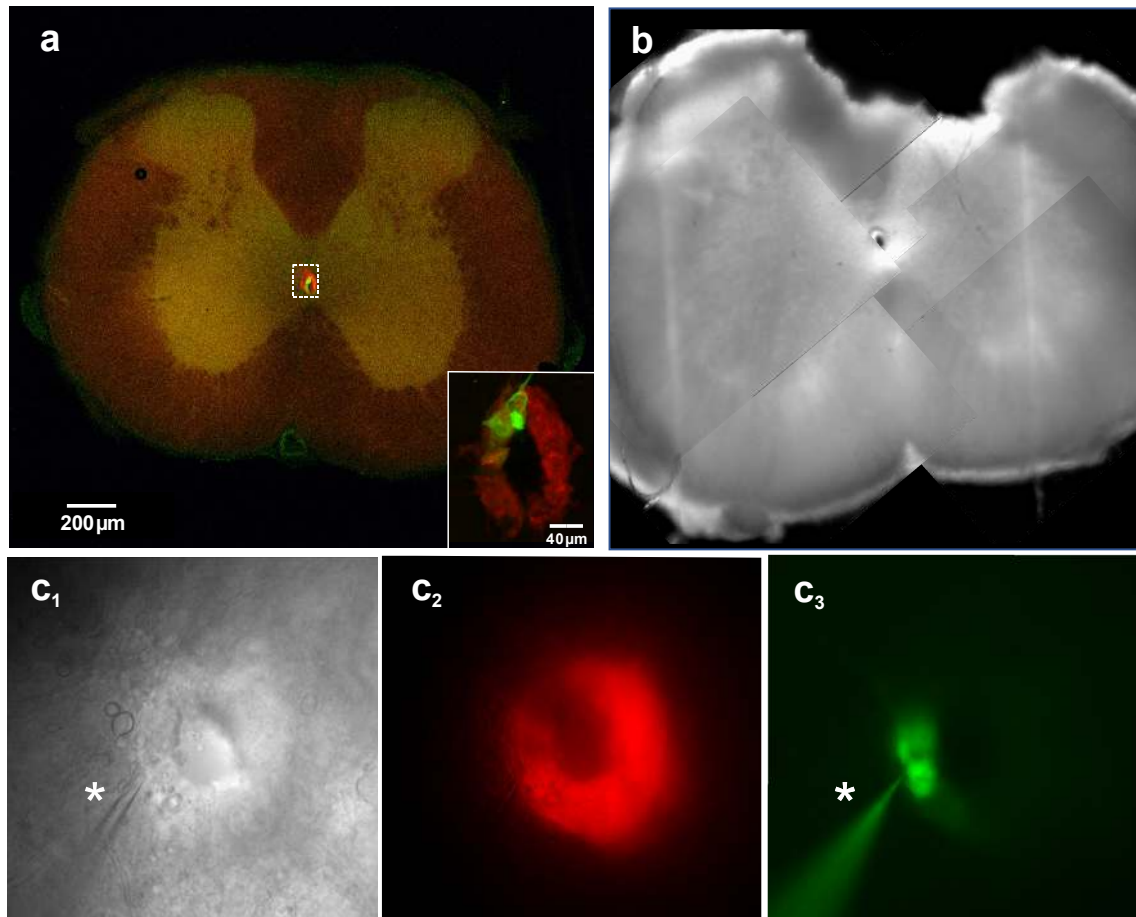


Figura 7: Visualización en microscopía confocal (a) e in vitro (b, c) de la rodaja y del CC de la médula espinal.
a: Rodaja de médula espinal sana visualizada en toda su extensión (4X), inset: CC marcado en rojo Td-tomato y cluster latero-dorsal de células marcado en verde por revelado de biocitina con Streptavidina-Alexa 488 (60X).
b: Rodaja lesionada dorsalmente observada con DIC (4X). **c:** CC con pipeta registrando (*) observado A 40X con contraste de interferencia diferencial (DIC) (**1**) y con una fuente de epifluorescencia para ver el rojo Td-tomato del CC activado (**2**) y la pipeta con la/s célula/s registradas, llenadas con fluoróforo Alexa 488 hidrazida (**3**).

Resultados:

Propiedades electrofisiológicas encontradas en las células del CC

Ha sido reportado en distintos modelos animales, tanto en el desarrollo como en nichos neurogénicos del cerebro adulto, que las células precursoras tienen propiedades pasivas de membrana (Hartfuss y col., 2001; Noctor y col., 2002; Lledo y col., 2006). Para averiguar qué propiedades funcionales presentan las células en diferentes regiones del epéndimo de la médula espinal de ratones adultos, realizamos registros de “*patch-clamp*” en modo “*whole-cell*”. Los registros de células endoteliales mostraron, en general, una muy baja resistencia de entrada ($n=15$ con $R_{IN} < 100 \text{ M}\Omega$, Fig. 8 a), y potenciales de membrana en reposo (PM) generalmente hiperpolarizados ($n=11$ con $PM \geq 70 \text{ mV}$, Fig. 8 b). Como se muestra en la figura 8, muchas de las células registradas en los cuadrantes laterales del CC también presentaron un comportamiento pasivo ($n=15$, Fig. 8 c₁) en fijación de voltaje (VC). Dentro de estas células encontramos que la mayoría, tenían una relación corriente-voltaje lineal (Fig. 8 c₂). En el caso de los ratones lesionados de 5 días, al igual que en los sanos, encontramos mayoría de células pasivas ($n=11$) con relación corriente-voltaje lineal, con R_{IN} bajas ($n=8$ con $R_{IN} < 100 \text{ M}\Omega$) y con PM hiperpolarizados ($n=5$ con $PM \geq 70 \text{ mV}$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de estos caracteres, entre la condición control y la lesión, los resultados se esquematizan en la tabla 3.

Durante el desarrollo y en nichos neurogénicos adultos, también hay algunos precursores que poseen corrientes salientes activadas por voltaje (Liu y col., 2006; Bahrey y Moody, 2003) Debido a que estas pequeñas corrientes dependientes del voltaje pueden ser enmascaradas por las grandes corrientes de pérdida (leak) presentes en las células acopladas, utilizamos un protocolo de sustracción de las corrientes de pérdida. En las figuras se muestran los registros con las corrientes de pérdida sustraídas (arriba) y las totales (medio) en

respuesta a pulsos de voltaje despolarizantes e hiperpolarizantes a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV (abajo). La sustracción de las corrientes de pérdida reveló que en el CC también hay células de tipo precursor que generaron corrientes salientes en respuesta a pulsos de voltaje despolarizantes (Fig. 8 d y e). Nuevamente, no se encontraron diferencias significativas en este tipo de corriente entre ambos casos ($n= 8$ en ratones normal y $n= 6$ en lesionados, tabla 3).

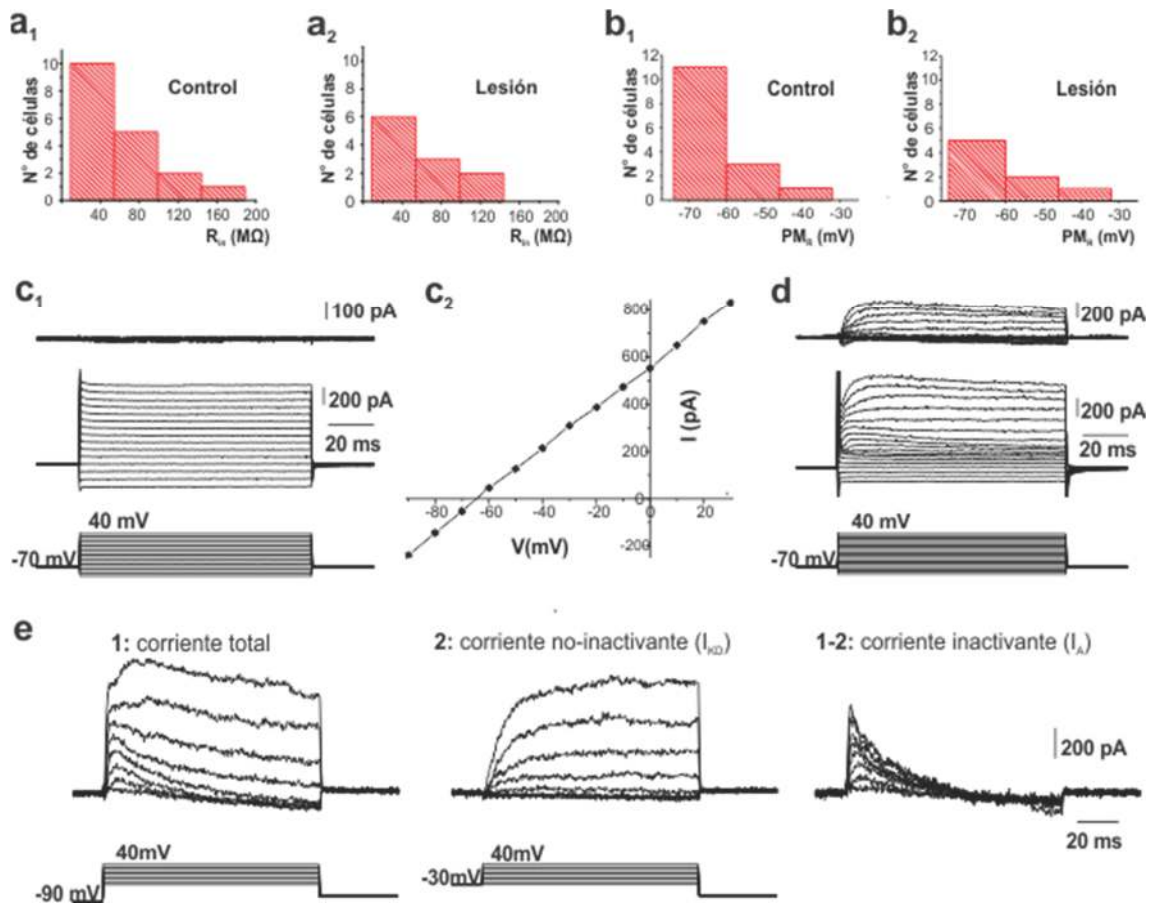


Figura 8: Heterogeneidad electrofisiológica de los precursores del CC. **a y b:** Histogramas de frecuencias de las R_{IN} (**a**) y de los PM_R (**b**) de las células endimarias en condición control (**1**) y a los 5DPL (**2**). **c-e:** Los registros en fijación de voltaje (VC) de las células endimarias se muestran con las corrientes de pérdida sustraídas (trazo superior) y con las corrientes totales (trazo medio) en respuesta a pulsos de voltaje (trazo inferior). **c**, los registros en los laterales del CC en la mayoría de los casos fueron de células pasivas (con corrientes de fuga), sin corrientes activadas por voltaje (**1**), en general estas células presentaron una relación I-V lineal (**2**). **d:** También se registró una subpoblación de células con corrientes salientes activadas por voltaje. **e:** Ejemplo de corriente saliente de K^+ voltaje-dependiente tanto no-inactivante (I_{KD}) como inactivante (I_A) en una célula endimaria.

También evaluamos la dependencia de voltaje de las corrientes salientes de potasio dependientes de voltaje (K_v) utilizando tanto protocolos de activación como de inactivación de las mismas (Fig. 8 e).

En la figura 8 e los pulsos de voltaje despolarizantes a partir de un PM de -90 mV provocaron una corriente saliente tipo I_{KD} , que presenta un componente que se inactiva al principio de la respuesta, el cual podría reflejar la presencia de una corriente de K^+ de tipo A (I_A) **(1)**. Aplicando un protocolo de inactivación previa por pulsos despolarizantes (el mismo protocolo de pulsos de voltaje, pero desde potenciales de mantenimiento despolarizados (-30 mV **(2)**), se pudo probar la hipótesis de que la corriente con inactivación es de la familia de las de tipo I_A por su característica dependencia con el voltaje (Connor y Stevens, 1971; Schaarschmidt y col., 2009). Al sustraer la I_{KD} de la corriente total **(1-2)** se observa una corriente saliente con una rápida activación e inactivación (I_A).

Encontramos también en algunos casos, células con corrientes entrantes rápidas ($n=3$) que en algún caso pudimos bloquear farmacológicamente mediante el uso de la droga TTX (2 μ M) (Fig. 9 c), confirmando que se trataba de una corriente entrante de Na^+ , pero lo tomamos como un caso excepcional. Otras células con corrientes salientes tipo I_{KD} fueron bloqueables por TEA incluso en presencia de Cbx (Fig. 9 b), aunque la Cbx también puede bloquear otros canales de K^+ y de Ca^{2+} dependientes del voltaje (Rouach y col., 2003). Concluyendo, el hecho de observar células con distintas propiedades de membrana, sugieren que las células que forman el CC, son heterogéneas desde el punto de vista de sus propiedades eléctricas. Estos datos sugieren que las células precursoras son un grupo heterogéneo integrado por diferentes fenotipos electrofisiológicos (tabla 3).

Condición:	CONTROL		LESIÓN	
Células:	Aisladas (n=33)	Acopladas (n=10)	Aisladas (n=12)	Acopladas (n=24)
PMr (mV)	-67.2 $\pm$ 7.4	-67.8 $\pm$ 5.5	-74 $\pm$ 5.7	-65.8 $\pm$ 8.1
R_{IN} (M Ω)	104.7 $\pm$ 93.3	84.6 $\pm$ 83.8	58 $\pm$ 2.8	54.5 $\pm$ 44.4
Pasivas	10	5	2	9
I_{KD}	3	3	1	4
I_A	1	1	-	1
I_A+I_{KD}	2	-	-	-

Tabla 3: Propiedades electrofisiológicas de las células endimarias del CC de ratones adultos

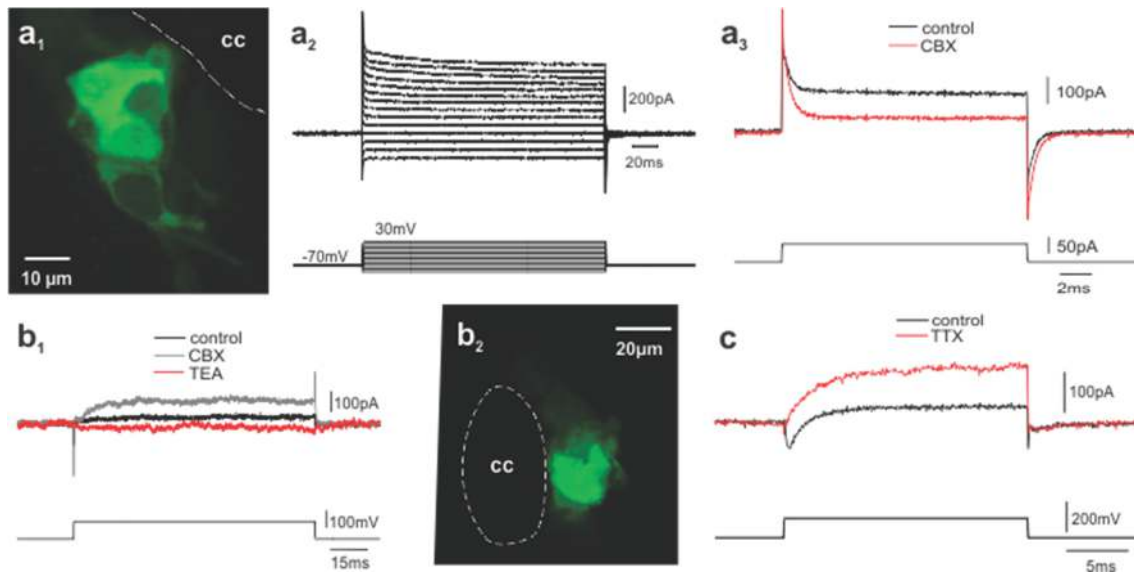


Figura 9: Respuesta de corrientes iónicas a distintas drogas. a1: Cluster del CC latero-ventral teñido con biocitina en rodaja de médula espinal sana. **a2:** Corriente registrada en dicho cluster, inducida por una serie de pulsos de voltaje (-100 a 30mV a partir de un potencial de -70mV). **a3:** La Cbx (100µM) aumentó la resistencia de entrada (R_{IN}) en la célula registrada de 240-640MΩ. **b1:** Registro en donde la Cbx (100µM) desenmascaró una corriente tipo I_{KD} respecto al control, que luego fue bloqueada completamente con TEA (10mM). **b2:** Cluster de células acopladas a la registrada en rodaja de médula lesionada. **c:** registro en un cluster de rodaja sana, en el que el TTX (2 µM) bloqueó la corriente entrante rápida, revelando que se trataba de una corriente de Na^+ , y además provocó un aumento de la I_{KD} .

Acoplamiento funcional entre células endimarias

El uso de la técnica de “*patch clamp*” permitió ver que algunas células registradas pertenecían a clusters de endimocitos acoplados, evidenciados por la difusión del colorante, alineados sobre todo en las regiones laterales del CC (Fig. 10). En la región de los polos las células registradas fueron mayoritariamente células únicas (no mostrado). La baja resistencia de entrada, el acople evidenciado por el colorante y los antecedentes en ratas neonatales (Marichal y col., 2012) sugieren que el acoplamiento sería a través de uniones gap. Para evaluar esta posibilidad, se adicionó al medio la carbenoxolona (Cbx 100µM), un bloqueador inespecífico de uniones gap. Se observó que, en la mayoría de los casos ($n=4$), la droga generó un incremento significativo en la R_{IN} de la célula registrada (Fig. 9 a). El aumento de la R_{IN} se produjo sin cambios significativos de la resistencia de acceso (R_a).

Aunque el fluoróforo Alexa 488, 350 o 546 permitió la visualización de la célula registrada y sus vecinas acopladas in vitro, el revelado histoquímico de la biocitina inyectada intracelularmente permitió un análisis más exhaustivo de la morfología de las células únicas y de los “clusters”. Uno de los resultados más interesantes que obtuvimos por el revelado de la biocitina fue que en los registros de médula espinal sana hallamos mayoría de células únicas (33 de 43, Fig. 10 a-c). En cambio, en los registros de ratones lesionados observamos que las células registradas estaban en su mayoría acopladas (24 de 36, Fig. 10 d-f). Por lo tanto, podemos decir que el número de “clusters” se incrementa significativamente en la reacción temprana (5 días) a la lesión ($P < 0.01$, Fisher’s test, Fig. 10 g).

La extensión en el plano transversal de estos “clusters” tanto en condición control como en la lesión varió de grandes grupos de células que cubrieron todo el cuadrante lateral del CC (Fig. 10 c,e) a conglomerados de células pequeños (Fig. 10 b,f). Dado que el número de células acopladas fue difícil de calcular (incluso con el marcado nuclear del DAPI) por la íntima asociación entre las células, se calculó el volumen (área en cada plano transversal X profundidad en el eje z) de los “cluster” de células acopladas. Este índice de volumen mostró que no hubo grandes diferencias entre los tamaños de los clusters entre la condición control y 5DPL. Los clusters hallados en rodajas de animales lesionados fueron, en promedio, un poco más grandes que en las de los animales control ($6.3 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ vs. $4.6 \times 10^3 \mu\text{m}^3$), aunque no de forma significativa ($P = 0.69$ Kruskal-Wallis test, Fig. 10).

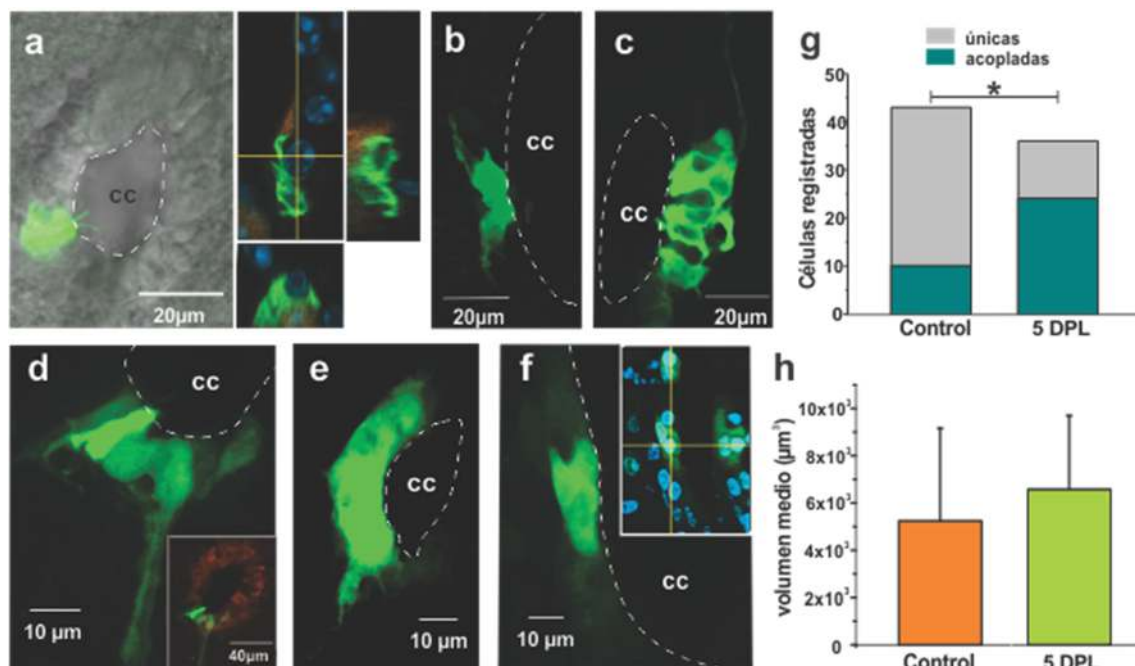


Figura 10: La LME induce un aumento del acoplamiento intercelular. Imágenes tomadas con microscopía confocal por revelado de biocitina inyectada durante los registros, tanto en rodajas control (a-c) como en lesionadas (d-f). a: Célula con 2 cilios prominentes hacia la luz del CC, del dominio lateral del epéndimo. Los planos ortogonales confirman que es una célula única que envuelve un núcleo de otra célula. Los clusters variaron desde grandes grupos de células que cubren casi toda la región lateral (c,e) hasta tamaños más pequeños de pocas células acopladas que cubre una reducida zona del epéndimo (b,f). d: Cluster latero-ventral, inset: canal activado marcado en rojo. En muchos clusters se pueden ver procesos que proyectan hacia los polos o lateralmente. g: Proporción de clusters vs. células únicas en condiciones control y a los 5DPL. La proporción de clusters aumenta 5DPL ($P < 0.01$, Fisher's test). h: Índice de volumen medio (en μm^3) de los clusters tanto en condiciones control como 5DPL.

Neuronas inmaduras alrededor del CC

Para evaluar la viabilidad del tejido obtenido luego del difícil proceso de obtención de rodajas, en una primera instancia registramos neuronas maduras alejadas del CC para confirmar que existieran células capaces de descargar potenciales de acción de forma repetida y sostenida durante un pulso de corriente de larga duración (Fig. 11 a). Esto nos permitió descartar la posibilidad de que las células del CC registradas sin propiedades activas de membrana estuvieran en malas condiciones.

Finalmente, algunas células registradas, en contacto con el CC tuvieron la capacidad de descargar potenciales de acción mediados por corrientes de Na^+ . Al igual que lo descrito en estudios previos del grupo (Russo y col., 2004; Marichal y col., 2009), este grupo puede dividirse en dos grandes

subpoblaciones: las células que dispararon uno o unos pocos potenciales de acción al principio de la respuesta a un pulso de corriente sostenido y las que descargaron repetitivamente. La diferencia más conspicua entre ambos subgrupos fue la forma del potencial de acción, con una hiperpolarización post-espiga lenta observada en las células que descargaron repetitivamente pero no en las de descarga única. Para estudiar los mecanismos responsables de esas diferencias, utilizamos la técnica de fijación de voltaje que permite hacer un análisis cuantitativo de las corrientes iónicas que subyacen a las respuestas observadas en fijación de corriente. En la figura se muestran las corrientes activas (arriba) aplicando el método de sustracción de las corrientes de pérdida (medio) en una célula de descarga única (Fig. 11 b) y en otra de descarga repetitiva (Fig. 11 c). En ambos casos los pulsos de voltaje despolarizantes produjeron una corriente entrante seguida por una corriente saliente. Sin embargo, la corriente entrante fue menor en la célula de descarga única (hasta -260 pA, Fig. 11 b₂) que en la que descargó repetitivamente (llega a -550 pA, Fig. 11 c₄).

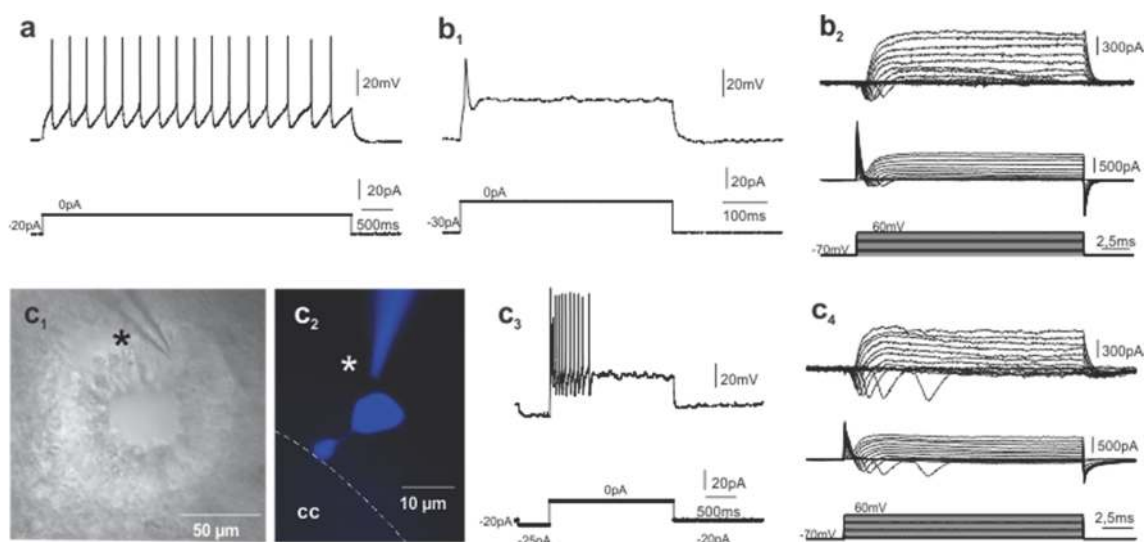


Figura 11: Viabilidad del tejido y registro de neuronas en distinto estado de maduración en contacto con el CC.

a: Descarga repetitiva de una neurona madura no perteneciente al CC como evidencia de la viabilidad de las rodajas. **b:** neurona en contacto con el CC con descarga de espiga única (**1**), el registro en fijación de voltaje (VC) evidenció una corriente entrante rápida seguida de una corriente saliente lenta en respuesta a pulsos despolarizantes (-70 a 60 mV) (**2**). **c1:** Imagen tomada con contraste de interferencia diferencial (DIC) del epéndimo de una rodaja viva con la pipeta registrando (*). **c2:** Célula registrada tipo neuroblasto en contacto con el lumen del CC teñida con el fluoróforo Alexa 350 de la pipeta (*), visualizada in vitro con epifluorescencia. **c3:** potenciales de acción disparados por la célula en fijación de corriente. **c4:** en VC también se registró una corriente entrante rápida seguida de una corriente saliente en respuesta a pulsos despolarizantes.

Conclusiones y Discusión:

Utilizando un enfoque multidisciplinario que combinó diversas técnicas electrofisiológicas y de tinción o marcado celular, logramos profundizar en el conocimiento de la funcionalidad de las células que conforman el CC de la médula espinal y de cómo responden frente a una lesión. Esto resulta importante para avanzar hacia una caracterización de estas células en ratones adultos, de las que previamente poco se sabía.

La heterogeneidad electrofisiológica encontrada en los registros además de reflejar distintos tipos celulares (ependimocitos, glías radiales, neuroblastos) puede indicar distintos estados funcionales de las células registradas, relacionados con: las diferentes fases del ciclo celular, la dinámica de maduración de las células o la potencialidad de linaje de estos precursores. Esta heterogeneidad electrofisiológica fue encontrada tanto en ratones control como en ratones lesionados, de hecho, no pudimos identificar diferencias considerables entre las corrientes halladas en ambos grupos. La predominancia de células pasivas dominadas por corrientes de fuga, con baja R_{IN} y PM_R generalmente hiperpolarizados, correspondientes al fenotipo de célula progenitora o glial, fue común en los animales control y en los lesionados. Estos resultados se pueden correlacionar con lo ya reportado en ratas neonatales (Marichal y col., 2012) y con los resultados recientes del grupo en ratones neonatales (datos inéditos). También se pudo identificar, en ambas condiciones, un subgrupo de células con corrientes de potasio salientes (tipo I_{KD} y tipo I_A).

A pesar de que las corrientes de K^+ y el acople a través de Cx43 son dos atributos funcionales comunes de los progenitores neurales, se conoce poco sobre cómo afectan las propiedades de estas células. Algunos estudios sugieren que tanto los canales de K^+ (Hendriks y col., 1999; Pardo, 2004) como las conexinas (Bruzzone y Dermietzel, 2006) pueden regular fenómenos como la proliferación y la migración celular, y eventualmente el potencial linaje de los precursores. De hecho, las corrientes tipo I_{KD} son esenciales para la transición de la fase G1 (crecimiento celular) a la S (síntesis de ADN) en los progenitores de

oligodendrocitos, y por lo tanto para su proliferación (Chittajallu y col., 2002). En células precursoras neurales humanas (hNPC) también se vio que la inhibición de la corriente tipo I_A reduce significativamente la capacidad de proliferación y la viabilidad celular, indicando un rol importante de los canales de potasio tipo A en la proliferación y la supervivencia de las células (Schaarschmidt y col., 2009). Sería interesante evaluar la potencialidad de linaje o la actividad proliferativa de las células del CC cuando se bloquea las corrientes de K^+ o el acople a través de uniones de tipo “gap”. Como ya mencioné, la separación biofísica de los dos tipos de corrientes (I_A e I_{KD}) puede ser obtenida mediante el diseño de protocolos de voltaje apropiados (Belluzzi y col., 1985; Schmidt y col., 2000). Sin embargo, debido a la diversidad de canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv) que existen, el aislamiento farmacológico adicional de los componentes de las corrientes muchas veces es requerido (Mathie y col., 1998). Los agentes clásicos para bloquear canales de Kv neuronales son el cloruro de tetraetilamonio (TEA), el cual fue descrito como más efectivo para bloquear el componente de la corriente I_{KD} (Stanfield, 1983) y la 4-aminopiridina (4-AP) el cual se usa comúnmente para inhibir la corriente tipo I_A (Rogawski y col., 1985).

La comunicación por uniones gap es un regulador del comportamiento de las células madre neurales (Elias y Kriegstein, 2008). En la corteza en desarrollo, las glías radiales proliferantes están dinámicamente acopladas por uniones gap (LoTurco y Kriegstein, 1991) y el desacople farmacológico previene que estos progenitores entren en la fase S del ciclo celular (Bittman y col., 1997). La clásica acción de las uniones gap es permitir la comunicación entre las células a través de: corrientes eléctricas, moléculas pequeñas, metabolitos o iones (ej: cAMP, ATP, IP3, glucosa, glutamato, Ca^{2+} y K^+). Estas uniones están formadas por dos hemicanales (conexones) que pueden existir también individualmente en la membrana celular, mediando el intercambio con la matriz extracelular. Originalmente se pensaba que los hemicanales se mantenían en un estado cerrado por los altos niveles de Ca^{2+} extracelular; sin embargo, evidencia reciente sugiere que los hemicanales median la liberación funcional de moléculas tales como ATP bajo condiciones fisiológicas (Goodenough y Paul, 2003). En la zona ventricular de la corteza en desarrollo se demostró que los hemicanales median ondas de Ca^{2+} a través de la liberación de ATP que se une

a los receptores purinérgicos P2Y1 en las GR vecinas, activando la liberación de Ca^{2+} mediada por IP3 desde el almacenamiento interno (Weissman y col., 2004). Interesantemente, la frecuencia, el tamaño y la distancia de las ondas de Ca^{2+} aumentan en la neurogénesis tardía (Weissman y col., 2004). Las proteínas de las Cx están reguladas a un nivel molecular, tal que permiten la formación de clusters de células acopladas por uniones gap durante la neurogénesis media y la difusión de ondas de Ca^{2+} mediada por hemicanales durante la neurogénesis tardía (Elias y Kriegstein, 2008). Es probable que la habilidad de las Cxs para formar uniones gap o hemicanales esté también altamente regulada por la interacción con diversos sistemas de señalización durante el ciclo celular. Por ejemplo, la Cx43 es particularmente permeable al ATP (Goldberg y col., 2002; Kang y col., 2008) y se expresa en altos niveles en la fase S durante la neurogénesis tardía (Bittman y Loturco, 1999), tiempo en que el ATP es liberado desde los hemicanales para iniciar las ondas de Ca^{2+} (Weissman y col., 2004). Para comprobar que los clusters efectivamente responden a acoplamiento a través de uniones gap y no se trata de biocitina que ingresa desde el exterior a través de hemicanales de membrana a las células; se podrían hacer registros dobles y evaluar el acople eléctrico entre ambas células registradas. Sin embargo, esta aproximación en las células del CC de tejido adulto sería técnicamente muy dificultosa. Al tratarse de tejido adulto y además por el tamaño y la organización de las células, lograr registros buenos y estables de por sí fue complicado. Por eso creemos que poder hacer “patch” en 2 células contiguas y además lograr registros estables en simultáneo iba a aumentar esta complejidad. Una aproximación más sencilla y posible sería incubar las rodajas previo al registro con un bloqueante de hemicanales como el Gap19 que bloquea hemicanales de Cx43 (Abudara y col., 2014; Wang y col., 2013) y evaluar si igual se encuentran células acopladas. La distribución preferencial del acoplamiento intercelular en los laterales del CC se podría ver también mediante técnicas inmunohistoquímicas. Utilizando anticuerpos para marcar las distintas conexinas se podría hallar la correlación entre la localización y distribución de las conexinas y la distribución de los “clusters” en el CC.

El bajo acople por uniones gap en las células endoteliales registradas en ratones con médula sin lesionar, podría estar relacionado a la muy escasa

actividad proliferativa de este nicho de células madres en animales adultos, ya que tienen su pico de proliferación en P8 y luego declina hasta la adultez (Alexovič Matiašová y col., 2017). El aumento en el número de clusters de células encontrado en el CC de ratones a los 5 días de la lesión podría ser concordante con la reactivación del nicho de las células “dormidas” del CC en respuesta a la lesión (Meletis y col., 2008; Mothe y Tator, 2005). Mediante el uso de BrdU o EdU (análogos de Timidina), que se incorporan en las células que entran en fase S se puede corroborar si las células del CC, o específicamente las que forman los “clusters” están mitóticamente activas. El acople significaría también un paso previo a la migración de las células hacia el sitio de injuria, guiada probablemente entre otros factores por moléculas señalizadoras relacionadas con el proceso inflamatorio que sigue a la lesión. El destino de las células luego de la migración depende de una intrincada combinación de morfógenos y factores de transcripción (Schuurmans y Guillemot, 2002). Por lo tanto, podemos decir que la señalización por las conexinas que forman las uniones tipo “gap” que también ocurre en las células progenitoras del cerebro y durante el desarrollo, juega un rol fundamental en la reacción temprana de las células endimarias a la lesión. Esto las convierte en un potencial blanco para modular la contribución del CC a la auto-reparación. El aumento del acople se correlacionaría con un retorno a un estado de señalización por Cx similar al del nicho activo del CC en ratones neonatales que tienen mayor poder regenerativo (Sabourin y col., 2009). En otros estudios del grupo se pretende caracterizar el tipo de conexina que está involucrada en la formación de dichas uniones, evaluando mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión y localización de la Cx43, 26 y 30 en el CC y alrededores, en cortes transversales y sagitales de médulas sanas y lesionadas. Para estar seguros de que las conexinas están involucradas en la re-activación del CC se podrían utilizar bloqueantes peptídicos (por ejemplo, Gap26, Gap27) que son más específicos que la Cbx y evaluar si se bloquea también el acople. Las posibles conexinas a evaluar como base molecular del acople y su plasticidad inducida por la lesión serían la Cx43, 26, 30 y 50, ya que han sido descriptas como posibles candidatas para este tipo de uniones (Dermietzel y col., 1989; Kunzelmann y col., 1999; Lee y col., 2005; Nadarajah y col., 1997; Rodriguez-Jimenez y col., 2016).

En tortugas, el índice de volumen de los “clusters” de células registrados se correlacionó inversamente con las R_{IN} de los registros, lo que sugiere que la baja R_{IN} de esas células se debió principalmente a la cantidad de células acopladas (Russo y col., 2008). En nuestros experimentos no se encontró esta correlación y además encontramos R_{IN} mucho más bajas que las halladas en tortugas (Russo y col., 2008) y en ratas neonatales (Marichal y col., 2012). La notoriamente baja R_{IN} que presentaron la gran mayoría de las células registradas podría ser consecuencia de un alto número de canales de fuga o “leak” que afectan considerablemente la resistencia. Eso podría justificar también que sorprendentemente, la R_{IN} de los ratones lesionados no fue significativamente más baja que la de los normales, creemos que la resistencia de entrada no estaría determinada fundamentalmente por el acople, sino por las prominentes conductancias de fuga. Por este motivo, también creemos que el aumento de la R_{IN} al bloquear con Cbx no fue total. Para probar esta hipótesis se deberían usar bloqueadores específicos de canales de fuga con el fin de ver si se logra un aumento significativo de la R_{IN} de las células. Utilizando Cbx y bloqueadores de canales de fuga en conjunto, se podría evaluar la contribución de cada uno a la resistencia de entrada de la célula. Tampoco hubo correlación entre la duración del registro y el tamaño de los “clusters”, lo que indica que incluso el menor de los tiempos de registro fue suficiente para teñir adecuadamente todas las células acopladas. Esto descartaría la posibilidad de que las células únicas registradas, o los clusters de pocas células acopladas se debieran a que en el registro no se dejó el tiempo suficiente para teñir sus posibles células acopladas. Creemos que es poco probable que el efecto de la Cbx sobre la R_{IN} , haya estado contribuido por el bloqueo de hemicanales de conexinas en la membrana que no estén formando uniones de tipo “gap”, ya que la mayoría de los hemicanales deberían de estar cerrados considerando las concentraciones extracelulares de Ca^{2+} usadas (Sáez y col., 2005). Sin embargo trabajos recientes indican que hemicanales de Cx43 pueden estar abiertos en situación basal en rodajas de hipocampo impactando en la neurotransmisión (Chever y col., 2014). Por este motivo, para poder confirmar que el aumento en la R_{IN} inducido por la Cbx fue debido al desacople de la célula registradas de sus vecinas, y no al bloqueo de los hemicanales de la célula se podría utilizar también el bloqueador Gap 26 que bloquea hemicanales y uniones gap de Cx43 en distintas ventanas temporales

(hemicanales: 1-30min, uniones gap: 1-3hs) (Braet y col., 2003; Chaytor y col., 1997; Evans y Boitano, 2001) o el bloqueador Gap19 mencionado previamente.

Ocasionalmente también registramos células tipo neuroblastos en contacto con el CC, algunas de espiga única y otras con descarga repetitiva, lo que reflejaría también distintos grados de maduración. Una posibilidad es que, al igual que ocurre en el embrión (Gao y Ziskind-conhaim, 1998) y en los nichos neurogénicos adultos (Carleton y col., 2003; Espósito y col., 2005), un aumento de la densidad de canales de Na^+ , que provocaría un aumento en la frecuencia de descarga, sea una estrategia común durante la maduración de la excitabilidad. La aparición de conductancias de K^+ en las neuronas espinales también es importante para la maduración de los potenciales de acción y la descarga repetitiva (Gao y col., 1998; Russo y Hounsgaard, 1999). Datos previos (ver Russo y col., 2004; Marichal y col., 2009) mostraron que las neuronas que rodean el CC poseen canales dependientes del voltaje sensibles al TEA, lo que sugiere la presencia de corrientes de K^+ de tipo rectificador retardado (I_{KD}). En suma, la maduración de la excitabilidad desde la descarga única a la descarga repetitiva requeriría no sólo el aumento en la densidad de canales de Na^+ sino una regulación negativa de canales de K^+ operados por voltaje y la aparición de nuevos tipos de conductancias de K^+ . En su conjunto, los resultados obtenidos sugieren la existencia de células en contacto con el CC, con diferentes grados de maduración hacia el linaje neuronal. En la figura 11a también se muestra el registro de una neurona madura desconectada del CC en el cual se observan potenciales de acción de gran amplitud y una aceleración de la descarga, propiedades consideradas intrínsecas de algunas de las neuronas maduras. Aunque la médula espinal adulta de los mamíferos contiene células progenitoras, la generación de nuevas neuronas parece estar solo "latente", hecho que contrasta con lo encontrado en otros vertebrados que parecen ser capaces de generar nuevas neuronas (Tanaka y Ferretti, 2009).

En líneas generales, concluimos que en el aspecto lateral del CC las células no neuronales tienen características morfológicas y electrofisiológicas de endimocitos, tanicitos (endimocitos radiales) y glías radiales funcionalmente asociados por uniones gap. Los experimentos realizados para esta tesina nos

permitieron conocer y comprender un poco más las propiedades de las células del CC de ratones adultos, de las que hay relativamente poca información actualmente. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos en estudios previos en tortugas *Trachemys dorbignyi* (Rehermann y col., 2009; Russo y col., 2004, 2008) y en ratas *Sprague Dawley* neonatales (P0–P5) (Marichal y col., 2016, 2009, 2012) para evaluar potenciales diferencias entre los animales mamíferos y la tortuga y entre animales neonatales y adultos. El tejido adulto es muy delicado, por lo tanto, fue un desafío para nosotros poder obtener rodajas de médula viables para realizar registros *in vitro*. Para ello, tuvimos que tener muchas precauciones para preservar la integridad del tejido. Los registros de “*patch-clamp*” “*whole-cell*” son análogos en cierto sentido a los registros intracelulares convencionales, pero ofrece varias ventajas incluyendo: alta resolución, bajo ruido y mejor estabilidad y control sobre los componentes intracelulares. Estas mejoras se deben a la baja resistencia del electrodo y a la alta resistencia del sello. Otra gran ventaja de este tipo de registros es la posibilidad de llenar células de forma no tóxica con tinciones, lo cual permite identificar las células registradas sin ambigüedades (Wallis, 1993). La técnica utilizada de “*patch clamp*” resulta útil para revelar la complejidad funcional y la diversidad de las células progenitoras.

Perspectivas:

Como se mencionó previamente, ya hay numerosos estudios que muestran que las células madre neurales son una fuente de astrocitos cicatrizantes gliales con funciones benéficas frente a una lesión, incluyendo preservar la integridad del tejido y proveer soporte neurotrófico para las neuronas sobrevivientes. Los efectos benéficos de las células madre endógenas luego de una LME las postulan como un potencial blanco terapéutico. Es importante investigar la identidad, el potencial y la regulación de estas células para modular efectivamente su respuesta. El camino más factible parecería ser modular la formación de la cicatriz que actualmente impide la conducción nerviosa, examinando el rol específico de los astrocitos residentes en su formación y evaluando las interacciones entre los componentes derivados de dichos astrocitos y los derivados de las células endimarias (Stenudd y col., 2015). Para ello, se podría manipular el nicho de células endimarias en forma de maximizar los eventos celulares que son beneficiosos para la reparación endógena y bloquear aquellos que son detrimentales.

En otros estudios se observaron mejoras en la recuperación funcional luego de promover la diferenciación de las células progenitoras a oligodendrocitos, ya que la remielinización axonal es fundamental para restaurar la conductancia e inhibir la degeneración. Esto hace atractivo considerar dirigir la predominante contribución de las células madres neurales endógenas de la médula espinal lejos de los astrocitos formadores de cicatriz y en cambio hacia la formación de oligodendrocitos remielinizadores (Göritz y Frisén, 2012; Sabelström y col., 2014). En suma, sería interesante buscar aumentar la formación de progenie de células madre neurales y redirigir dichas células a producir más oligodendrocitos luego de la LME (Stenudd y col., 2015). Hasta la fecha, parece más tangible promover la recuperación funcional luego de una lesión espinal modulando la generación de células no neuronales que por el reemplazo de las neuronas perdidas (Sabelström y col., 2014).

El análisis fenotípico de las nuevas células formadas a raíz de la lesión requiere de un enfoque multidisciplinario que utilice diversas técnicas para avanzar hacia la caracterización de estas células. Se deberá realizar un análisis más exhaustivo con marcadores moleculares específicos para los diversos tipos celulares del CC, por ejemplo, examinando la co-localización de los distintos marcadores celulares y de linaje, mediante técnicas inmunohistoquímicas. Como las células están íntimamente asociadas en el SNC, además es útil realizar una reconstrucción tridimensional con microscopía confocal de las células proliferantes y migrantes. La microscopía electrónica también aportaría en la caracterización, revelando la ultraestructura de las nuevas células. Varios genes también han sido descritos con expresión preferencial en el CC o en sus alrededores (Bmp6, CXCR4, Gdf10, Fzd3, Mdk, Nrtn, Rbp1, Shh, Sox4, Wnt7a) algunos incluso por tipos celulares específicos. Una base de datos completa de la expresión génica de estas células colaboraría en la caracterización genotípica del nicho (Hugnot y Franzen, 2011).

Para poder estudiar los efectos de la anulación de expresión de genes cuyos productos proteicos son cruciales durante el desarrollo y para la regeneración, se debería tomar ventaja del sistema disponible en ratones de la Cre recombinasa inducible (Cre-ER). Este sistema consiste en inducir la anulación de la expresión de un gen de interés en el animal adulto, dirigida por un promotor activo predominantemente en una población. Esto permite la manipulación de una población específica de una forma temporal y espacialmente precisa para análisis mecanísticos y funcionales *in vivo*. El sistema Cre/loxP es la estrategia más utilizada en la mutagénesis dirigida, específica de tejido. Los sitios loxP se disponen en parejas flanqueando el segmento de ADN a eliminar (gen floxeado) y determinarán la secuencia genómica a escindir. Mientras que, la disponibilidad en el tiempo y/o el espacio, de la recombinasa Cre, dictará cuándo y dónde se produce la recombinación. La activación temporal y espacial de Cre está regulada por un promotor específico de tipo celular, para lo cual es necesario un ligando exógeno para iniciar la recombinación (ej: tamoxifeno). Cuando Cre se expresa y es activada, se une a los sitios loxP, los corta por la mitad y luego une las dos mitades restantes tras haber eliminado el ADN situado entre ambos. Dada la viabilidad de los animales, así como la ausencia de alteraciones

funcionales detectables, los ratones transgénicos, ofrecen una herramienta de potencial valor biológico y de aplicabilidad inmediata.

En línea con los resultados obtenidos en esta tesina, se podría probar la interferencia selectiva de la expresión de los genes que dan lugar a las distintas conexinas a través de la recombinación mediada por Cre utilizando el promotor FoxJ1 activo en las células endimarias del CC. Esto podría permitirnos determinar cómo afecta in vivo la ausencia de cada conexina en la respuesta celular y funcional a la lesión, sobre todo en la activación del nicho para la reparación endógena.

Otra aproximación interesante para experimentos in vivo, sería administrar sobre la lesión un vehículo (por ejemplo, un gel como el ácido plurónico F127) que libere progresivamente un bloqueante como la carbenoxolona y evaluar cómo afecta funcionalmente el acople y la reparación de la lesión cuando el bloqueante se libera dosificadamente y en un tiempo más prolongado.

Desde el punto de vista evolutivo, sería interesante disecar qué vías genéticas han evolucionado para promover o restringir la regeneración en las distintas especies animales. También desentrañar de qué modo han cambiado: las diferencias en la respuesta de cicatrización, en el estado de las células madre, en el acceso a programas embrionarios neurogénicos y en otros atributos celulares. Se especula que la fuerte presión selectiva para resolver las heridas de forma que promuevan la supervivencia y el éxito reproductivo fue una importante variable que afectó la regeneración en algunas especies (Tanaka y Ferretti, 2009).

Aunque las células madres neurales adultas podrían mantener la capacidad de autorrenovarse, y de generar astrocitos, oligodendrocitos y neuronas, el repertorio de células diferenciadas que estas podrían producir, parece ser todavía limitado en comparación con la de las células neuroepiteliales embrionarias o la de las glías radiales fetales (Alvarez-Buylla y col., 2001). Muchos estudios ya han explorado la posibilidad de promover la recuperación funcional luego de una lesión espinal trasplantando diferentes tipos de células madres o células derivadas de células madres (Barnabe-Heider y Frisén, 2008).

De hecho, un gran número de pacientes de LME ya han recibido trasplantes de células madres y otros tipos celulares, a pesar del limitado entendimiento de la eficiencia, la seguridad y mecanismos por los cuales las células madres de la médula ósea podrían promover la regeneración de la médula espinal (Callera y Do Nascimento, 2006; Park y col., 2005; Tator y Ph, 2006; Yoon y col., 2007).

Otro abordaje experimental podría ser introducir células, que modulen el microambiente generado por la lesión y/o que provean soporte trófico, o elementos que modulen la respuesta inmune como citoquinas anti-inflamatorias. También se debería buscar la forma de reducir la fibrosis quística y el depósito de matriz extracelular generada sobre todo por un subtipo de pericitos, que se vio que su bloqueo mejora la permisividad de la cicatriz para los axones (Göritz y col., 2011). El trasplante de fibroblastos modificados para producir factores de crecimiento o factores neurotróficos ha sido demostrado que mejora el crecimiento axonal (Blesch y Tuszynski, 2001). De hecho, la administración de factores de crecimiento por si solo puede mejorar la recuperación, muchos mecanismos han sido propuestos como explicación de ello, incluyendo el aumento en la generación de “brotes” axónicos, en el crecimiento axonal, y en la supervivencia neuronal y/o de los oligodendrocitos (Hung y col., 2007; Whittaker y col., 2012). La presencia de factores de crecimiento en el microambiente puede alterar la actividad de las células madres neurales endógenas.

Como el ATP es masivamente liberado luego de una LME, y por lo visto en células progenitoras del cerebro, la señalización purinérgica podría jugar un rol importante en el nicho de células madre. En ratas neonatales (P1-P6) se exploró el efecto de agonistas purinérgicos en células ependimarias y se vio que el BzATP generaba olas de Ca^{2+} en GR que se disparaban por el influjo de Ca^{2+} y se propagaban por la liberación de Ca^{2+} de los depósitos internos a través de la activación de receptores especiales (ryanodina, P2X7). Esto podría ser un mecanismo epigenético para modular el comportamiento de los progenitores en respuesta a la liberación de ATP luego de la injuria (Marichal y col., 2016). Se podría explorar si se mantiene este mecanismo también en ratones adultos para sumar pistas en la caracterización del fenómeno de reparación.

La lesión en la médula espinal dispara el nacimiento de un gran número de células, las cuales se diferencian, migran y asumen funciones específicas. Dos poblaciones chicas y generalmente "latentes", células ependimarias y los pericitos de tipo A, dan lugar a la mayoría de células nuevas en respuesta a injuria (Sabelström y col., 2014). Los pericitos tipo A dan lugar a células estromales que formarán la cicatriz (Göritz y col., 2011) . La atenuación de la fibrosis derivada por los pericitos representa una prometedora forma de facilitar la recuperación. Actualmente se busca delinear la extensión normal y entender los mecanismos que regulan el proceso, siendo una de las principales metas para el futuro definir la posibilidad de influenciar las células madres neurales para que reemplacen células afectadas como una alternativa al trasplante celular (Göritz y Frisén, 2012).

El nicho de células madre de la médula espinal constituye un modelo original para estudiar cómo y por qué las células madre y progenitoras se mantienen en el SNC adulto. Este nicho comparte características en común con los nichos cerebrales (diversidad celular, estructura altamente organizada, mantenimiento de señales embrionarias, cercana interacción con vasos, entre otras) pero también tiene caracteres específicos tales como la ausencia de glío- y neurogénesis asociada en condiciones normales. La comparación, a nivel molecular, celular y estructural de nichos neurogénicos y no neurogénicos podría generar importantes claves para revelar el mecanismo gobernando la gliogénesis y neurogénesis adulta. También permitiría desentrañar las redes genéticas que subyacen las distintas propiedades de estas células (Hugnot y Franzen, 2011).

Además de ser un modelo interesante para estudiar las células madre neurales adultas, la rápida activación de la región ependimaria en varios modelos de lesiones medulares llama a una mejor y más exhaustiva caracterización de esta región. A analizar los mecanismos que subyacen la proliferación, delaminación y migración de las células ependimarias hacia el sitio de la lesión y a investigar cómo estas células contribuyen a la cicatriz glial y a la oligodendrogénesis para influenciar el destino de estas células hacia la regeneración de la médula espinal. Hasta muy recientemente la región del CC fue erróneamente considerada como

una capa de células homogéneas. La activación de esta región en respuesta a LME está ahora bien documentada, pero muy poco se sabe del comportamiento específico de los diferentes tipos celulares. El rápido desarrollo de ratones transgénicos o de expresión de Cre-recombinasa que marcan poblaciones celulares específicas ayudará en estos propósitos (Hugnot y Franzen, 2011). También será importante evaluar el resultado y los posibles efectos secundarios en animales experimentales a lo largo de un curso mucho mayor de tiempo del que se usa normalmente, ya que los pacientes en muchos casos tienen expectativa de vivir varias décadas luego del tratamiento (Barnabe-Heider y Frisén, 2008).

La literatura de la LME sugiere que varias intervenciones o tratamientos pueden promover la regeneración de axones dañados. El grado de regeneración continúa siendo modesto, pero podría ser suficiente para lograr una recuperación funcional. Actualmente, existen otros mecanismos eminentemente plausibles que podrían contribuir a la recuperación funcional que permanecen en su mayoría no-testeados. La diversidad de mecanismos que podrían promover la recuperación luego de una LME podría aumentar las opciones para el desarrollo de nuevas terapias, para ello es necesario identificar los mecanismos que son activados en cada posible tratamiento (Bradbury y McMahon, 2006).

Bibliografía:

- Abudara, V., Bechberger, J., Freitas-Andrade, M., De Bock, M., Wang, N., Bultynck, G., ... Giaume, C. (2014). The connexin43 mimetic peptide Gap19 inhibits hemichannels without altering gap junctional communication in astrocytes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(October), 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00306>
- Alexovič Matiašová, A., Ševc, J., Tomori, Z., Gombalová, Z., Gedrová, Š., & Daxnerová, Z. (2017). Quantitative analyses of cellularity and proliferative activity revealed the dynamics of the central canal lining during postnatal development of rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 36.
<https://doi.org/10.1002/cne>.
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., & Tramontin, A. D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 287–293. <https://doi.org/10.1038/35067582>
- Anderson, M. J., & Waxman, S. G. (1981). Morphology of regenerated spinal cord in *Sternarchus albifrons*. *Cell and Tissue Research*, 219(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1007/BF00210014>
- Barnabe-Heider, F., & Frisén, J. (2008). Stem Cells for Spinal Cord Repair. *Cell Stem Cell*, 3(Review), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.06.011>
- Barnabé-Heider, F., Göritz, C., Sabelström, H., Takebayashi, H., Pfrieder, F. W., Meletis, K., & Frisén, J. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell*, 7(4), 470–482.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.014>
- Barry, P. H., & Diamond, J. M. (1970). Junction potentials, electrode standard potentials, and other problems in interpreting electrical properties of membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 3(1), 93–122.
<https://doi.org/10.1007/BF01868010>

- Belluzzi, O., Sacchi, O., & Wanke, E. (1985). A fast transient outward current in the rat sympathetic neurone studied under voltage-clamp conditions. *Journal of Physiology*, 358, 91–108.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9), 728–739.
<https://doi.org/10.1038/nrn920>
- Bittman, K., Owens, D. F., Kriegstein, A. R., & LoTurco, J. J. (1997). Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. *The Journal of Neuroscience*, 17(18), 7037–7044.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-18-07037.1997>
- Bittman, K. S., & Loturco, J. J. (1999). Differential Regulation of Connexin 26 and 43 in Murine Neocortical Precursors. *Cerebral Cortex*, 9(2), 188–195.
- Blesch, A., & Tuszynski, M. H. (2001). GDNF Gene Delivery to Injured Adult CNS Motor Neurons Promotes Axonal Growth , Expression of the Trophic Neuropeptide CGRP , and Cellular Protection. *The Journal of Comparative Neurology*, 410(May), 399–410.
- Bradbury, E. J., & McMahon, S. B. (2006). Spinal cord repair strategies: Why do they work? *Nature Reviews Neuroscience*, 7(8), 644–653.
<https://doi.org/10.1038/nrn1964>
- Braet, K., Vandamme, W., Martin, P. E. M., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2003). Photoliberating inositol-1,4,5-trisphosphate triggers ATP release that is blocked by the connexin mimetic peptide gap 26. *Cell Calcium*, 33(1), 37–48. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(02\)00180-X](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(02)00180-X)
- Brahma, B., Forman, R. E., Stewart, E. E., Nicholson, C., & Rice, M. E. (2000). Ascorbate inhibits edema in brain slices. *Journal of Neurochemistry*.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.741263.x>
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M., & Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell*, 101, 435–445. <https://doi.org/10.1016/S0092->

- Bruzzone, R., & Dermietzel, R. (2006). Structure and function of gap junctions in the developing brain. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0287-0>
- Callera, F., & do Nascimento, R. X. (2006). Delivery of autologous bone marrow precursor cells into the spinal cord via lumbar puncture technique in patients with spinal cord injury: A preliminary safety study. *Experimental Hematology*, 34(2), 130–131. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.11.006>
- Carleton, A., Petreanu, L. T., Lansford, R., Alvarez-buylla, A., & Lledo, P. M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 6(5), 507–518. <https://doi.org/10.1038/nn1048>
- Chaytor, A. T., Evans, W. H., & Griffith, T. . (1997). Peptides homologous to extracellular loop motifs of connexin 43 reversibly abolish rhythmic contractile activity in rabbit arteries. *Journal of Physiology*, 503(1), 99–110. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.099bi.x>
- Chever, O., Lee, C.-Y., & Rouach, N. (2014). Astroglial Connexin43 Hemichannels Tune Basal Excitatory Synaptic Transmission. *Journal of Neuroscience*, 34(34), 11228–11232. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0015-14.2014>
- Chittajallu, R., Chen, Y., Wang, H., Yuan, X., Ghiani, C. A., Heckman, T., ... Gallo, V. (2002). Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. *PNAS*, 99(4), 2350–2355.
- Connor, J. A., & Stevens, C. F. (1971). Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under Voltage Clamp. *Journal of Physiology*, 213, 1–19. <https://doi.org/10.1152/jn.1986.56.6.1739>
- Danilov, A. I., Covacu, R., Moe, M. C., Langmoen, I. A., Johansson, C. B., Olsson, T., & Brundin, L. (2006). Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis. *European Journal of*

Neuroscience, 23, 394–400. <https://doi.org/EJN4563> [pii]r10.1111/j.1460-9568.2005.04563.x

Dermietzel, R., Traub, O., Hwang, T. K., Beyer, E., Bennett, M. V. L., Spray, D. C., & Willecke, K. (1989). Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(December), 10148–10152.

Elias, L. A. B., & Kriegstein, A. R. (2008). Gap junctions : multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Cell*, 31(5), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.02.007>

Endo, T., Yoshino, J., Kado, K., & Tochinal, S. (2007). Brain regeneration in anuran amphibians. *Development Growth and Differentiation*, 49(2), 121–129. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00914.x>

Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., & Schinder, A. F. (2005). Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development. *The Journal of Neuroscience*, 25(44), 10074–10086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005>

Evans, W. H., & Boitano, S. (2001). Connexin mimetic peptides; specific inhibitors of gap junctional communication. *Biochemical Society Transactions*, 29(3), A56.3-A56. <https://doi.org/10.1042/bst029a056b>

Fernández, A., Radmilovich, M., & Trujillo-Cenóz, O. (2002). Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. *Journal of Comparative Neurology*, 453(2), 131–144. <https://doi.org/10.1002/cne.10388>

Frisén, J., Fried, K., Sjoren, A. M., & Risling, M. (1993). Growth of ascending spinal axons in CNS scar tissue. *Journal of Neuroscience*, 11(4), 461–475.

Fu, H., Qi, Y. C., Tan, M., Cai, J., Hu, X. M., Liu, Z. J., ... Qiu, M. S. (2003). 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. *Journal of Comparative Neurology*, 456, 237–244.

- Gao, B. X., & Ziskind-conhaim, L. (1998). Development of Ionic Currents Underlying Changes in Action Potential Waveforms in Rat Spinal Motoneurons. *The American Physiological Society*, 3047–3361.
- Garcia-Ovejero, D., Arevalo-Martin, A., Paniagua-Torija, B., Florensa-Vila, J., Ferrer, I., Grassner, L., & Molina-Holgado, E. (2015). The ependymal region of the adult human spinal cord differs from other species and shows ependymoma-like features. *Brain*, 138(6).
<https://doi.org/10.1093/brain/awv089>
- Goldberg, G. S., Moreno, A. P., & Lampe, P. D. (2002). Gap Junctions between Cells Expressing Connexin 43 or 32 Show Inverse Permselectivity to Adenosine and ATP *. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36725–36730. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109797200>
- Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2003). Beyond the GAP: Functions of unpaired connexon channels. *Nature Reviews*, 4(April), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/nrm1072>
- Göritz, C., & Frisén, J. (2012). Neural stem cells and neurogenesis in the adult. *Cell Stem Cell*, 10(6), 657–659. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.005>
- Göritz, Christian, Dias, D. O., Tomilin, N., Barbacid, M., Shupliakov, O., & Frisén, J. (2011). A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science*, 333(6039), 238–242. <https://doi.org/10.1126/science.1203165>
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., & Götz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Developmental Biology*, 229(1), 15–30.
<https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9962>
- Hendriks, R., Morest, D. K., & Kaczmarek, L. K. (1999). Role in neuronal cell migration for high-threshold potassium currents in the chicken hindbrain. *Journal of Neuroscience Research*, 58(6), 805–814.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19991215\)58:6<805::AID-JNR7>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19991215)58:6<805::AID-JNR7>3.0.CO;2-V)
- Horner, P. J., & Gage, F. H. (2000). Regenerating the damaged central nervous

- system. *Nature*, 407(6807), 963–970. <https://doi.org/10.1038/35039559>
- Horner, P. J., Power, A. E., Kempermann, G., Kuhn, H. G., Palmer, T. D., Winkler, J., ... Gage, F. H. (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 20(6), 2218–2228. <https://doi.org/10.1002/glia.21150>
- Hugnot, J. P., & Franzen, R. (2011). The spinal cord ependymal region: A stem cell niche in the caudal central nervous system. *Frontiers in Bioscience*, 16, 1044–1059. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(05\)01189-2](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(05)01189-2)
- Hung, K. ., Tsai, S. ., Lee, T. ., Jia-Wei, L., Chang, C. K., & Chiu, W. . (2007). Gene transfer of insulin-like growth factor–I providing neuroprotection after spinal cord injury in rats. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 6, 35–46. <https://doi.org/10.3171/spi.2007.6.1.35>
- Iten, L. E., & Bryant, S. V. (1976). Stages of tail regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Experimental Zoology*, 196(3), 283–292. <https://doi.org/10.1002/jez.1401960303>
- Jessell, T. M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: Inductive signals and transcriptional codes. *Nature Reviews Genetics*, 1, 20–29. <https://doi.org/10.1038/35049541>
- Johansson, C. B., Momba, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U., & Frisén, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 96, 25–34. [https://doi.org/S0092-8674\(00\)80956-3](https://doi.org/S0092-8674(00)80956-3) [pii]
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., & Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 Hemichannels Are Permeable to ATP. *Journal of Neuroscience*, 28(18), 4702–4711. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5048-07.2008>
- Ke, Y., Chi, L., Xu, R., Luo, C., Gozal, D., & Liu, R. (2006). Early Response of Endogenous Adult Neural Progenitor Cells to Acute Spinal Cord Injury in Mice. *Stem Cells*, 24Ke, Y.,(4), 1011–1019.

<https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0249>

- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience Neurosci*, 32, 149–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
- Kunzelmann, P., Schroeder, W., Traub, O., Steinhauser, C., Dermietzel, R., & Willecke, K. (1999). Late Onset and Increasing Expression of the Gap Junction Protein Connexin30 in Adult Murine Brain and Long-Term Cultured Astrocytes. *GLIA*, 25, 111–119.
- Lee, I., Lindqvist, E. V. A., Kiehn, O. L. E., Widenfalk, J., & Olson, L. (2005). Glial and Neuronal Connexin Expression Patterns in the Rat Spinal Cord during Development and Following Injury. *The Journal of Comparative Neurology*, 489, 1–10. <https://doi.org/10.1002/cne.20567>
- Liu, X., Bolteus, A. J., Balkin, D. M., Henschel, O., & Bordey, A. (2006). GFAP-Expressing Cells in the Postnatal Subventricular Zone Display a Unique Glial Phenotype Intermediate Between Radial Glia and Astrocytes. *GLIA*, 54, 394–410. <https://doi.org/10.1002/glia>
- Lledo, P. M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(3), 179–193. <https://doi.org/10.1038/nrn1867>
- LoTurco, J. J., & Kriegstein, A. R. (1991). Clusters of Neuroblasts in Embryonic Neocortex. *Science*, 252, 563–565.
- MacGregor, D. G., Chesler, M., & Rice, M. E. (2001). HEPES prevents edema in rat brain slices. *Neuroscience Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01690-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01690-1)
- Marichal, N., Fabbiani, G., Trujillo-Cenóz, O., & Russo, R. E. (2016). Purinergic signalling in a latent stem cell niche of the rat spinal cord. *Purinergic Signalling*, 12(2), 331–341. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9507-6>
- Marichal, N., Garcia, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenoz, O., & Russo, R. E.

- (2009). Enigmatic Central Canal Contacting Cells: Immature Neurons in “Standby Mode”? *The Journal of Neuroscience*, 29(32), 10010–10024. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6183-08.2009>
- Marichal, N., García, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O., & Russo, R. E. (2012). Spatial domains of progenitor-like cells and functional complexity of a stem cell niche in the neonatal rat spinal cord. *Stem Cells*, 30(9), 2020–2031. <https://doi.org/10.1002/stem.1175>
- Mathie, A., Wooltorton, J. R. A., & Watkins, C. S. (1998). Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *General Pharmacology*, 30(1), 13–24. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(97\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(97)00034-7)
- Meletis, K., Barnabé-Heider, F., Carlén, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O., & Frisén, J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biology*, 6(7), 1494–1507. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060182>
- Ming, G. L., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 223–250. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459>
- Mizzel, M. (1968). Limb Regeneration: Induction in the Newborn Opossum. *Science*, 161(4), 283–286.
- Mochii, M., Taniguchi, Y., & Shikata, I. (2007). Tail regeneration in the *Xenopus* tadpole. *Development Growth and Differentiation*, 49(2), 155–161. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00912.x>
- Molowny, A., Nacher, J., & Lopez-Garcia, C. (1995). Reactive neurogenesis during regeneration of the lesioned medial cerebral cortex of lizards. *Neuroscience*, 68(3), 823–836. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00201-S](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00201-S)
- Mothe, A. J., & Tator, C. H. (2005). Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal

- spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience*, 131(1), 177–187.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.011>
- Nadarajah, B., Jones, A. M., Evans, W. H., & Parnavelas, J. G. (1997). Differential Expression of Connexins during Neocortical Development and Neuronal Circuit Formation. *Journal of Neuroscience*, 17(9), 3096–3111.
- Niazi, I. A. (1963). The Histology of Tail Regeneration in the Ammocoetes. *Canadian Journal of Zoology*, 41(1), 125–146. <https://doi.org/10.1139/z63-014>
- Nicholls, J., & Saunders, N. (1996). Regeneration of immature mammalian spinal cord after injury. *Trends in Neurosciences*, 19(6), 229–234.
[https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10021-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10021-7)
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Wong, W. S., Clinton, B. K., & Kriegstein, A. R. (2002). Dividing Precursor Cells of the Embryonic Cortical Ventricular Zone Have Morphological and Molecular Characteristics of Radial Glia. *The Journal of Neuroscience*, 22(8), 3161–3173.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-08-03161.2002>
- Organización Mundial de la Salud. (2013). International Perspectives on Spinal Cord Injury. Summary, 1–12.
- Pardo, L. A. (2004). Voltage-Gated Potassium Channels in Cell Proliferation. *Physiology*, 19(5), 285–292. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2004>
- Park, H. C., Shim, Y. S., Ha, Y., Yoon, S. W., Park, S. R., Choi, B. H., & Park, H. S. (2005). Treatment of Complete Spinal Cord Injury Patients by Autologous Bone Marrow Cell Transplantation and Administration of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor HYUNG. *Tissue Engineering*, 11(5/6), 913–922.
- Petit, A., Sanders, A. D., Kennedy, T. E., Tetzlaff, W., Glattfelder, K. J., Dalley, R. A., ... Roskams, A. J. (2011). Adult spinal cord radial glia display a unique progenitor phenotype. *PLoS ONE*, 6(9), 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024538>

- Picken Bahrey, H. L., & Moody, W. J. (2003). Voltage-gated currents, dye and electrical coupling in the embryonic mouse neocortex. *Cerebral Cortex*, 13(3), 239–251. <https://doi.org/10.1093/cercor/13.3.239>
- Pinto, L., & Götz, M. (2007). Radial glial cell heterogeneity-The source of diverse progeny in the CNS. *Progress in Neurobiology*, 83, 2–23. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.02.010>
- Rehermann, M. I., Marichal, N., Russo, R. E., & Trujillo-Cenóz, O. (2009). Neural reconnection in the transected spinal cord of the freshwater turtle *Trachemys dorbignyi*. *The Journal of Comparative Neurology*, 515, 197–214. <https://doi.org/10.1002/cne.22061>
- Ribera, A. B. (1999). Potassium currents in developing neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868, 399–405. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11301.x>
- Rodriguez-Jimenez, F. J., Alastrue, A., Stojkovic, M., Erceg, S., & Moreno-Manzano, V. (2016). Connexin 50 modulates Sox2 expression in spinal-cord-derived ependymal stem/progenitor cells. *Cell and Tissue Research*, 365(2). <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2421-y>
- Rogawski, M. A., Beinfeld, M. C., Hays, S. E., Hokfelt, T., & Skirboll, L. R. (1985). Cholecystikinin and cultured spinal neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 403–412. Retrieved from [papers3://publication/uuid/061E4723-2329-40B3-8750-8BDCDB432BDF](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2704441/)
- Rolls, A., Shechter, R., & Schwartz, M. (2009). The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(3), 235–241. <https://doi.org/10.1038/nrn2591>
- Rossignol, S., Schwab, M., Schwartz, M., & Fehlings, M. G. (2007). Spinal Cord Injury: Time to Move? *Journal of Neuroscience*, 27(44), 11782–11792. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3444-07.2007>
- Rouach, N., Segal, M., Koulakoff, A., Giaume, C., & Avignone, E. (2003). Carbenoxolone blockade of neuronal network activity in culture is not

- mediated by an action of gap junctions. *Journal of Physiology*, 553(3), 729–745. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.053439>
- Rueda, A. G., Whole-cell Patch-clamp Recordings for Characterizing Neuronal Electrical Properties. Experts' Protocol Series. 1-12
- Russo, R. E., Fernández, A., Reali, C., Radmilovich, M., & Trujillo-Cenóz, O. (2004). Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurones in the turtle spinal cord. *Journal of Physiology*, 560(3), 831–838. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.072405>
- Russo, R. E., & Hounsgaard, J. (1999). *Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones* (Vol. 72).
- Russo, R. E., Reali, C., Radmilovich, M., Fernandez, A., & Trujillo-Cenoz, O. (2008). Connexin 43 Delimits Functional Domains of Neurogenic Precursors in the Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*, 28(13), 3298–3309. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5736-07.2008>
- Sabelström, H., Stenudd, M., & Frisén, J. (2014). Neural stem cells in the adult spinal cord. *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.026>
- Sabelström, H., Stenudd, M., Réu, P., Dias, D. O., Elfineh, M., Zdunek, S., ... Frisén, J. (2013). Resident Neural Stem Cells Restrict Tissue Damage and Neuronal Loss After Spinal Cord Injury in Mice. *Science*, 342(6158), 637–640. <https://doi.org/10.1126/science.1242576> The
- Sabourin, J. C., Ackema, K. B., Ohayon, D., Guichet, P. O., Perrin, F. E., Garces, A., ... Hugnot, J. P. (2009). A Mesenchymal-Like ZEB1 + Niche Harbors Dorsal Radial Glial Fibrillary Acidic Protein-Positive Stem Cells in the Spinal Cord. *Stem Cells*, 27(11), 2722–2733. <https://doi.org/10.1002/stem.226>
- Sáez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F., & Bennett, M. V. L. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1711(2 SPEC. ISS.), 215–

224. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.01.014>

Schaarschmidt, G., Wegner, F., Schwarz, S. C., Schmidt, H., & Schwarz, J. (2009). Characterization of voltage-gated potassium channels in human neural progenitor cells. *PLoS One*, 4(7), 1–13.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006168>

Schmidt, H., Lüer, K., Hevers, W., & Technau, G. M. (2000). Ionic currents of drosophila embryonic neurons derived from selectively cultured CNS midline precursors. *Journal of Neurobiology*, 44(4), 392–413.

[https://doi.org/10.1002/1097-4695\(20000915\)44:4<392::aid-neu3>3.3.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1097-4695(20000915)44:4<392::aid-neu3>3.3.co;2-d)

Schuurmans, C., & Guillemot, F. (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 26–34.

Shechter, R., Ziv, Y., & Schwartz, M. (2007). New GABAergic Interneurons Supported by Myelin-Specific T Cells Are Formed in Intact Adult Spinal Cord. *Stem Cells*, 25(9), 2277–2282.

<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0705>

Shi, J., Miles, D. K., Orr, B. A., Massa, S. M., & Kernie, S. G. (2007). Injury-induced neurogenesis in Bax-deficient mice: Evidence for regulation by voltage-gated potassium channels. *European Journal of Neuroscience*, 25(12), 3499–3512. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05624.x>

Spitzer, N. C., Vincent, A., & Lautermilch, N. J. (2000). Differentiation of electrical excitability in motoneurons. *Brain Research Bulletin*, 53(5), 547–552. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(00\)00388-9](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00388-9)

Stanfield, P. R. (1983). Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 97, 1–67. <https://doi.org/10.1007/bfb0035345>

Stenudd, M., Sabelström, H., & Frisén, J. (2015). Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair. *JAMA Neurology*, 72(2), 235–

237. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.2927>

Tanaka, E. M., & Ferretti, P. (2009). Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 713–723. <https://doi.org/10.1038/nrn2707>

Tator, C. H., & Ph, D. (2006). Review of treatment trials in human spinal cord injury: Issues, difficulties, and recommendations. *Neurosurgery*, 59(5), 957–987. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000245591.16087.89>

Thuret, S., Moon, L. D. F., & Gage, F. H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(8), 628–643. <https://doi.org/10.1038/nrn1955>

Wallis D. I. (1993) Electrophysiology: A Practical Approach (Practical Approach Series: 116) 169-188

Wang, N., De Vuyst, E., Ponsaerts, R., Boengler, K., Palacios-Prado, N., Wauman, J., ... Leybaert, L. (2013). Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology*, 108(1). <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0309-x>

Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A. C., & Reynolds, B. A. . (1996). Multipotent CNS Stem Cells Are Present in the Adult Mammalian Spinal Cord and Ventricular Neuroaxis Samuel. *The Journal of Neuroscience*, 16(23), 7599–7609. <https://doi.org/10.4337/lath.2016.02.03>

Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C., & Kriegstein, A. R. (2004). Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex. *NEURON*, 43, 647–661.

Whittaker, M. T., Zai, L. J., Lee, H. J., Pajoohesh-ganji, A., Wu, J., Sharp, A., ... Wrathall, J. R. (2012). GGF2 (Nrg1-b3) Treatment Enhances NG2+ Cell Response and Improves Functional Recovery After Spinal Cord Injury. *GLIA*, 60(2012), 281–294. <https://doi.org/10.1002/glia.21262>

- Yiu, G., & He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(8), 617–627. <https://doi.org/10.1038/nrn1956>
- Yoon, S. H., Shim, Y. S., Park, Y. H., Chung, J. K., Nam, J. H., Kim, M. O., ... Ha, Y. (2007). Complete Spinal Cord Injury Treatment Using Autologous Bone Marrow Cell Transplantation and Bone Marrow Stimulation with Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor: Phase I/II Clinical Trial. *Stem Cells*, 25(8), 2066–2073. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0807>
- Zhao, S., Ting, J. T., Atallah, H. E., Qiu, L., Tan, J., Gloss, B., ... Feng, G. (2011). Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nature Methods*, 8(9), 745–755. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1668>