

Trabajo final de carrera de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Rol del receptor GPR17 frente a la lesión en la médula espinal

Renata Simeone Misol

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

Orientador **Dr. Raúl E. Russo**
Co-orientadora **Dra. Lesly Spring Valdivia Torres**



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR fcien.edu.uy



iibce
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE

Contenido

Introducción	3
Lesiones medulares	3
Fases de las lesiones medulares y cicatriz glial	5
El canal central como nicho de células madre	6
El receptor huérfano GPR17	11
El receptor GPR17 y la medula espinal	14
Objetivos	15
Materiales y Métodos	16
Animales de experimentación	16
Inyecciones intramedulares	17
Perfusión y procesamiento del tejido	18
Inmunohistoquímica	19
Ensayos de proliferación celular	20
Análisis de los datos	20
Resultados	21
El receptor GPR17 se expresa en las células endimarias del canal central ..	21
La activación del receptor GPR17 aumenta la proliferación de las células endimarias	23
El fenotipo GFAP de las células del canal central no es modificado por la activación del receptor GPR17	27
La activación del receptor GPR17 provoca la migración de células a partir del canal central	29
Discusión	31
Conclusiones y perspectivas	39
Agradecimientos	42
Bibliografía	43

Introducción

Lesiones medulares

La médula espinal es la principal vía a través del cual viajan los comandos motores y la información sensorial entre el cerebro y el cuerpo, conteniendo los circuitos que organizan las funciones motoras y autonómicas. Una lesión en la médula puede afectar la conducción de las señales sensoriales y motoras por debajo del sitio lesionado (Maynard et al., 1997). Las lesiones medulares generan condiciones devastadoras, que pueden provocar diferentes grados de parálisis, pérdida de sensibilidad y trastornos de tipo autonómico (e.g, control de la micción). Hasta un 90 % de las lesiones medulares se deben a causas traumáticas, aunque la proporción de lesiones medulares con origen no traumático (procesos patológicos multifactoriales y frecuentemente complejos) parecería ir en aumento (OMS, 2013). Las lesiones medulares traumáticas pueden deberse a distintas causas, de las cuales la más comunes son las provocadas en primer lugar por accidentes automovilísticos, seguido de caídas, accidentes deportivos, violencia y otros (Kang et al., 2017). En niños y jóvenes los accidentes automovilísticos son los causantes más comunes en generar estas lesiones, en tanto luego de los 45 años parecería que las caídas son las más comunes en causar lesiones medulares (Thietje et al., 2017).

La incidencia de las lesiones medulares, incluyendo lesiones traumáticas y no traumáticas está estimada entre 40 y 83 millones por año, con un estimativo de casos nuevos por año entre los 250.000-500.000. Por otro lado, la incidencia de las lesiones medulares traumáticas, están estimadas entre 10.4 y 82 millones por año (Thietje et al., 2017). Las tasas de incidencia varían entre países y regiones siendo los países no desarrollados aquellos que tienen una mayor incidencia en lesiones medulares traumáticas (Kang et al., 2017). La mortalidad y la esperanza de vida luego de una lesión medular varían enormemente en las distintas partes del mundo, principalmente debido a las diferencias en los sistemas de salud y cuidado. Esto incluye, por un lado, la disponibilidad y efectividad de las unidades de salud, y por el otro lado la calidad de vida de los pacientes con cuidados prolongados (Thietje et al., 2017). El número de hombres que sufren lesiones medulares traumáticas siempre es mayor al de las mujeres, mientras que la relación hombres: mujeres que sufren lesiones medulares no traumáticas parecería ser 1:1 (Kang et al., 2017). Por otro lado, la edad de los pacientes con este tipo de lesiones tiende a ser bimodal, el primer pico se encuentra entre los 15-29 años y el segundo luego de los 65 años (Kang et al., 2017).

Las lesiones en la médula espinal conllevan un impacto importante en la expectativa y calidad de vida, que implican muchas veces la pérdida de funciones básicas, como movimiento de extremidades, insuficiencias

respiratorias, dolor crónico e insuficiencia sexual. Las lesiones medulares se pueden clasificar según el nivel en el que ocurren, el tipo de lesión que se genera y la severidad de la misma (NINDS, 2014) (Figura 1). La tetraplejía corresponde al deterioro o pérdida de la función motora y/o sensorial por una lesión a nivel de los segmentos cervicales de la médula espinal. En estos casos el deterioro se observa en las extremidades (brazos y piernas), en el tronco, y también en los órganos pélvicos (Maynard et al., 1997). La paraplejía ocurre cuando se lesiona la médula espinal a nivel de los segmentos torácico, lumbar o sacro en la cual se conserva la motricidad y sensibilidad de los brazos, pero según el nivel de la lesión, el tronco, las piernas y los órganos pélvicos son afectados (Maynard et al., 1997). Por otro lado, las lesiones medulares también se pueden clasificar siguiendo la escala de la Asociación Americana de Lesión Espinal (ASIA) según la severidad de la misma. En este sentido, en las lesiones incompletas se preserva de forma parcial las funciones sensoriales y/o motoras por debajo del nivel lesionado mientras que las lesiones completas generan una ausencia completa tanto en las funciones sensoriales como motoras (Kirshblum et al., 2011; Alizadeh y Karimi-Abdolrezaee, 2019).

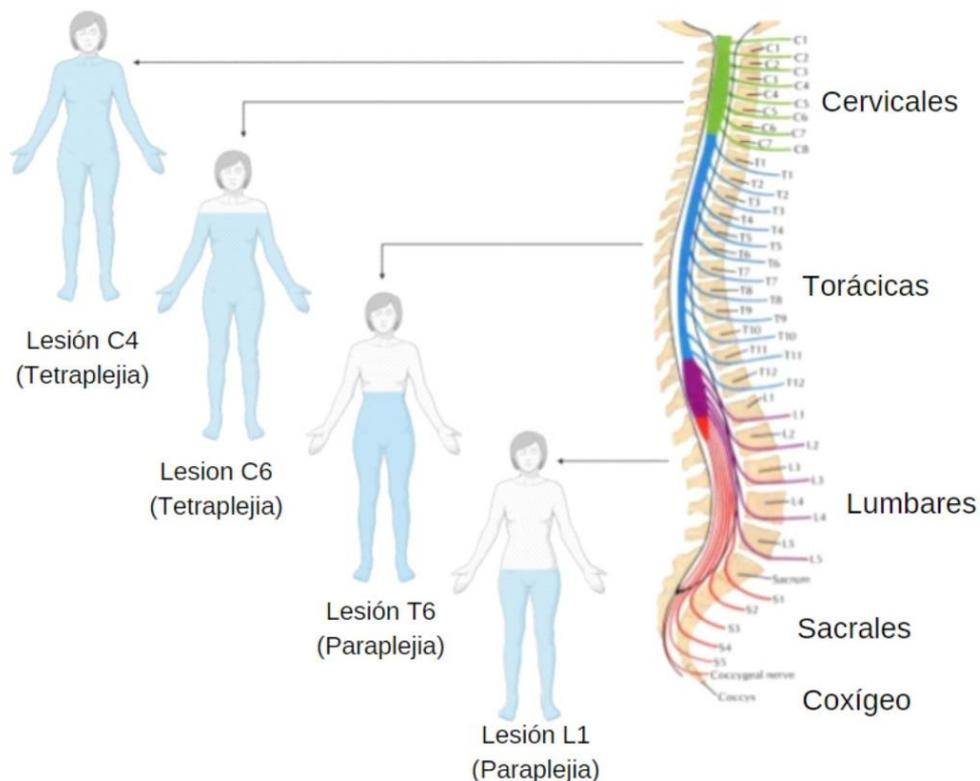


Figura 1. Clasificación de lesiones medulares. Tetraplejía: Se genera por lesiones en niveles superiores (C4-C6), perdiendo la función motora y/o la sensibilidad de las extremidades. Paraplejía: ocurre en segmentos inferiores, la pérdida de sensibilidad y/o movilidad de los órganos y extremidades depende del nivel medular en el que ocurra la lesión.

Si bien existen ciertas formas de mejorar la recuperación luego de una lesión medular, no existen tratamientos que sean del todo efectivos. Algunas de las estrategias que se han desarrollado y prometen una posible restauración son aquellas con terapias celulares y andamios de biomateriales. Se ha observado que la aplicación combinada de estas dos estrategias mejora la regeneración en la médula espinal lesionada (DeBrot et al., 2018). Otros enfoques han sido aumentar los niveles de factores de crecimiento axonales, con el fin de estimular el crecimiento de éstos últimos (Fitch y Silver, 2008). De todas formas, ninguno de estos tratamientos es del todo efectivo, por lo tanto, al día de hoy la mejor terapia es la prevención de este tipo de lesiones.

Fases de las lesiones medulares y cicatriz glial

En las lesiones medulares traumáticas el progreso de la misma se da en dos fases: una lesión primaria y una lesión secundaria. La lesión primaria corresponde al evento de daño en sí mismo, el impacto inicial y la compresión, que podría resultar en el daño de una vértebra y otros materiales de los alrededores. Este impacto inicial conduce a una hemorragia y a muerte celular en el lugar del daño (Oyinbo, 2011). La lesión secundaria ocurre unos minutos luego de la lesión primaria y puede durar minutos, días o incluso meses. Corresponde al daño en la médula espinal producido principalmente por la inflamación e isquemia en la misma (DeBrot et al., 2018).

El mecanismo secundario comienza minutos después de la lesión primaria y durante el proceso la extensión de la lesión puede agrandarse. La fase secundaria presenta una continuación de los eventos iniciados durante la lesión primaria (cambios de electrolitos, liberación de moléculas, edema, muerte celular, etc.) y a éstos se les suman otros eventos nuevos: formación de radicales libres, entrada retardada de calcio, respuesta del sistema inmune, inflamación, isquemia, muerte celular apoptótica, entre otros (Oyinbo, 2011). La isquemia puede causar un aumento en los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno, que pueden llevar al deterioro de la función de distintos organelos, daño en el ADN y lisis de la membrana celular, entre otros (DeBrot et al., 2018). A esto se le suma el daño que genera el sistema inmune mediante la inflamación, el cual ocurre inmediatamente y puede persistir durante varias semanas o incluso meses. La respuesta inflamatoria es fundamental para la eliminación de los desechos celulares, ya que pueden afectar a las neuronas supervivientes al daño primario. Además, la sobre activación de la respuesta inflamatoria puede dañar tejido sano y agravar la lesión (Oyinbo, 2011).

El daño que resulta de las dos fases descritas anteriormente, desencadena mecanismos de reparación que en los mamíferos resulta en lo que se conoce como la cicatriz glial. En efecto, la formación de la cicatriz glial alrededor del

sitio de lesión genera una barrera para el establecimiento de nuevas conexiones neuronales (DeBrot et al., 2018). La cicatriz que se genera en el sitio de lesión consta de dos partes, una fibrótica (acelular) y una glial (celular) (Yuan y He, 2013; Orr y Gensel, 2018). La cicatriz fibrótica está compuesta principalmente de moléculas segregadas por fibroblastos invasores que ocupan el epicentro de la lesión y permiten la sedimentación de una matriz de colágeno (Yuan y He, 2013) (Figura 2). La cicatriz glial consiste principalmente en astrocitos, tejido conectivo y moléculas inhibitorias que previenen la proliferación de células madre endógenas, el crecimiento de nuevos axones y la reparación de axones supervivientes (Fitch y Silver, 2008). Sin la regeneración celular, prácticamente no hay una recuperación funcional. Sin embargo, se ha demostrado que la cicatriz glial es más que solo una barrera física, ya que las células gliales están implicadas en complejas interacciones celulares y moleculares en vista a una prevención de la regeneración (Fitch y Silver, 2008). Por otra parte, la cicatriz glial tiene un componente beneficioso ya que limita la extensión de la lesión.

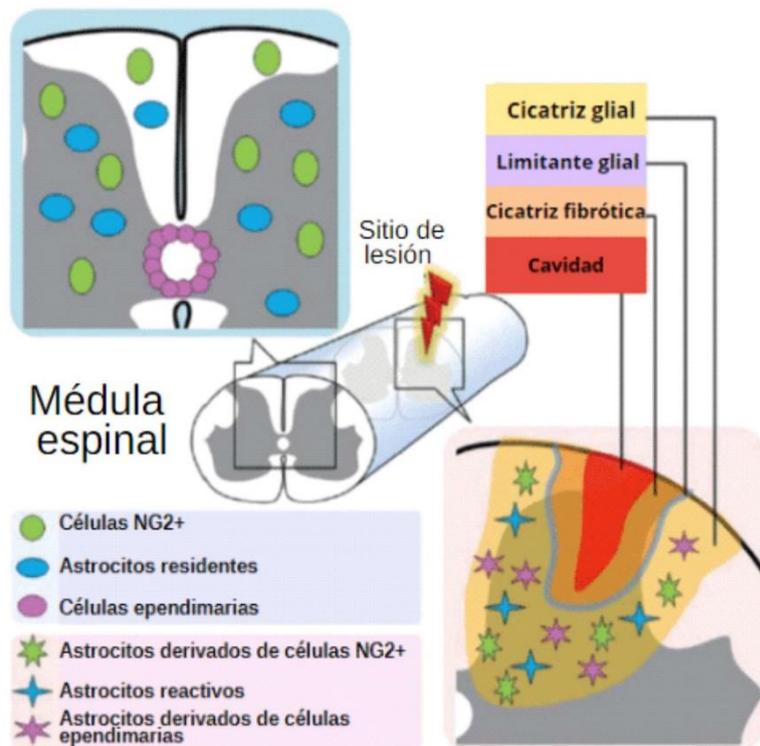


Figura 2. Esquema de la cicatriz glial. La cicatriz que se genera luego de una lesión medular se puede clasificar según sus partes; fibrótica y glial. El principal componente de la cicatriz glial corresponde a los astrocitos (en azul), los cuales rodean y se acumulan en el sitio de la lesión. También es necesario la activación de las células ependimarias (rosa) y las células progenitoras NG2+ (verde). Estas células son capaces de sufrir cambios fenotípicos y su principal destino es la formación de astrocitos reactivos y localizarse en la cicatriz glial (Modificado de Yuan y He, 2013).

El canal central como nicho de células madre

Si bien durante mucho tiempo se creía que la neurogénesis adulta no ocurría en animales como los mamíferos, hoy en día se sabe que este proceso si es posible y que nuevas neuronas se generan a lo largo de la vida en distintas regiones del cerebro. En los mamíferos, se han observado dos regiones en las cuales ocurre este proceso: el giro dentado del hipocampo (DG) y la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales (Gross, 2000; Zhao et al.,

2008; Bonfanti y Peretto, 2011; Braun, y Jessberger, 2014). Durante el desarrollo, los principales precursores del sistema nervioso central son las células neuroepiteliales, las cuales forman el tubo neural. Estas células comienzan un proceso de división celular y adquieren características moleculares y citológicas propias del linaje astrogial, dando lugar a la glía radial (Bjornsson et al., 2015). Se ha demostrado que las células gliales son de hecho las células madre neurales que van a dar lugar a neuronas diferenciadas y células gliales durante el desarrollo y en el cerebro post natal. Tanto las células neuroepiteliales como las glías radiales presentan una polaridad pronunciada, con un polo apical que posee un único cilio primario el cual sobresale hacia la luz ventricular y un proceso distal que se encuentra en contacto con la piamadre, polaridad que es fundamental para determinar el fenotipo de las células madres neurales (Marichal et al., 2016). De todas formas, aunque la glía radial tenga la capacidad de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, se ha visto que los progenitores están comprometidos tempranamente con el destino neuronal o glial, en parte desde las células neuroepiteliales. Este parecería ser el caso de las células endimarias dado que sus progenitores sufren la última división principalmente entre E12 y E16, pero manteniendo las características de la glía radial hasta que se sufren su diferenciación hacia el fenotipo típico, multiciliado y cuboide de los endimocitos (Malatesta y Calzolari, 2008).

En la médula espinal se ha propuesto a las células endimarias como posibles células madre. Las células endimarias tapizan el canal central de la médula y presentan propiedades de células madre neurales *in vitro*, aunque en gran parte se encuentran inactivas (Göritz y Frisén, 2012). Para estudiar las propiedades de células madre se puede realizar un ensayo de neuroesferas. En este ensayo, se coloca un tejido en condiciones generadores de neuroesferas (e.g., medio de cultivo adecuado, factores de crecimiento, etc) y de esta forma se generan agregados de células flotantes a las cuales se les denomina neuroesferas. Posterior a esto se hacen pasajes sucesivos de las células viables. Sólo aquellas células que sean capaces de auto renovarse durante un largo periodo de tiempo y generar progenie diferenciada (astrocitos, oligodendrocitos, células endimarias, entre otros) pueden definirse como células madre neurales. Por otro lado, las células progenitoras (no células madre) tienen una capacidad limitada de autorenovación y/o potencial de diferenciación (Reynolds y Rietze, 2005; Sabelström et al., 2014) (Figura 3A).

Estudios previos han demostrado que las neuroesferas derivadas de las células endimarias son multipotentes y se diferencian en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, lo que implicaría que esta población celular corresponde a una población de células madre (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010). Por otro lado, los astrocitos no parecerían tener gran actividad proliferativa, en cambio estaría restringida únicamente a la autoduplicación ya

que no se ha demostrado que sean capaces de generar progenie no astrocítica (Barnabé-Heider et al., 2010; Sabelström et al., 2014). En cuanto a las células progenitoras de oligodendrocitos, presentan gran actividad proliferativa, pero estas células tampoco muestran propiedades de células madre in vitro, y es probable que estén restringidos únicamente al linaje de oligodendrocitos (Barnabé-Heider et al., 2010; Sabelström et al., 2014) (Figura 3B, 3C).

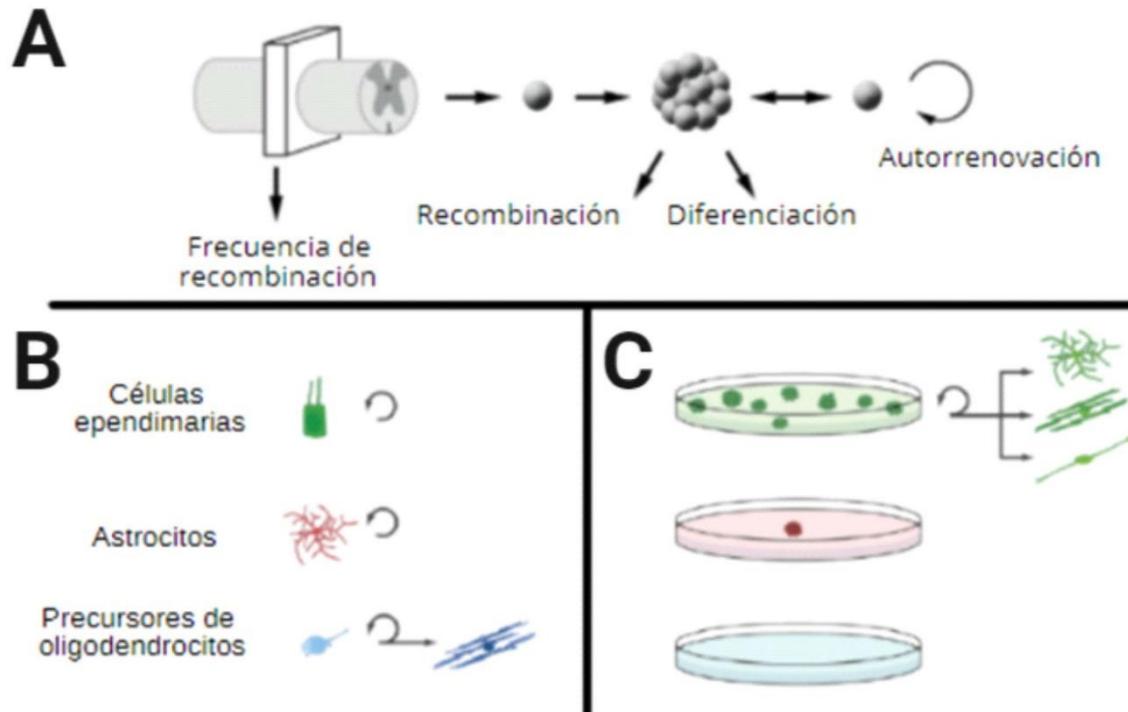


Figura 3. Células madre en la médula espinal. (A) Esquema de la generación de neuroesferas en la médula espinal. La médula espinal se disecciona y se coloca en condiciones que permiten la formación de neuroesferas. La diferenciación en distintas líneas celulares y la auto-renovación de las mismas, confirma que las células ependimarias corresponden a células madre neurales (Modificado de Meletis et al., 2008). (B) Destino de las células en la médula espinal. Los astrocitos y las células ependimarias proliferan pero no producen progenie nueva. Por otro lado, el número de células progenitoras de oligodendrocitos aumenta, lo que implica que las células no solo se autorenewan sino que producen nuevos oligodendrocitos maduros. (C) Potencial de células madres de la médula espinal. Solo las células ependimarias presentan características de células madre neurales, esto ya que pueden autorenewarse luego de varios pasajes en placa y permiten la diferenciación en distintas líneas celulares. Por otro lado, los astrocitos producen una pequeña cantidad de neuroesferas pero incapaces autorenewarse (B y C modificadas de Sabelström et al., 2014).

Las poblaciones de células madre a menudo son heterogéneas y muchas veces coexisten varias células madre distintas para un mismo linaje: en el hipocampo, por ejemplo, se han encontrado al menos dos tipos morfológicos de astrocitos, que dan origen a distintos tipos celulares (Göritz y Frisén, 2012). En la médula espinal, análisis ultraestructurales han revelado que existe también heterogeneidad morfológica en las células ciliadas que contactan con la luz del canal (Meletis et al., 2008; Marichal et al., 2016, 2017). Las más

abundantes corresponden a las células endimarias cuboideas multiciliadas, otro tipo celular abundante es el tanicito, con un único cilio y un solo proceso (Meletis et al., 2008; Sabelström et al., 2014). Por último y en menor medida, se encuentran las células endimarias radiales, que comparten características morfológicas y moleculares con las glías radiales, residen en los polos dorsales y ventrales y poseen un proceso basal que se extiende en el eje dorso-ventral (Meletis et al., 2008; Marichal et al., 2017; Sabelström et al., 2014) (Figura 4)

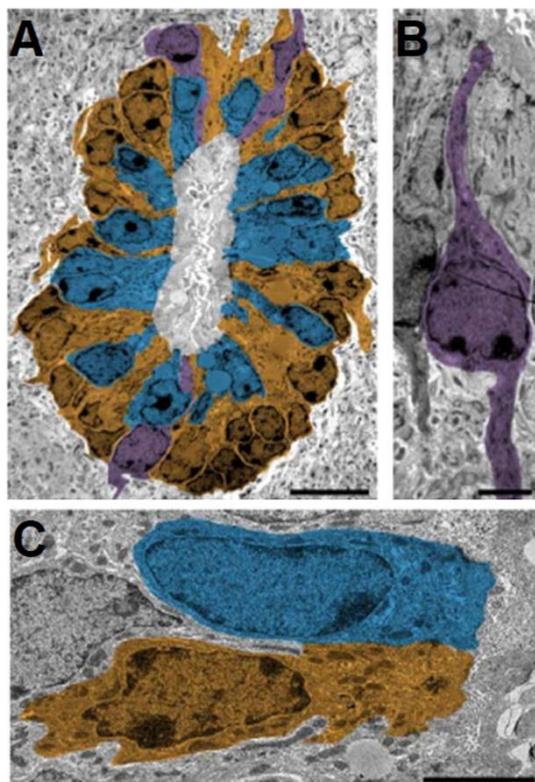


Figura 4. Heterogeneidad del canal central. El análisis ultraestructural de la médula espinal ha revelado que, el canal central presenta gran heterogeneidad. Las células más abundantes corresponden a células endimarias cuboideas multiciliadas (en azul), al cual le siguen los tanicitos (marrón) que tienen un único cilio y un solo proceso. Las menos abundantes son las células endimarias radiales (violetas) que se encuentran en los polos y tienen un único proceso basal (Modificado de Meletis et al., 2008).

Se ha demostrado que en respuesta a una lesión medular, las células endimarias comienzan a proliferar de forma dramática, y su progenie migra desde la capa endimaria hacia el sitio de lesión, donde se diferencian casi exclusivamente en astrocitos (Sabelström et al., 2013) (Figura 5). Las células endimarias ocupan gran parte del área en el tejido cicatricial 2 semanas después de la lesión y su morfología no presenta cambios drásticos (Meletis et al., 2008). La cicatriz glial normalmente está compuesta por astrocitos residentes que forman la periferia de la cicatriz y astrocitos derivados de células endimarias que forman la parte central (Meletis et al., 2008) que en su mayoría son negativos para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Sabelström et al., 2013). El aumento de la proliferación después de la lesión tanto de los astrocitos como de los progenitores de oligodendrocitos conduce a la generación de nuevas células restringidas a su propio linaje, mientras que las células endimarias muestran un repertorio de diferenciación alterado después de la lesión (Barnabé-Heider et al., 2010).

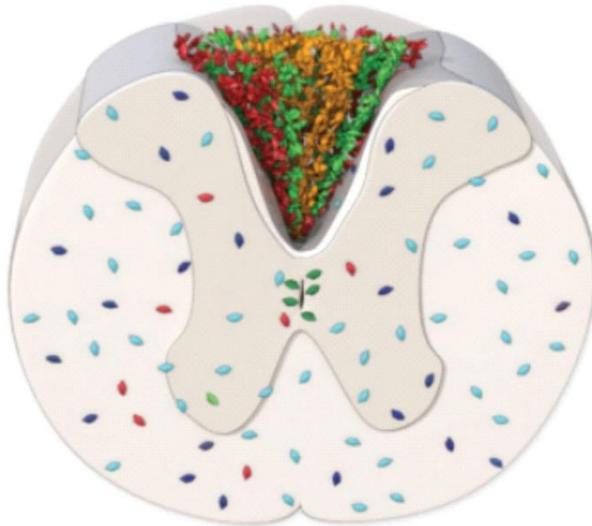


Figura 5. Distribución de las células luego de una lesión medular. Cuatro meses luego de una lesión medular las células endimarias (verde), los astrocitos (rojo), las células progenitoras de oligodendrocitos (azul) y los pericitos tipo A (naranja) producen una nueva progenie que contribuye en la formación de la cicatriz glial (Modificado de Sabelström et al.,2014).

Estudios realizados en el laboratorio de Neurofisiología Celular y Molecular del instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, del cual formo parte y en el cual he realizado los estudios vinculados a mi tesina, han evaluado el rol del receptor purinérgico P2X7. Los datos obtenidos por Marichal et al. (2016) demuestran que altas concentraciones de ATP activan a estos receptores, lo que genera una corriente de entrada y ondas de Ca^{2+} que se propagan por toda la célula. En este escenario, los receptores P2X7 presentan características únicas que podrían llevar a que el mismo funcionara como un detector de daño tisular luego de una lesión medular. Es posible, que la liberación de ATP en los sitios de injuria activen a estos receptores y generen así las corrientes entrantes de Ca^{2+} que se observan, y estas podrían llevar a distintos cambios fenotípicos y moleculares en las células que podrían afectar procesos tales como la proliferación, diferenciación y migración de las mismas (Marichal et al., 2016). Estos datos se correlacionan con los resultados obtenidos por Wang et al. (2004) en los cuales se observa que luego de una lesión medular provocada por contusión se genera una alta y sostenida liberación de ATP alrededor del epicentro del impacto. La aplicación de oxATP (un antagonista de este receptor) produce una mejora en la recuperación funcional cuando se compara con animales control (sin administración del antagonista). El estudio de este receptor ha continuado en el laboratorio y en los últimos años se ha puesto énfasis en su rol frente a una lesión en la medula espinal. Esta investigación está centrada en el estudio del potencial rol del receptor purinérgico P2X7 en la reactivación del nicho endimario luego de una lesión medular (Maciel, 2019). Teniendo en cuenta estos antecedentes, y en vista de que los receptores purinérgicos están reportados en distintas lesiones y enfermedades, nos planteamos estudiar el rol de un receptor huérfano del cual hasta la fecha hay poco conocimiento, el receptor GPR17, poniendo énfasis en su participación en la respuesta de las células endimarias a la lesión espinal.

El receptor GPR17

Además de los roles metabólicos, los nucleótidos de adenina (ATP, ADP), los de uracilo (UTP, UDP) y los nucleótidos de azúcar (ej. UDP-glucosa, UDP-galactosa) son moléculas de señalización universales y filogenéticamente antiguas, involucradas en una multitud de procesos biológicos (Parravicini et al., 2008). Durante la lesión de la médula espinal, se liberan de forma masiva moléculas de señalización de daño e inflamación. Dentro de las moléculas liberadas se encuentran los nucleótidos extracelulares y sus derivados, principalmente los nucleótidos de adenina (ATP, ADP) pero también nucleótidos de uracilo (UDP, UTP) (Di Virgilio et al., 2009; Idzko et al., 2014). También se liberan moléculas que inducen la inflamación como los leucotrienos (LTC4 y LTD4), (Ciana et al, 2006). El rol de estas moléculas es filogenéticamente antiguo y universal, desde plantas a animales, y su acción es dependiente de los receptores de membrana específicos: siete canales purinérgicos catiónicos no selectivos P2X activados por ligando, y ocho receptores P2Y acoplados a proteína G (Abbracchio et al., 2003). Los nucleótidos y sus derivados activan a los receptores metabotrópicos P2Y, o a los receptores ionotrópicos P2X (Abbracchio et al., 2006; Surprenant and North, 2009; Coddou et al., 2011) regulando distintas funciones celulares. Por otro lado, los cisteinil leucotrienos (CysLTs) son mediadores lipídicos que activan principalmente los receptores CysLT del tipo 1 y 2 generando una respuesta inflamatoria en la periferia y cerebro (Wang et al, 2020). Entre los receptores P2Y y los receptores CysLT se han encontrado relaciones estructurales y filogenéticas estrechas, y los mismos se agrupan en el “grupo de receptores de purina” de los receptores acoplados a proteína G (GPCR), el cual incluye un gran número de receptores “huérfanos” aun sin caracterizar (Parravicini et al., 2008).

El receptor huérfano GPR17 pertenece a la familia de receptores P2Y y se encuentra en una posición intermedia entre los receptores P2Y los receptores CysLT. Análisis genómicos han revelado dos posibles marcos de lectura que codifican para dos isoformas de un receptor, una corta y otra larga, de 339 y 367 aminoácidos, respectivamente (Pugliese et al., 2009). Se ha observado, que tanto el UDP como sus derivados y los LTD4 generan la activación del receptor huérfano GPR17, con una respuesta dependiente de la concentración (Ciana et al 2006, Lecca et al 2008) (Figura 6).

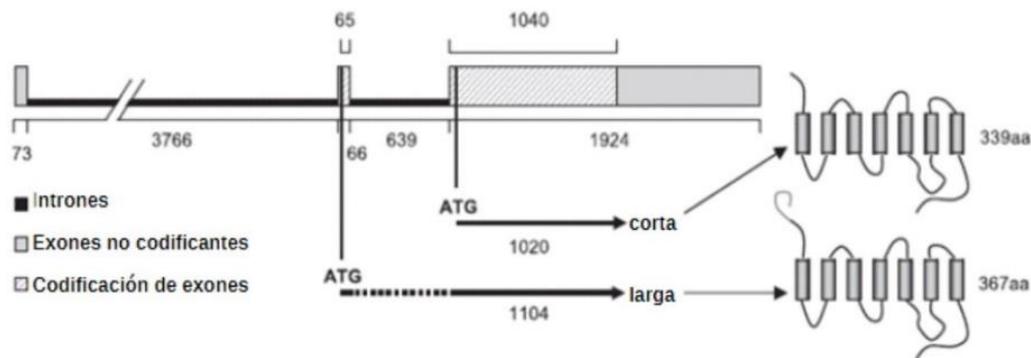


Figura 6. Esquema de la estructura génica del gen GPR17. El gen hGPR17 consta de 3 exones y mediante el mecanismo de splicing alternativo se pueden producir dos isoformas distintas. Una isoforma corta de 1020pb y una larga de 1104pb (Modificado de Pugliese et al., 2009).

El análisis de la distribución del receptor ha mostrado que la isoforma larga se encuentra altamente expresada en el cerebro, pero no en otros tejidos estudiados. Por otro lado, la isoforma corta se encuentra altamente expresada en órganos que sufren lesiones isquémicas, como el cerebro, corazón y riñón, y una expresión muy baja en hígado y pulmón (Ciana et al., 2006, Pugliese et al., 2009). En el cerebro, el receptor GPR17 se ha reportado en neuronas y células precursoras tanto en el parénquima como en nichos neurogénicos. Actualmente se reconoce al GPR17 como un marcador de fase intermedia durante la diferenciación de progenitores de oligodendrocitos (Fumagalli et al., 2016). Se ha demostrado que la expresión del receptor aumenta durante la diferenciación morfológica *in vitro*, siendo máxima en pre-oligodendrocitos inmaduros y luego comienza a disminuir en la maduración de estas células (Fumagalli et al., 2011) (Figura 7).

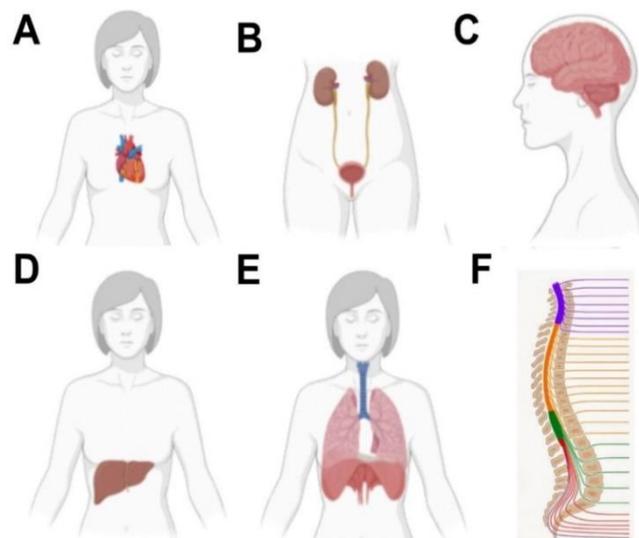


Figura 7. Expresión del receptor GPR17. El receptor se ha visto expresado principalmente en órganos propensos a sufrir lesiones isquémicas, como (A) corazón, (B) riñón y (C) el cerebro. En menor medida se lo ha reportado en el (D) hígado y (E) el pulmón. (F) También se ha comprobado su presencia en la médula espinal.

Dada la expresión del receptor GPR17 en órganos que sufren este tipo de lesiones, se ha explorado el rol de este en distintos modelos de trauma. En un modelo de daño isquémico en cerebro se observó un aumento de la expresión de GPR17 alrededor del epicentro de la lesión (Ciana et al., 2006; Lecca et al., 2008). Por otro lado, en modelos experimentales de lesión de la médula espinal se observa un daño progresivo del tejido, una disminución en el número de células neuronales y una proliferación en el número de monocitos/macrófagos en la zona del traumatismo (Ceruti et al., 2009). También se observa un aumento en el número de células GPR17 positivas, las cuales representan una nueva población celular (Ceruti et al., 2009). Esto podría correlacionarse con intentos regenerativos dirigidos a reparar el tejido (Boda et al., 2011). La expresión máxima del receptor se observó durante la migración/infiltración de las células en la zona de lesión, pero una vez que este proceso se completa, la expresión disminuye (Ceruti et al., 2009; Lecca et al., 2008). Datos obtenidos en pacientes humanos que sufren daños cerebrales han mostrado la expresión del receptor GPR17 en células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs) y en neuronas piramidales, dentro o en los bordes del núcleo traumático, y la activación del mismo es proporcional al daño sufrido (Franke et al., 2013). Cabe destacar, que a diferencia de los datos obtenidos en roedores en los cuales nunca se ha visto expresado el receptor GPR17 en astrocitos positivos para GFAP, en pacientes que sufren traumatismo craneoencefálico (TCE), se ha encontrado un subconjunto de astrocitos reactivos que expresan este receptor (Franke et al., 2013).

Estudios previos muestran que nucleótidos de uracilo y cisteinil leucotrienos generan la activación del receptor GPR17 en el cerebro (Ceruti et al., 2009). Asimismo, estudios realizados en cultivos celulares obtenidos de riñón, muestran que estas moléculas efectivamente funcionan como agonistas del receptor (Buccioni et al., 2011). Estos resultados se han confirmado para ambas isoformas, aunque estudios han demostrado que la isoforma larga podría tener una respuesta más potente frente al UDP-glucosa que la isoforma corta (Pugliese et al., 2009).

La activación del receptor por nucleótidos de uracilo y leucotrienos se ha visto inhibida por distintos antagonistas, entre ellos Cangrelor, Pranlukast y Montelukast (Lecca et al., 2008). La inhibición del receptor con los antagonistas Montelukast y Cangrelor luego de una lesión en cerebro, evita un aumento en el daño de la misma entre las 24 y 48 horas siguientes (Ciana et al., 2006). Asimismo, mediante silenciamiento genético del receptor se observó una atenuación en la evolución en la zona de lesión. Estos resultados muestran que el silenciamiento del receptor contribuye a la protección contra el daño en el tejido. El receptor GPR17 se ha reportado como regulador negativo de la diferenciación y mielinización por parte de los oligodendrocitos, y el uso de

antagonistas del receptor se ha mostrado que promueve la diferenciación en las células precursoras de oligodendrocitos (Ou et al., 2016).

De esta forma, todo indica que el receptor podría actuar como un sensor del daño luego del trauma y podría estar involucrado en la reparación del sitio de lesión, lo que concuerda con el rol de los nucleótidos endógenos y sus receptores específicos como señales de daño.

El receptor GPR17 y la médula espinal

En la médula espinal el receptor GPR17 se expresa en neuronas y oligodendrocitos en distintas etapas de maduración (Ceruti et al., 2009). Asimismo, un estudio lo ha reportado en las células ependimarias alrededor del canal central de la medula espinal, pero nunca se ha visto expresado en astrocitos en tejidos de roedores (Ceruti et al., 2009).

Por otro lado, en lesiones de medula espinal realizadas en ratones a los cuales se les administra Montelukast, un antagonista del receptor, se ha mostrado una mejoría en los animales, tanto en la recuperación motora, en la lesión tisular y en la infiltración celular, entre otras (Genovese et al., 2008). En lesiones medulares realizadas en ratas, también se ha observado que Montelukast tiene un efecto neuroprotectivo, previene y retarda la degeneración neuronal, y mejora el rendimiento motor (Cavus et al., 2014; Korkmaz et al., 2015). Se sugiere que los efectos protectores de Montelukast podrían atribuirse potencial de acción antioxidante, antiinflamatoria y neuroprotectora (Korkmaz et al., 2015).

Dada la limitada información que se tiene acerca del receptor GPR17 y debido a la creciente evidencia que confirmaría la participación del mismo en distintos procesos biológicos, es crucial ampliar el conocimiento que se tiene sobre el posible rol funcional de este receptor en la médula espinal. Además, debido a que la actividad del receptor se ha reportado en distintas enfermedades y procesos patológicos como daños cerebrales, daños isquémicos y daños generados en la médula espinal; es de vital importancia poder dilucidar los procesos en los cuales el receptor está involucrado y así poder diseñar en un futuro posibles terapias que permitan una mejoría en la condición de vida de aquellos que sufren este tipo de lesiones. En este trabajo nos planteamos estudiar el rol del receptor GPR17 en las células ependimarias del canal central, poniendo principal énfasis en su acción frente a una lesión medular, ya que creemos que el mismo podría estar involucrados en procesos como la activación, proliferación y migración de estas células frente a este tipo de injuria.

Objetivos

Estudiar el rol del receptor GPR17 en la respuesta de un nicho “latente” de células madre a la lesión de la médula espinal.

Objetivos específicos

- Demostrar la presencia del receptor GPR17 en las células ependimarias del canal central de la médula espinal.
- Caracterizar la acción del receptor en la lesión de médula espinal mediante la activación farmacológica del receptor in vivo:
 - 1) evaluar los cambios proliferativos y fenotípicos de las células ependimarias.
 - 2) evaluar la migración de células derivadas del epéndimo.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando ratones transgénicos FoxJ1CreER-R26RtdTomato, obsequio del Prof. Frisén (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010), ratones hGFAP-GFP donación del Prof. Kirchoff (Nolte et al., 2001) y ratones C57Bl/6J (“silvestres”). Los ratones FoxJ1CreER-R26RtdTomato son inducibles mediante inyecciones intraperitoneales de tamoxifeno (Sigma 2 mg/kg, 20 mg/ml 1:9 EtOH absoluto: aceite de maíz) diariamente durante cinco días, expresando el gen reportero tdTomato selectivamente en las células con cilio mótil (con el factor de transcripción FoxJ1 activo). Se aguarda al menos cinco días para asegurar la depuración de la droga y luego se prosigue con los protocolos experimentales. Por otro lado, los ratones hGFAP-GFP expresan el reportero GFP de forma constitutiva bajo el control del promotor del gen que codifica la proteína GFAP (Figura 8).

Los ratones se criaron en el bioterio de roedores del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable siguiendo las pautas del Comité local de cuidado de animales. Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas, con un fotoperiodo de luz oscuridad de 12 horas con agua y alimento “ad libitum”. Los experimentos se llevarán a cabo con animales adultos de 3 meses aproximadamente y un peso entre 25-35 gramos.

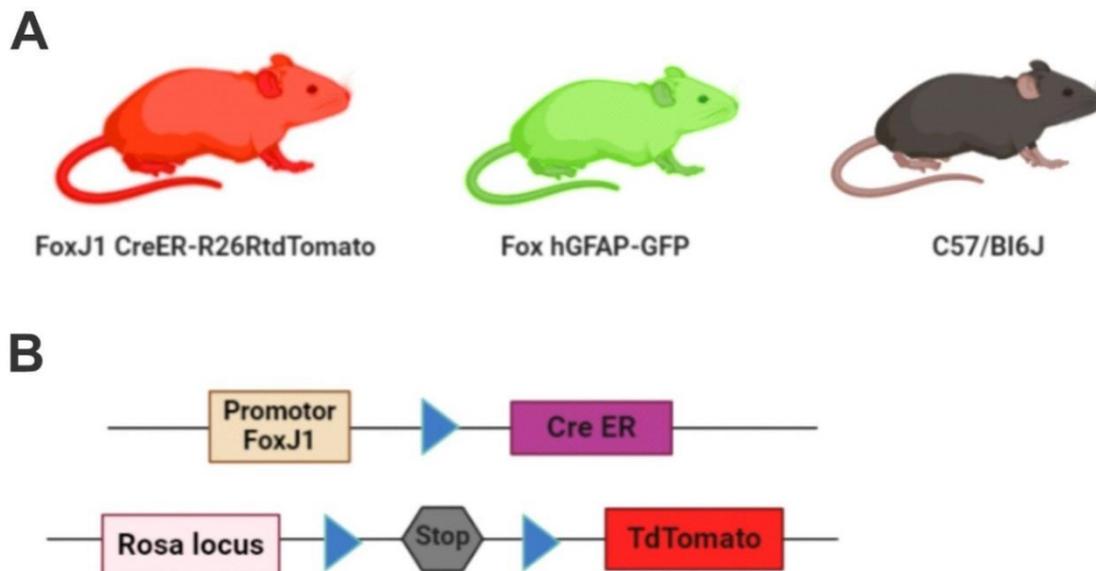


Figura 8. Animales de experimentación (A) Ratones utilizados en los distintos experimentos, la línea transgénica. De derecha a izquierda: FoxJ1CreER-R26RtdTomato que expresa el gen reportero TdTomato al ser inducido con tamoxifeno, la línea Fox hGFAP-GFP que expresa de forma constitutiva la proteína GFAP con el reportero GFP y los ratones “silvestres” C57/Bl6J. (B) Esquema de la construcción del ADN transgénico de la línea FoxJ1CreER-R26RtdTomato.

Inyecciones intramedulares

Con el fin de estudiar el rol del receptor GPR17 se realizaron inyecciones intramedulares de 1 μ l del agonista UDP-glucosa a distintas concentraciones (100 μ M, 1 mM y 100 mM), disuelto en solución salina y como control se realizaron inyecciones de 1 μ l de solución salina. Previo a las inyecciones los animales se sedaron con Diazepam (5 mg/kg i.p.) y anestesiaron con Ketamina (100 mg/kg i.p.) y Xilacina (10 mg/kg i.p.). Luego se procedió a la realización de una laminectomía y una vez expuesta la médula espinal se realizaron las inyecciones (Figura 9A).

Las inyecciones intramedulares se realizaron con micropipetas de vidrio graduadas, las cuales fueron estiradas con un estirador de pipetas *Sutter* con el fin de obtener una punta aproximada de 40 μ m de diámetro. Las micropipetas se colocaron en un "holder" el cual estaba controlado por un micromanipulador motorizado. Las coordenadas de inyección fueron 700 μ m de profundidad (desde la superficie dorsal de la médula) y 550 μ m desde la línea media (Figura 9B). Para visualizar el área de inyección, el UDP-glucosa fue inyectado junto con fluoresceína (0.02 g/ml), lo que permitió ver el halo de inyección por microscopía confocal luego de la fijación del tejido. Las micropipetas se introdujeron en la médula en pasos de 20 μ m con el fin de minimizar lesiones mecánicas y le droga se inyectó con una velocidad de 0.1 μ l/min. Luego de cada inyección se aguardó 10 minutos y posteriormente se retiró la pipeta en pasos de 20 μ m cada 15 s para evitar la presión negativa.

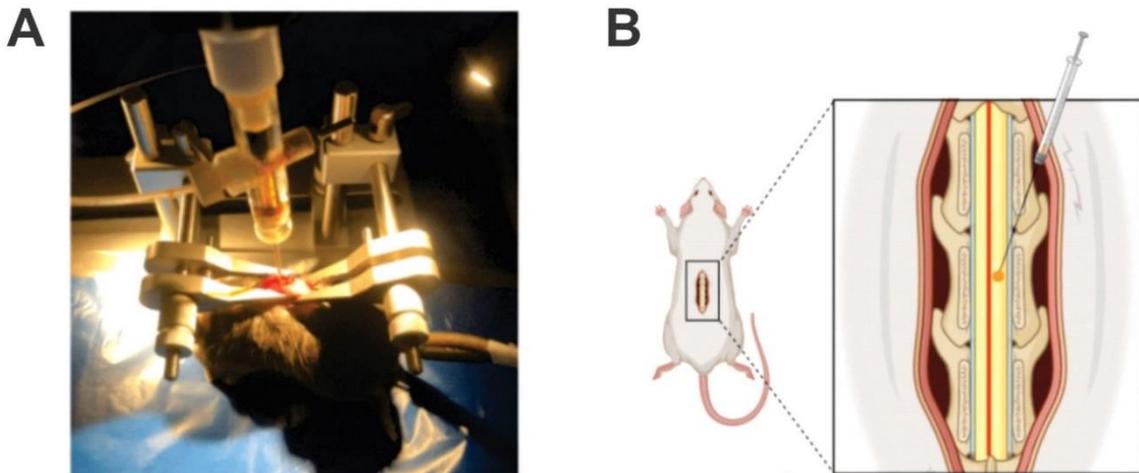


Figura 9. Inyecciones intramedulares. (A) Set up con animal posicionado en el holder, con la médula espinal expuesta y la micropipetas en posición para la inyección intramedular. (B) Esquema del lugar de inyección, a 700 μ m de profundidad y 550 μ m desde la línea media de la médula espinal (marcada en rojo) hacia el lateral izquierdo. Las inyecciones se dieron junto con fluoresceína para poder visualizar el área de inyección.

Luego de las inyecciones se suturaron los distintos planos y se revirtió el efecto sedante mediante la administración intraperitoneal de flumazenil (0.5 mg/kg i.p.), yohimbina (2 mg/kg i.p.) y tramadol (3 mg/kg). Para aliviar el dolor se administró tramadol (3 mg/kg) vía subcutánea 24 horas luego de la cirugía. Los animales se mantuvieron en cajas individuales durante 8 días luego de la lesión para luego ser sacrificados y fijados por perfusión (ver más abajo).

Perfusión y procesamiento del tejido

En todos los casos la sobrevivencia de los animales fue de 8 días post-tratamiento. Al octavo día del tratamiento los animales fueron sedados con Diazepam y anestesiados con Ketamina y Xilacina como se mencionó previamente. Previamente a la fijación se lavó el sistema vascular con suero fisiológico suplementado con nitrito de sodio y 200 µl de citrato de sodio. Luego el tejido se fijó con 50 ml de paraformaldehído al 4% (PFA) en buffer fosfato (PB, pH 7.4). Una vez culminada la perfusión, la médula espinal se disecó y de ser necesario se dejó post-fijando en PFA para una mejor fijación del tejido.

Una vez disecada la médula, la misma se lavó en PB para luego realizar bloques de gelatina, albumina y glutaraldehído (1 ml de albumina al 45%, 500 µl de gelatina al 1.5%, 60 µl of glutaraldehído). Se realizaron dos bloques de la médula, uno centrado en el sitio de inyección (+/- 4 mm) y otro con las secciones caudales y rostrales adyacente a la inyección (Figura 10).



Figura 10. Procesamiento del tejido. Esquema del procesamiento de tejido, en primer lugar se hace la disección y división de la médula, marcando el S0 (lugar de inyección). Se generan dos bloques a partir de la médula, uno que abarca el S0 y los segmentos adyacentes a éste, el segundo bloque corresponde a los segmentos no adyacentes. Los bloques luego se cortan con el vibratomo/ criostato y éstos se almacenan en PB-Azida hasta su uso.

Inmunohistoquímica

Para la visualización del receptor GPR17 se realizaron varios ensayos de inmunohistoquímica con el fin de poner a punto la técnica y lograr observar el mismo en los tejidos estudiados. En un primer momento se realizaron rodajas en criostato y vibrátomo de médula espinal en el plano transversal (30 y 70 μm de espesor respectivamente). Para realizar los cortes en criostato, se disecó la médula y luego se mantuvo en solución crioprotectora (sacarosa al 30%) durante 24 hs y posterior a esto se congeló rápidamente en un baño con nitrógeno líquido. Por otro lado, en el caso de los cortes de vibrátomo, la médula se disecciona y se realizan bloques de gelatina, albumina y glutaraldehído como se explicó previamente. Como control positivo, se realizaron secciones coronales de corteza del cerebro en donde ya se ha demostrado la presencia del receptor. El cerebro se trató bajo las mismas características que la médula para ser cortada en criostato y vibrátomo.

Una vez obtenidos los cortes se incubaron con el anticuerpo primario en una solución permeabilizante durante 72 hs a 4°C. Se utilizaron dos anticuerpos anti-GPR17 diferentes, de las empresas Alomone (Cat #: AGR-048) y Cayman Chemicals (Item No. 17087).

El anticuerpo anti-GPR17 (Alomone) se probó en tres diluciones diferentes 1:100, 1:300 y 1:500. Luego se realizaron 3 lavados con PB durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugados con un fluoróforo Alexa 488 en una concentración 1:500. Este anticuerpo también se probó con un anticuerpo secundario biotinilado en concentraciones 1:5000 y 1:1000. En un tercer ensayo, al anticuerpo de Alomone se le realizó también un proceso de “*retrieval*” el cual consiste en solución de citrato de sodio 100 μM , pH 9 a una temperatura de 80 °C durante 35 minutos.

En el caso del anticuerpo de Cayman Chemicals se utilizó únicamente una concentración 1:300 y luego se prosiguió con los 3 lavados con PB y la posterior incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo explicado previamente.

Por último, en todos los casos, se realizaron lavados con PB y luego los cortes se montaron sobre los portaobjetos para su análisis por microscopía confocal. Para el análisis de datos se procesaron en promedio 10 secciones del bloque centrado en la lesión o inyección.

Ensayos de proliferación celular

Para evaluar cambios en la proliferación celular utilizamos 2'-desoxi-5-etiniluridina (EdU), un análogo de la timidina que se incorpora al ADN durante la fase S de la división celular. El protocolo consistió en 2 inyecciones intraperitoneales de EdU (40 mg/kg) por día, con un intervalo de cuatro horas entre cada inyección, las cuales comienzan 48 horas luego de la inyección intraespinal durante 3 días consecutivos.

Para revelar el EdU las secciones se permeabilizan con buffer PB-tritón al 1% durante 1 h, luego se hacen dos lavados con PB BSA (albumina) 3% durante 10 minutos. Por último las secciones se incubaron durante 4 h según el *Click-it kit Plus Alexa flúor 647* de Invitrogen para finalmente hacer dos lavados en PB BSA 3% durante 10 min. A las muestras también se les realizó DAPI con el fin de visualizar los núcleos celulares. Por último, se colocaron en un portaobjetos para luego observar las muestras en el microscopio confocal.

Análisis de los datos

Para el análisis estadístico se utilizó un total de 16 animales de ambos sexos. Para el grupo control se utilizaron 4 animales. Para las inyecciones de UDP-glucosa se utilizó un total 12 animales en las tres concentraciones diferentes: UDP-glucosa 100 μ M (n=2), 1 mM (n=5) y 100 mM (n= 5) (Tabla 1).

Condición	Número de animales
Control	4
UDP-glucosa 100 μ M	2
UDP-glucosa 1 mM	5
UDP-glucosa 100 mM	5

Tabla 1. Número de animales utilizados en cada condición experimental.

Los resultados en los ensayos de proliferación celular se expresaron como el número de núcleos EdU positivos por rodaja en una región de interés delimitada por el epitelio ependimario. Por otro lado, la expresión de GFAP en el canal central se cuantificó midiendo el área ocupada por la proteína GFP utilizando el programa Fiji (Imagen J, NIH). En general, la cuantificación se llevó a cabo por dos observadores independientes y los datos finales fueron un promedio de ambos si se correlacionan estadísticamente. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con Graph Pad Prism 8 y el test estadístico utilizado fue ANOVA con comparaciones múltiples de Tukey. Se consideró estadísticamente significativo aquellas comparaciones con $p < 0.05$. Los resultados se expresaron como la media \pm el desvío estándar.

Resultados

El receptor GPR17 se expresa en las células endimarias del canal central

Estudios previos han demostrado la presencia del receptor GPR17 en ratas y humanos, principalmente en tejidos que sufren daño isquémico como el cerebro, el corazón y el riñón (Ciana et al., 2006, Blasius et al., 1998). Por otro lado, Ceruti et al. (2009) desarrollaron un anticuerpo que reveló la presencia del receptor en las células endimarias del canal central en ratones CD1. Así, a pesar de la escasa información en la literatura, buscamos poner a punto la inmunohistoquímica para el receptor GPR17 utilizando anticuerpos comerciales con el fin de estudiar la posible presencia de este receptor en las células endimarias de la médula espinal.

Inicialmente, realizamos una inmunofluorescencia contra el receptor GPR17 en cortes transversales (obtenidos en criostato y vibrátomo) de la región toracolumbar de la médula espinal de ratones adultos C57, utilizando el anticuerpo de Alomone Labs. Se probaron tres diluciones 1:100, 1:300 y 1:500. Como control positivo, se utilizaron cortes coronales del cerebro del mismo ratón cortados en criostato y vibrátomo. Al realizar la inmunohistoquímica, ninguna de las condiciones ensayadas mostró la presencia del receptor (datos no ilustrados) con el anticuerpo elaborado por Alomone. La segunda estrategia experimental fue realizar un proceso de retrieval con citrato de sodio de forma de optimizar la exposición de los epítopes. Se utilizaron las mismas diluciones nuevamente en cortes de medula y cerebro cortados en criostato y vibrátomo. Luego de este proceso, tampoco se pudo observar la presencia del receptor en los tejidos estudiados (Figura 11). La tercera estrategia experimental fue el uso de un anticuerpo secundario biotinilado. En este caso solo se usó una dilución 1:300 del anticuerpo de Alomone. Nuevamente se usaron cortes de cerebro y médula cortados en criostato y vibrátomo. El revelado de la inmuno nuevamente no mostró ninguna señal en los tejidos utilizados (datos no ilustrados). Concluimos que en nuestras manos y con los procedimientos utilizados rutinariamente en el laboratorio, el anticuerpo de Alomone Labs no es apropiado para la inmunohistoquímica del receptor GPR17.

Posteriormente probamos el anticuerpo de Cayman Chemicals (Item No. 17087). Intentamos las mismas tres concentraciones en rodajas de vibrátomo y criostato de cerebro y médula espinal. En este caso, la inmunohistoquímica reveló claramente la presencia del receptor GPR17 en la corteza cerebral de los cortes realizados en criostato con la concentración del anticuerpo 1:300. También logramos visualizar una alta expresión del receptor GPR17 en las

células endoteliales del canal central de la médula espinal en cortes de criostato con la concentración 1:300 (figura 12). Por otro lado, en los cortes realizados en vibrátomo, la presencia del receptor no pudo observarse con nitidez. Los ensayos realizados lograron establecer la presencia de receptores GPR17 en médula espinal y los procedimientos de inmunohistoquímica que permiten su estudio.

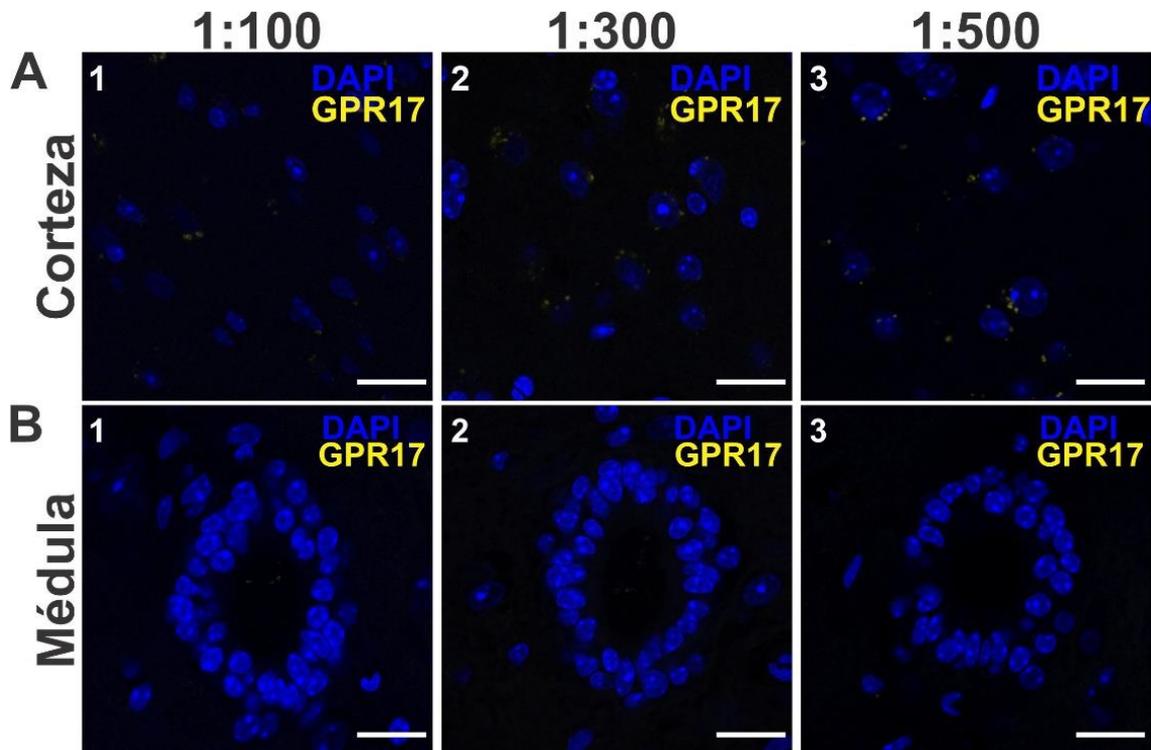


Figura 11. Inmunohistoquímica contra el receptor GPR17 utilizando anticuerpo Alomone y retrieval. Prueba de inmunohistoquímica contra el receptor GPR17 con el fin de visualizar su expresión en la corteza cerebral (A) y en las células endoteliales del canal central (B) de un ratón silvestre C57. Se probaron distintas concentraciones del anticuerpo Alomone con un proceso de retrieval, 1:100 (A1 y B1), 1:300 (A2 y B2) y 1:500 (A3 y B3). Cortes obtenidos con vibrátomo, con un grosor de 70µm de espesor. Imágenes tomadas a 63X, la escala representa 20µm.

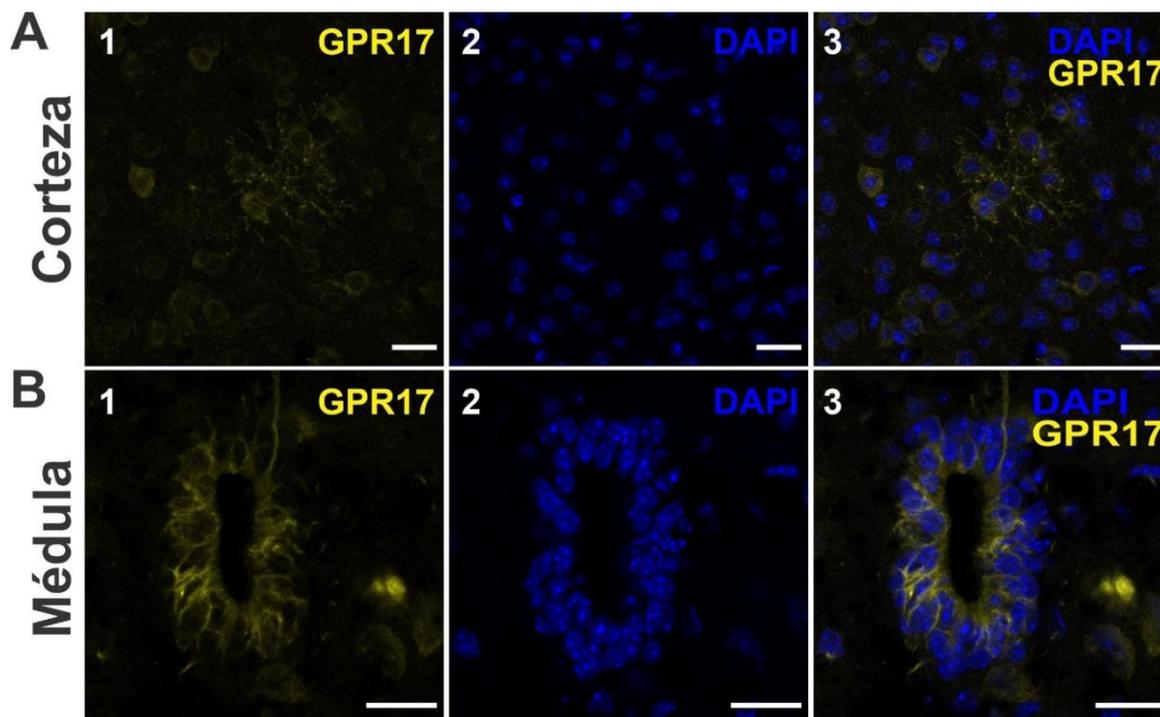


Figura 12. Inmunohistoquímica contra el receptor GPR17 utilizando anticuerpo Cayman Chemicals. Cortes transversales de médula espinal y como control se utilizaron cortes coronales de la corteza cerebral, en ambos casos se utilizaron ratones adultos C57. Se logró comprobar la expresión del receptor en el cerebro (A1) y en las células endoteliales del canal central de la médula espinal (B1). También se realizó DAPI (A2 y B2), por último se muestra el MERGE en ambos casos (A3 y B3).

La activación del receptor GPR17 aumenta la proliferación de las células endoteliales

Si bien el receptor GPR17 sigue siendo un receptor huérfano, se sabe que es un receptor dual capaz de responder a nucleótidos de uracilo (UDP, UDP-glucosa) y también a leucotrienos (LTD4, LTC4) (Ciana et al., 2006, Lecca et al., 2008, Pugliese et al., 2009). Basándonos en estos datos, procedimos a evaluar el rol de la inyección intraespinal de UDP-glucosa, lo cual simula la activación del receptor GPR17 que se produciría luego de una lesión.

Para evaluar el perfil de activación del mismo por UDP-glucosa, se analizaron distintas concentraciones de esta molécula en la médula espinal mediante inyecciones intramedulares (Figura 13). Ya que a la fecha aún no hay trabajos en los que se realicen inyecciones intramedulares de UDP-glucosa u otro agonista, realizamos un estudio dosis-respuesta utilizando 3 concentraciones de UDP-glucosa de 100 μ M, 1 mM y 100 mM.

Inicialmente, se realizaron inyecciones intramedulares de soluciones del agonista de las menores concentraciones: 100 μM , y 1mM. El rango entre 100 μM y 1 mM es el más utilizado en los ensayos in vitro para este receptor (Pugliese et al., 2009, Fumagalli et al., 2011, Zhao et al., 2018). Luego de 8 días desde la inyección se evaluó la respuesta proliferativa de las células endimarias, con un ensayo de proliferación con EdU. De esta forma, al cuantificar los núcleos EdU+, se observó que las concentraciones de 100 μM y 1mM no generaron un aumento de la proliferación de las células con respecto a los animales inyectados con solución salina (Figura 13). En todos los casos, se observaron muy pocos núcleos EdU+ y la respuesta no fue significativa respecto al control (6 ± 4.69 núcleos EdU+/rodaja) y tampoco entre las concentraciones de UDP-glucosa 100 μM (9 ± 4.24 núcleos EdU+/rodaja) y 1 mM (6.2 ± 4.55 núcleos Edu+/rodaja) ($p= 0.9990$ control vs 100 μM ; $p= 0.9999$ control vs 1 mM; $p=0.9991$ 100 μM vs 1 mM) (Figura 13 y 14C).

Luego de esto se evaluó la respuesta de las células endimarias frente a una concentración más alta del agonista. En este caso las inyecciones intramedulares fueron de 1 μl de UDP-glucosa de una concentración de 100 mM (Figura 14). A los 8 días post inyección se pudo observar un aumento significativo de los núcleos EdU+ (116.2 ± 42.64 núcleos EdU+/rodaja) con respecto al control ($p= 0.0001$). Este aumento también resultó significativo con respecto a las otras concentraciones de UDP-glucosa testeadas (Figura 14). En resumen, los resultados mostraron que la inyección intramedular con una solución 100 mM del agonista fue la única capaz de generar una activación, en principio específica, del receptor GPR17 evidenciada por el aumento de proliferación de las células del canal central.

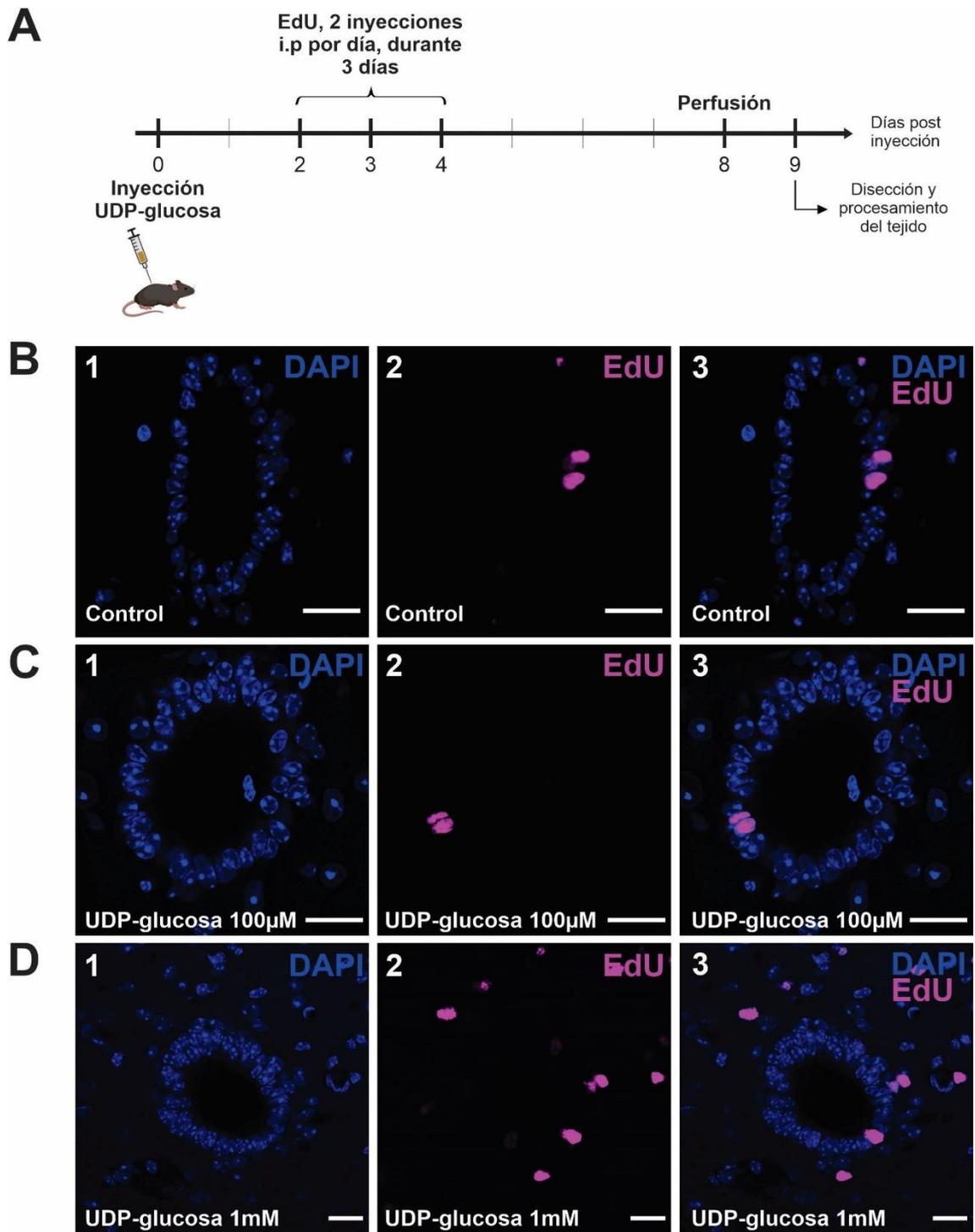


Figura 13. Las células ependimarias no responden frente a inyecciones intramedulares de UDP-glucosa en concentraciones 100 μM y 1 mM. Protocolo experimental (A), de las inyecciones intramedulares (día 0) ya sea de solución salina (control) o UDP-glucosa (100 μM y 1 mM) y posterior procesamiento del tejido. Imágenes representativas de cortes transversales de médula espinal en animales inyectados intramedularmente con solución salina, UDP-glucosa 100 μM y UDP-glucosa 1 mM respectivamente (B-D). Se muestran los núcleos teñidos con DAPI (B1, C1, D1), los núcleos EdU+ (B2, C2, D2) y por último un MERGE de estos (2C, 3A y 4C).

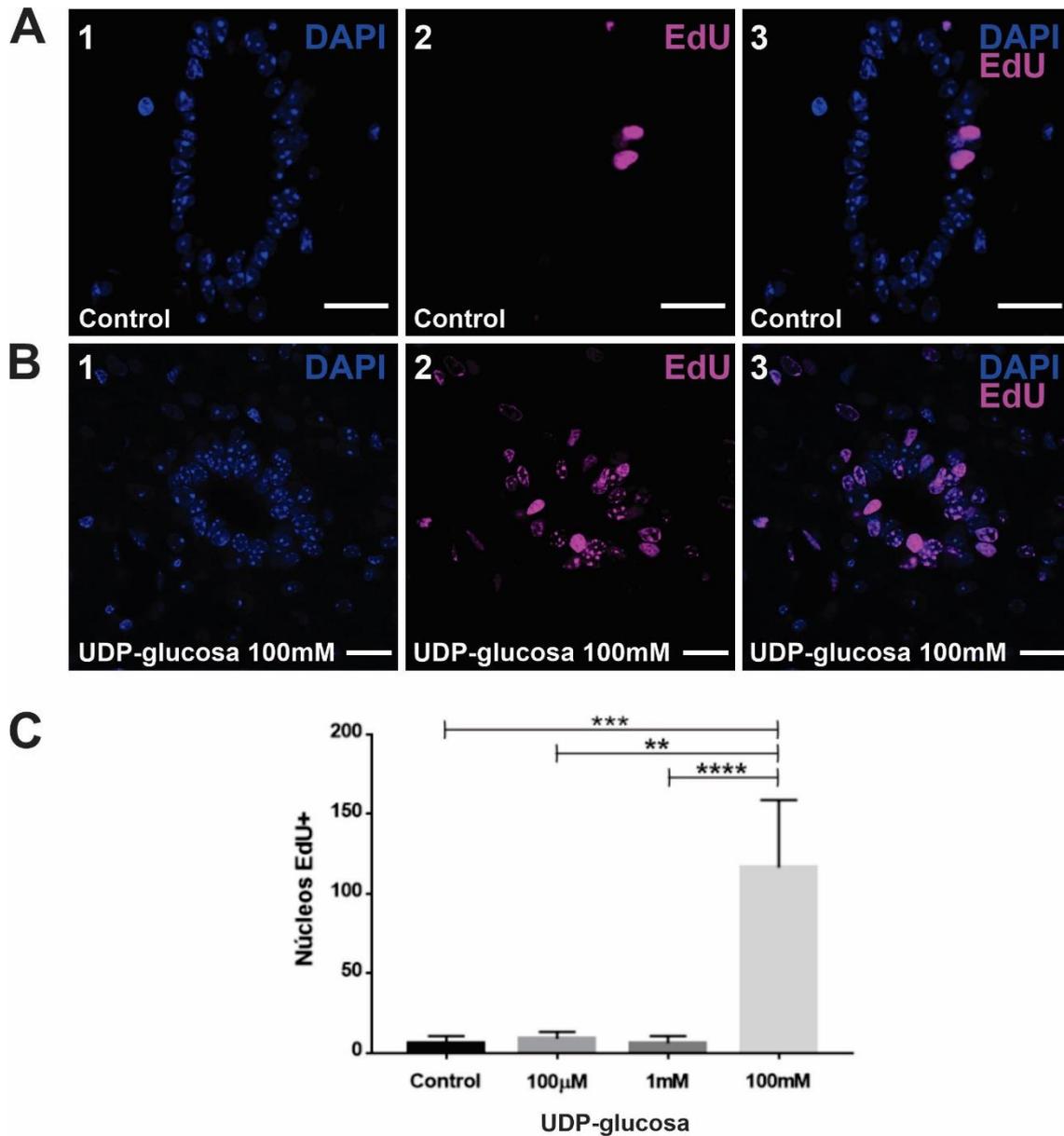


Figura 14. La activación del receptor GPR17 provoca la proliferación de las células endimarias del CC. Imágenes representativas de inyecciones intramedulares de solución salina (A) y UDP-glucosa 100mM (B) en ratones C57 adultos. Se observan los núcleos teñidos con DAPI (A1, B1), los núcleos EdU+ (A2, B2) y por último el MERGE de ambos (A3, B3). Imágenes tomadas a 63X y la escala representa 20 µm. Cuantificación de los núcleos EdU+ en todos los experimentos de proliferación (C) ($p = 0.9990$ control vs 100 µM; $p > 0.9999$ control vs 1 mM; $p = 0.9991$ 100 µM vs 1 mM; $p = 0.0001$ control vs 100 mM; $p = 0.0012$ 100 µM vs 100 mM; $p < 0.0001$ 1 mM vs 100 mM)

El fenotipo GFAP de las células del canal central no es modificado por la activación del receptor GPR17

Luego de una lesión medular las células ependimarias retoman su actividad proliferativa y sufren cambios fenotípicos como la expresión de GFAP, una proteína típica de los astrocitos y una sub-clase de progenitores neurogénicos en el cerebro adulto (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). El aumento de GFAP es una de las características principales en los procesos de astrogliosis (Anderson et al., 2014). Esta proteína es uno de los principales componentes de los filamentos intermedios del citoesqueleto (Hol y Pekny, 2015) y la misma se usa ampliamente como marcador en estudios clínicos y experimentales. Debido a que la activación del receptor con UDP-glucosa aumentó la proliferación de las células del canal central de la médula, nos planteamos entonces, si la activación del receptor GPR17 también podría generar cambios en la expresión de la proteína GFAP.

Para evaluar los cambios fenotípicos de la proteína GFAP en las células del canal central, se usaron ratones GFAP-GFP los cuales permiten la visualización de las células en las cuales el promotor GFAP está activo. En estos experimentos se evaluaron los cambios en la expresión de la proteína reportera GFP en animales control (inyección intramedular de solución salina) y animales a los cuales se les realizó una inyección intramedular de 1 μ l de UDP-glucosa en concentraciones de 1 mM y 100 mM (Figura 15). Para evaluar la expresión de GFAP, se hizo una cuantificación del porcentaje de área del canal central ocupado por la fluorescencia de la proteína reportera GFP utilizando el programa Fiji (Image J, NIH). Para esto, se procesaron las imágenes tomadas y se les delimitó el área del canal central, luego fueron guardadas en una carpeta para su posterior análisis en "batch" a través de un macro diseñado en el laboratorio que permitió llevar a cabo automáticamente el comando "Measure" del programa. El comando "Measure" fue previamente ajustado para devolver el porcentaje de área ocupado por la proteína fluorescente. Luego de 8 días desde la inyección intramedular de UDP-glucosa, no se observaron diferencias significativas en el área de fluorescencia por GFP entre las inyecciones de UDP-glucosa 1 mM (19.5 ± 8.19 %), UDP-glucosa 100 mM (10.5 ± 0 %) y el control (13.45 ± 4.859 %) ($p= 0.5542$ control vs 1 mM; $p= 0.8575$ control vs 100 mM; $p= 0.2524$ 1 mM vs 100 mM) (Figura 15). Los resultados anteriores permiten concluir que la activación del receptor GPR17 por UDP-glucosa intramedular no lleva a un cambio en la expresión de la proteína GFAP.

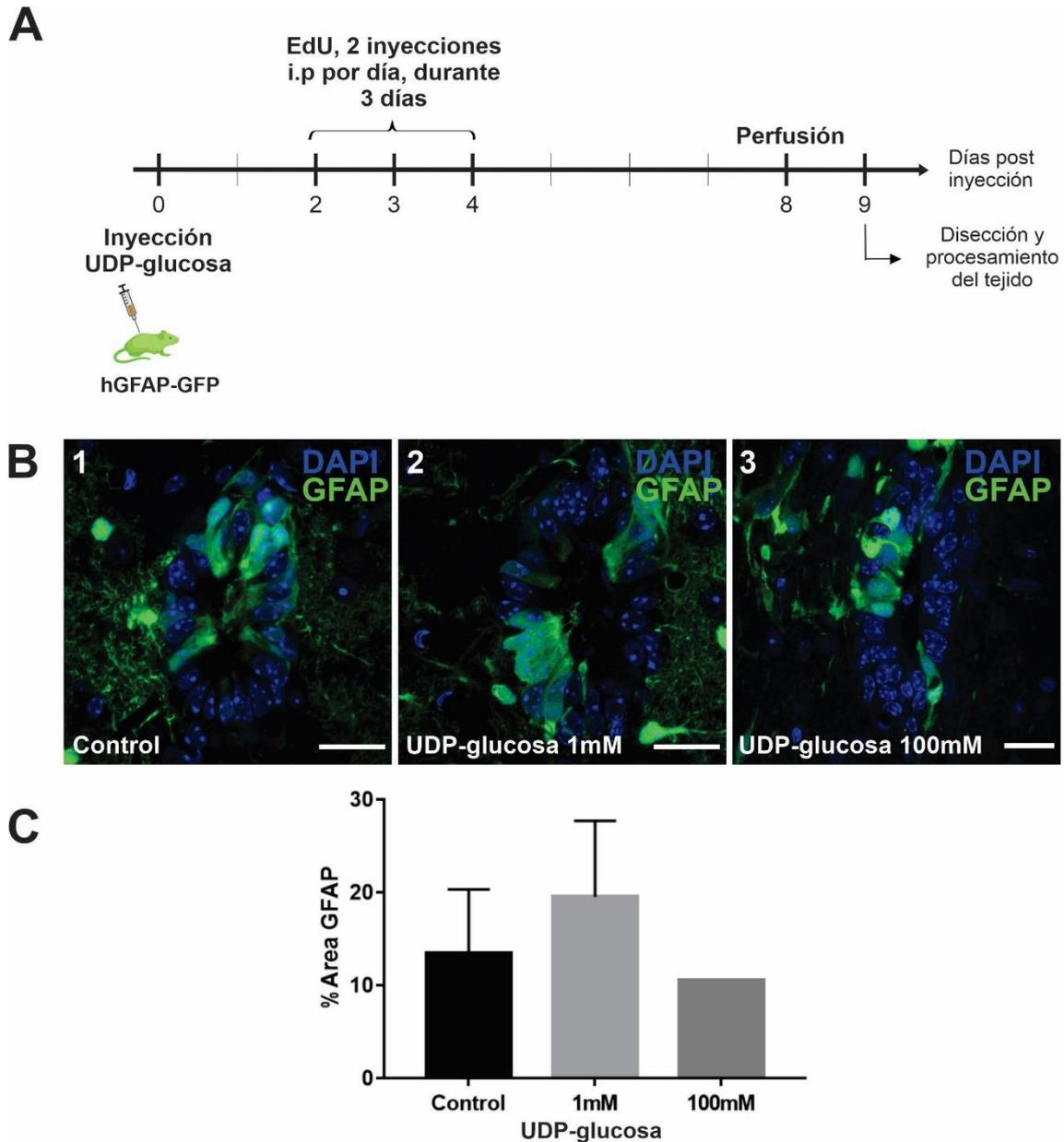


Figura 15. La activación del receptor GPR17 no provoca cambios en la expresión de GFAP en las células endimarias. Esquema del protocolo experimental realizado (A). En este caso se utilizan ratones transgénicos hGFAP-GFP para visualizar la proteína reportera GFP. Cortes transversales de médula espinal, en los cuales se observa la expresión de la proteína GFAP (B, C, D). Imágenes representativas de ratones inyectados con una solución de UDP-glucosa 1 mM (C), 100 mM (E) y ratones control (B). Imágenes tomadas a 63X y la escala representa 20 μ m. Cuantificación del área de expresión de la proteína GFAP (C), los resultados no muestran diferencias significativas en ninguno de los casos (E) ($p= 0.5542$ control vs 1 mM; $p= 0.8575$ control vs 100 mM; $p= 0.2524$ 1 mM vs 100 mM).

La activación del receptor GPR17 provoca la migración de células a partir del canal central

Una de las características que se observan en las células endimarias del canal central, es que luego de una lesión de la médula espinal estas células adquieren la capacidad de proliferar y migrar desde el canal central hacia el lugar de la lesión. Estudios previos del laboratorio, han demostrado que la activación del receptor P2X7 genera un aumento de la proliferación de las células endimarias del canal central junto con la activación de la expresión de GFAP, pero no genera migración de las células endimarias como sí ocurre en las lesiones medulares. Tomando en cuenta estos datos, nos preguntamos si la activación del receptor GPR17 podría generar además de cambios en la proliferación de las células endimarias del canal central, la capacidad de migrar hacia el sitio de inyección del agonista. Para estudiar esta característica se utilizaron ratones transgénicos FoxJ1CreER-tdTomato en los cuales las células endimarias y su progenie expresan el tdTomato y permite así su visualización (Figura 16).

En estos experimentos se realizaron inyecciones intramedulares de 100 mM de UDP-glucosa ya que esta fue la concentración que demostró la activación y proliferación de las células endimarias. En este caso se utilizaron los ratones transgénicos FoxJ1CreER-R26RtdTomato, los cuales al ser inducidos con tamoxifeno expresan de forma constitutiva el gen reportero tdTomato en las células que presentan cilio móvil y su progenie. En la médula espinal las únicas células con estas características son aquellas que tapizan el canal central, por lo que esta estrategia permite caracterizarlas fácilmente. Como control se realizaron inyecciones con solución salina. Pasado ocho días desde la inyección encontramos células tdTomato+ a cierta distancia del canal central (Figura 16 B1 y B2). Observamos además que la migración ocurre con una quimiotaxis bien marcada hacia el sitio de la inyección evidenciado por el halo de fluoresceína. Cabe destacar, que las células marcadas con tdTomato que migran son además EdU+ lo que confirma su generación luego de la inyección de UDP-glucosa (Figura 16 B3-5).

De esta forma, podemos concluir que la activación de los receptores GPR17 en la médula espinal por UDP-glucosa produce la reactivación de las células endimarias, las cuales retoman la actividad mitótica mientras que parte de la progenie migra hacia el sitio de inyección.

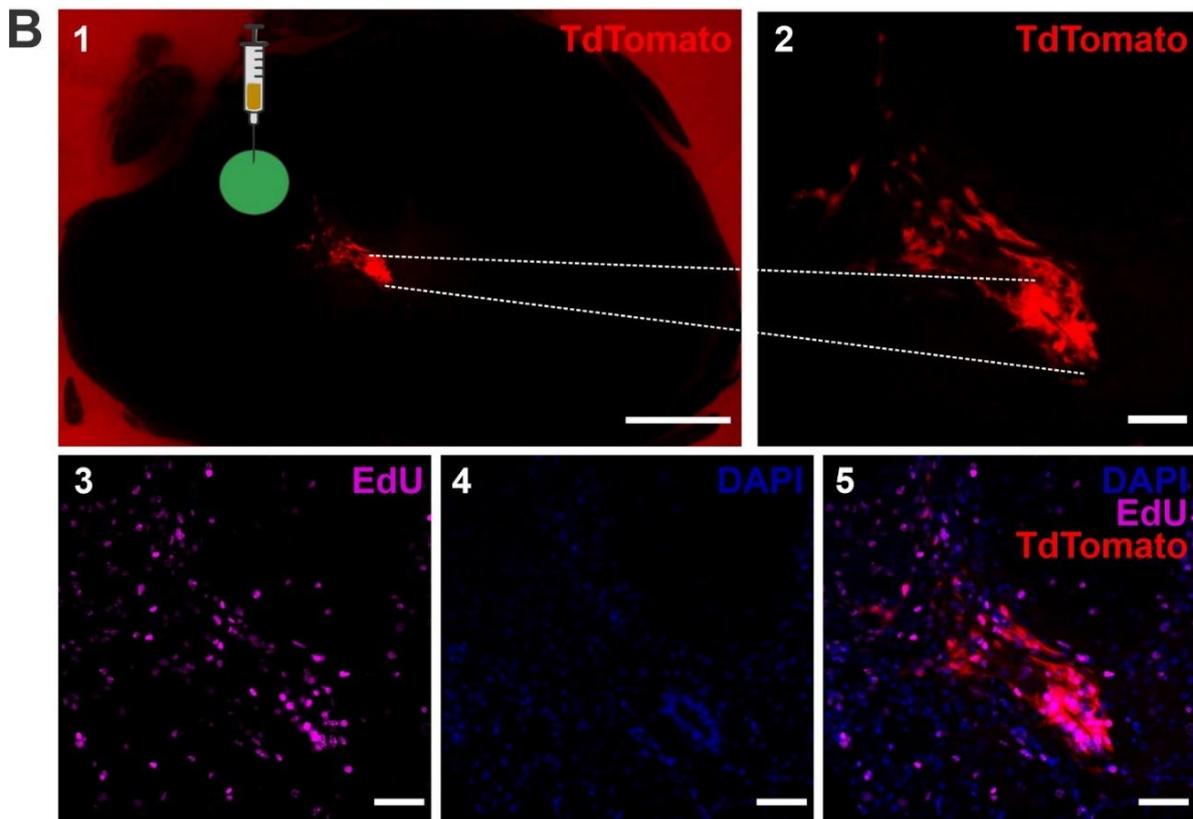
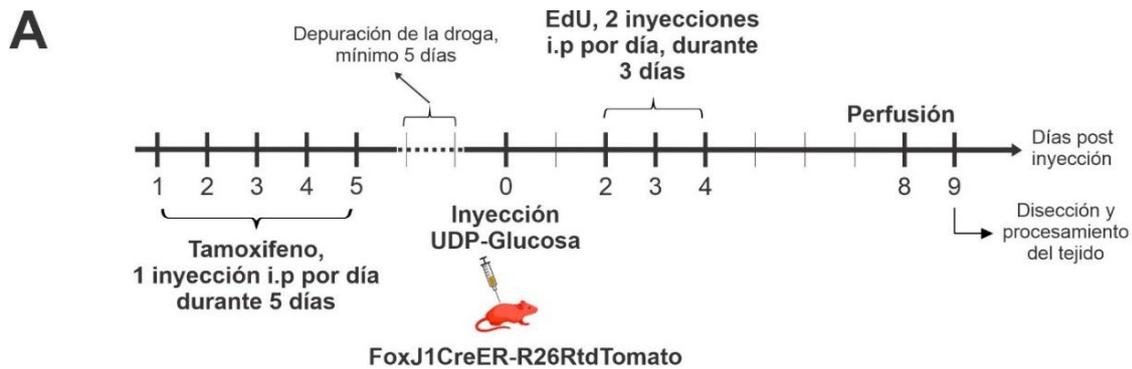


Figura 16. La activación del receptor GPR17 promueve la migración de las células endimarias del CC. Esquema del protocolo experimental (A), los ratones transgénicos FoxJ1CreER-R26RtdTomato son inducidos con inyecciones i.p de tamoxifeno y luego de depurada la droga se realiza protocolo experimental de inyecciones intramedulares de 1 μ l de UDP-glucosa 100 mM. Imágenes representativas de un corte transversal de médula espinal donde se observan las células del canal central migrando hacia el sitio de inyección del agonista UDP-glucosa (B). El sitio de inyección se ve representado con el círculo verde (B1). Se observan a mayor aumento las células endimarias en el canal central migrando, gracias a la expresión de tdTomato (B2). En violeta se observan las células EdU+ (B3), en azul los núcleos marcados con DAPI (B4) y por último un MERGE de las imágenes previas (B5). Imágenes tomadas a 5X (B1) y 20X (B2-5), las escalas corresponden a 400 μ m y 50 μ m respectivamente.

Discusión

En el presente trabajo estudiamos distintos aspectos relacionados con el receptor huérfano GPR17. Como objetivo principal de este trabajo nos propusimos evaluar el rol de dicho receptor en la respuesta de progenitores endógenos latentes a una lesión de médula espinal. Para lograr esto utilizamos aproximaciones inmunohistoquímicas y funcionales. Inicialmente, confirmamos la presencia del receptor en las células endimarias, estableciendo las pautas experimentales para la visualización del receptor en dichas células. Por otro lado, el uso de un agonista para simular la eventual activación de los receptores GPR17 en una lesión de médula espinal sugiere que este receptor juega un rol importante en este proceso traumático.

El receptor GPR17 fue descubierto en la segunda mitad de la década de los '90, como un receptor estrechamente relacionado a los receptores purinérgicos P2Y (Raport et al., 1996, Blasius et al., 1998). Años más adelante, se pudo demostrar que el receptor GPR17 en rata y humano se expresa principalmente en el cerebro y en menor medida en el riñón y el corazón; órganos que típicamente sufren daño isquémico, mientras que hay una mínima expresión en el hígado y el pulmón (Ciana et al., 2006; Lecca et al., 2008, Chen et al., 2009, Fumagalli et al., 2011, Cosentino et al., 2014). El receptor posee dos isoformas, una isoforma larga y una corta. Si bien la expresión de estas dos isoformas varía en los distintos tejidos, ambas se han reportado en el cerebro, aunque la isoforma corta no se detectó en corazón y riñón como si lo hace la isoforma larga (Pugliese et al., 2009, Benned-Jensen y Rosenkilde, 2010).

Dado que el receptor solo había sido reportado en las células endimarias del canal central de roedores en el trabajo de Ceruti et al. (2009), el primer objetivo de este trabajo de tesis fue corroborar la presencia del receptor GPR17 en la médula espinal de ratones silvestres C57. Para lograr esto tuvimos que poner a punto los ensayos de inmunohistoquímica que nos permitirían observar finalmente al receptor en las células endimarias del canal central, lo que llevo varias pruebas y finalmente se logró la visualización de este receptor mediante cortes realizados en criostato y con el uso de un anticuerpo de los laboratorios Cayman Chemicals, el cual estaba reportado en varios artículos (Boccazzi et al., 2016, Cosentino et al., 2014, Nyamoya et al., 2019).

El receptor GPR17 tiene características típicas de la superfamilia GPCR, entre estas se destacan la topología de dominios 7-transmembrana (TM), ocho hélices anfipáticas y sitios de N-glicosilación (Parravicini et al., 2008, Marucci et al., 2016, Fumagalli et al., 2017). Cabe destacar que los anticuerpos que fueron utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica están diseñados para marcar distintas regiones del receptor, lo cual podría explicar las dificultades que se plantearon para su correcta visualización. En el caso del anticuerpo

desarrollado por Alomone Labs, el mismo se une al tercer loop intracelular del receptor. En cambio, el anticuerpo de Cayman Chemicals está diseñado para unirse al extremo C-terminal del receptor, también intracelular. Es posible que esta diferencia en el sitio de reconocimiento de los anticuerpos explique las diferencias entre la eficacia para revelar el receptor GPR17 en nuestros ensayos.

Por otro lado, estudios previos en los cuales se ha evaluado el perfil de expresión de las dos isoformas del receptor en distintos tejidos han presentado discrepancias en los resultados expuestos. Por un lado en el artículo publicado por Pugliese et al. (2009), la expresión de la isoforma larga estaría restringida al cerebro y la misma no se detectó en corazón ni riñón. Posteriormente, el estudio presentado por Benned-Jensen y Rosenkilde (2010), destaca la presencia de la isoforma larga principalmente en estos dos tejidos, mientras que la isoforma corta no se detectó. Estos estudios se llevaron a cabo mediante RT-PCR y qPCR, y es posible que las diferencias observadas en estos patrones de expresión también se hayan debido a la especificidad de los cebadores utilizados en cada estudio, que al abarcar distintas regiones del receptor podría haber generado esta diferencia en los resultados.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan datos útiles para la detección por inmunohistoquímica más confiable del receptor GPR17, no solo en las células ependimarias de la médula sino también en otros tejidos que aún no han sido estudiados. De todas formas, debido a las dificultades que se presentaron en los ensayos de inmunohistoquímica, así como las diferencias expuestas en la bibliografía, sería recomendable seguir estudiando la localización del receptor y confirmar su expresión en el canal central. Asimismo, podrían realizarse ensayos de Western Blot para verificar la especificidad de los anticuerpos utilizados y corroborar que los mismos no estén uniéndose a otras proteínas y de esta forma descartar resultados inespecíficos.

Estudios filogenéticos han revelado que el receptor huérfano GPR17 se encuentra en una posición intermedia entre las familias de receptores P2Y y CysLTs, ya que este receptor emergió como el más cercano a un ancestro común de estas dos familias de receptores (Ciana et al., 2006, Parravicini et al., 2008, Parravicini et al., 2010). Los receptores P2Y se encuentran distribuidos en tejidos de todo el organismo y están involucrados en una gran cantidad de procesos y sistemas, como el inmunológico, digestivo, nervioso, endocrino, entre otros. El principal agonista y mejor caracterizado de estos receptores es el ATP. De todas formas, también se reconocen otras moléculas que actúan sobre este tipo de receptores, como el UTP, UDP, UDP-glucosa y ADP. Estos ligandos pueden variar en cuanto a su capacidad de activación, pudiendo actuar en ciertas ocasiones como ligandos naturales y en otros casos como

agonistas parciales (Abbracchio et al., 2006, Idzko et al., 2014). Por ejemplo, el ATP puede actuar como agonista natural para el receptor P2Y11, pero a concentraciones mayores podría actuar como agonista parcial de los receptores P2Y1 y P2Y13. En cambio, en el caso del receptor P2Y1 se ha visto que su ligando natural sería el ADP (Abbracchio et al., 2006). Los nucleótidos de uracilo y los cisteinil leucotrienos son moléculas de dos familias químicamente no relacionadas, que se liberan de forma masiva luego de una injuria y son capaces de interactuar con los receptores GPCRs y los receptores CysLT (Abbracchio et al., 2006, Lecca y Ceruti, 2008). Durante las lesiones en médula espinal, estas moléculas también se liberan de forma masiva como señalización de daño e inflamación.

Con el fin de caracterizar al receptor, varios grupos han evaluado el perfil de activación del receptor GPR17 por este tipo de moléculas señal. La mayoría de grupos han podido comprobar que el receptor se activa por la acción de leucotrienos (LTD4 y LTC4) y también por nucleótidos de uracilo (UDP-glucosa, UDP-galactosa y UDP) pero no por nucleótidos de adenina ni por guanosina (Ciana et al., 2006; Lecca et al., 2008, Pugliese et al., 2009). Por otro lado, otros grupos han reportado que el receptor es capaz de activarse por nucleótidos de uracilo pero no así por cisteinil leucotrienos (Bened-Jensen and Rosenkilde, 2010).

En base a estos resultados previos, nos planteamos como segundo objetivo evaluar el perfil de activación del receptor GPR17 en la médula espinal, específicamente en las células ependimarias del canal central. Para lograr este objetivo, realizamos inyecciones intramedulares del agonista UDP-glucosa. A pesar de que anteriormente se ha utilizado el UDP-glucosa para manipular la actividad del receptor GPR17, los estudios previos obtuvieron sus resultados principalmente de experimentos *in vitro* en los cuales las concentraciones no son las mismas que para los experimentos *in vivo*. Un único grupo ha reportado el aumento de células GPR17+ en un modelo de leucomalacia periventricular (LPV) a los cuales se les inyecta UDP-glucosa de forma intraperitoneal. Este grupo demostró que en este modelo experimental, las inyecciones de UDP-glucosa generan un aumento en las células progenitoras de oligodendrocitos - células que expresan el receptor GPR17- en la sustancia blanca (Li et al., 2015). El hecho de que hasta la fecha no hubiera datos sobre aplicaciones *in vivo* de este agonista en la médula espinal nos presentó el desafío de definir la concentración a inyectar a nivel intra-espinal.

Inicialmente, evaluamos el perfil de activación del receptor utilizando concentraciones del agonista similares a las utilizadas en la literatura disponible las cuales sugieren que el rango de activación del receptor GPR17 está en el orden nanomolar para leucotrienos y micromolar para los nucleótidos de uracilo. Asimismo, estos resultados son similares a los perfiles de activación de

los receptores CysLTs y P2Y, (Abbracchio et al. 2006, Ciana et al., 2006, Lecca et al 2008, Zhao et al., 2018, Mao et al., 2012). Dado que logramos comprobar la presencia del receptor en las células endoteliales del canal, analizamos cambios proliferativos, fenotípicos y la capacidad migratoria de las células del canal central, tres eventos que se observan característicamente luego de una lesión de médula espinal (Mothe and Tator, 2005, Meletis et al., 2008, Barnabé-Heider et al., 2010). En ninguno de los procesos considerados se observaron cambios al realizar las inyecciones intramedulares de las concentraciones más bajas. Esto implica que ninguna de las concentraciones fue suficiente para generar la activación del receptor. Sin embargo, la concentración de 1 mM ya se encuentra por arriba del rango demostrado de activación del receptor pero tampoco esta concentración generó cambios a nivel de las células endoteliales.

Es prudente considerar que para lograr la activación de este receptor *in vivo* se podrían necesitar concentraciones más altas, al menos de este agonista, que las utilizadas en cultivo. Hacer la simple correlación general de utilizar concentraciones *in vivo* (in situ no periférico) menores que las concentraciones utilizadas *in vitro* podría no ser la manera acertada de establecer la concentración de uso *in vivo* para este receptor en la médula. De hecho, hay drogas para las cuales las concentraciones de uso *in vivo* son mayores que las establecidas previamente en ensayos *in vitro* (Panara et al., 1999). Diversos factores podrían explicar que se requiera una mayor concentración *in vivo* para generar la activación del receptor. Por ejemplo, 1) por ciertas barreras de difusión de la droga inyectada podría no llegar a la concentración intrapipeta en el entorno de las células endoteliales; 2) el agonista podría estar degradado por enzimas o ser captado por la glía; 3) cierta concentración de la droga podría lavarse por la circulación del tejido, entre otras razones. Por ende, una mayor investigación farmacocinética sobre el UDP-glucosa, teniendo en cuenta parámetros como su pk , pD , volumen de distribución, EC_{50} entre otros, sería necesario para establecer de forma más precisa la concentración de droga a utilizar.

A partir de los resultados obtenidos con las concentraciones de 100 μM y 1 mM, nos planteamos aumentar las concentraciones del agonista a utilizar. En este nuevo set de experimentos, utilizamos inyecciones intramedulares de 1 μl de UDP-glucosa 100 mM. Los resultados obtenidos muestran un perfil completamente diferente al observado anteriormente. Con esta concentración observamos una proliferación pronunciada de las células endoteliales y su migración hacia el sitio de inyección de la droga. Por otro lado, no se observó ningún cambio fenotípico asociado a la proteína GFAP con respecto a los controles. Otros estudios también han demostrado que este receptor promueve la proliferación de otros linajes celulares. En primer lugar, se ha visto que el tratamiento con UDP-glucosa genera la proliferación de células precursoras de

oligodendrocitos GPR17+ que se encuentran en un estado quiescente (Lecca et al., 2008). Asimismo, también se ha demostrado que tanto en roedores como en humanos una lesión cerebral provoca un aumento en la proliferación de las células OPCs GPR17+ (Lecca et al., 2008, Franke et al., 2013). Asimismo, en modelos de lesiones medulares y cerebrales se ha observado que el receptor se expresa rápidamente en las neuronas que se encuentran en los bordes o en el sitio de la injuria. A continuación su expresión cesa en este linaje celular para posteriormente expresarse en células de la microglía y en OPCs del parénquima que comienzan a proliferar (Ciana et al. 2006, Lecca et al., 2008, Zhao et al., 2018, Ceruti et al., 2009).

De esta forma, si bien la concentración utilizada en este caso es superior a la propuesta en estudios previos *in vitro*, consideramos que la respuesta del receptor GP17 frente al agonista UDP-glucosa es específica por varios motivos. En primer lugar, ya que no todos los procesos estudiados respondieron de igual manera al activar el receptor. Parecería que el receptor GPR17 estaría involucrado únicamente en la proliferación y migración de las células endimarias, no así en el cambio de la expresión de la proteína GFAP, por lo cual esto podría indicar una actividad específica sobre el mismo. Estudios previos en el laboratorio donde se realizó mi tesis han revelado respuestas similares en el caso del receptor P2X7. En primer lugar se logró demostrar que las células endimarias presentan receptores P2X7 funcionales que al ser activados por ATP generan corrientes entrantes de Ca^{2+} , lo cual podría estar involucrado en la reactivación del nicho de células madres del canal central. (Marichal et al., 2016). También se vio que al ser activado por el agonista BzATP se provoca la proliferación de las células endimarias y un cambios en la expresión de GFAP, pero no así en la migración de estas células (Maciel, 2019).

Como se mencionó previamente, las dos isoformas del receptor tienen distinta distribución en el organismo. A su vez, se ha propuesto que presentan distintos grados de activación por los nucleótidos de uracilo, siendo la isoforma larga muchos menos reactiva a este tipo de moléculas (Bened-Jensen and Rosenkilde, 2010). Esto nos hace creer que quizás, la isoforma larga es la que se encuentra en la médula espinal y por esto se requirió una concentración tan alta de UDP-glucosa para generar su activación. También es razonable considerar que el agonista UDP-glucosa podría estar actuando como un ligando del receptor GPR17 pero no como su ligando natural, en cambio podría funcionar como un ligando parcial de este receptor. De todas formas, podemos descartar efectos inespecíficos por la alta concentración de droga utilizada, por lo cual se remarca la propuesta de seguir estudiando las características de activación del receptor.

Por otro lado, la vasta mayoría de artículos destacan la presencia del receptor en un subconjunto de células precursoras de oligodendrocitos OPC (*oligodendrocyte precursor cells*) que se encuentran en un estado quiescente (Lecca et al., 2008; Ceruti et al., 2009, Chen et al., 2009, Boda et al., 2011, Mao et al., 2020). Cabe destacar, que este linaje celular si bien permanece quiescente normalmente, es altamente sensible a los distintos estados fisiológicos del cerebro y son capaces de responder y proliferar rápidamente frente a injurias, tanto en el cerebro como en la médula espinal (Levine, Reynolds y Fawcett, 2001, Li y Leung, 2015, Fumagalli et al., 2017, Duncan et al., 2020). En el caso de las células endimarias del CC, su proliferación es común durante el desarrollo embrionario y en etapas postnatales tempranas, pero en mamíferos adultos su actividad proliferativa es muy limitada en condiciones normales (Mothe and Tator, 2005). Luego de una injuria medular comienza un proceso en el cual se liberan varias moléculas señalizadores de daño, se da un desbalance iónico, se observan procesos de apoptosis celular y también se destaca un proceso inflamatorio (Oyinbo, 2011, Silva et al., 2014, DeBrot et al., 2018). Este entorno hace que las células endimarias se vuelvan reactivas y migran hacia el sitio de injuria, pero para que esto ocurra estas células requieren una gran estimulación. Por lo tanto, creemos que las características intrínsecas de este nicho de células madre podrían ser las que generen que sea necesaria una concentración tan alta del agonista UDP-glucosa para provocar la estimulación y activación de las células endimarias.

Luego de una lesión medular se activa tanto la proliferación como la expresión de la proteína GFAP (Faulkner et al., 2004, Meletis et al., 2008). Por esto, inicialmente esperábamos que al menos la concentración más elevada del agonista UDP-glucosa utilizada en este trabajo aumentara la expresión de la proteína GFAP. Como se mencionó previamente, la proteína acida fibrilar glial (GFAP) es la principal proteína de filamento intermedio en los astrocitos maduros (Middeldorp y Hol, 2011, Hol y Pekny, 2015). Frente a una lesión o enfermedad en el sistema nervioso, los astrocitos se vuelven reactivos y responden a estas injurias en un proceso que se conoce como astrogliosis. Durante este proceso, varias proteínas estructurales de los astrocitos sufren cambios en su expresión, por ejemplo la proteína GFAP aumenta en gran medida su expresión en relación con el grado de reactividad de los astrocitos. De todas formas, los cambios estructurales y funcionales asociados a estos mecanismos dependen del contexto específico y muchas veces están regulados por distintos eventos de señalización (Middeldorp y Hol, 2011; Anderson et al., 2014; Hol y Pekny 2015). De nuestros resultados se desprende que la activación de los receptores GPR17 activan vías de señalización específicas para la proliferación distintas a aquellas que regulan algunas proteínas del citoesqueleto como la GFAP.

Como ya ha sido mencionado, las células endimarias de la médula espinal presentan características de células madres neurales (Meletis et al., 2008). Cabe destacar además, que el receptor GPR17 ha sido reconocido como uno de los tres genes que se expresan exclusivamente en células precursoras neuronales en el hipocampo adulto, en comparación con las células precursoras embrionarias (Maisel et al., 2007). En condiciones normales, las células endimarias del canal central permanecen en un estado quiescente, pero luego de una lesión medular esta progenie comienza a proliferar y también migra hacia el sitio de lesión, donde se diferencian hacia un fenotipo similar a astrocitos y forman el tejido cicatricial en el sitio de la injuria (Meletis et al., 2008, Barnabe-Heider et al., 2010). Con el uso de los ratones transgénicos Foxj1CreER-tdTomato comprobamos que la activación del receptor GPR17 mediante inyecciones intramedulares del agonista UDP-glucosa, genera no solo la proliferación de las células endimarias, sino que también se inicia un proceso de migración celular con marcada quimiotaxis hacia el sitio de inyección de la droga. Los resultados permiten ver cómo estas células comienzan a migrar ocho días post inyección hacia el sitio de inyección del agonista, al igual que ocurre luego de una lesión medular (Meletis et al., 2008, Maciel et al., 2019).

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Coppi et al., (2013) en los cuales se muestra que el receptor GPR17 desempeñaba un rol en la migración celular de OPCs en ensayos de quimiotaxis estándares, en los cuales las células migran hacia un medio en el cual había UDP-glucosa, lo cual se inhibe con un antagonista del receptor. Por otro lado, en lesiones isquémicas cerebrales se ha visto que el receptor promueve la activación de células precursoras de oligodendrocitos promoviendo la migración de estas células hacia el área lesionada (Lecca et al., 2008, Bonfanti et al., 2017). Asimismo, en lesiones medulares la expresión del receptor aumenta durante la activación de la microglía/macrófagos, lo que podría favorecer en su migración e infiltración en el sitio de injuria (Ceruti et al., 2009). La actividad migratoria asociada al receptor también ha sido estudiada en tejido miocárdico, en donde el uso de UDP glucosa entre otros agonistas permitió observar in vivo la migración de la línea celular Sca-1+/CD31- derivada de corazones normales (Cosentino et al., 2014). Estos datos, así como los que se obtuvieron en nuestro modelo, muestran una vinculación entre la activación de las células que expresan el receptor y su consiguiente migración celular.

Como se mostró, el uso de UDP-glucosa estaría activando al receptor y esto generaría la proliferación de las células endimarias de forma similar que cuando se lesiona traumáticamente la médula espinal. Esta reacción podría generar asimismo la consiguiente migración de las células hacia el sitio de lesión, con el fin de mejorar, o al menos atenuar las lesiones producidas. Aunque muchas preguntas quedan todavía sin responder, los resultados

mostrados en este trabajo de tesis se suman a los trabajos que muestran al receptor GPR17 como partícipe de los procesos celulares fundamentales para la diferenciación y activaciones de determinados tipos celulares en situaciones patológicas o traumáticas. Específicamente nuestros resultados en la médula espinal muestran su posible rol diferencial en las distintas etapas posteriores a una injuria medular. Esto hace de este receptor una pieza fundamental de estudio, que permitirá en el futuro mejorar nuestro entendimiento de las lesiones de médula espinal y de mejorar las capacidades regenerativas del sistema nervioso en general.

Conclusiones y perspectivas

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis fueron;

- Comprobamos que el receptor GPR17 se expresa en las células endimarias del canal central en ratones adultos C57.
- Las inyecciones intramedulares del agonista UDP-glucosa activaron el receptor GPR17, posiblemente de manera específica.
- La activación del receptor GPR17 promueve la proliferación y migración de las células endimarias del CC hacia el sitio de inyección de la droga.
- La activación del receptor no provocó cambios en la expresión de la proteína GFAP.

En su conjunto, estos resultados ponen en manifiesto que el receptor GPR17 estaría involucrado en las etapas tempranas de la reacción de las células endimarias a una lesión de la médula espinal. Posiblemente, también dispares eventos que son centrales en la subsecuente formación de la cicatriz glial. Sin embargo, y teniendo en cuenta los datos experimentales obtenidos en este trabajo, es necesario continuar con las investigaciones asociadas a este receptor y a su rol en la lesión de médula espinal.

Creemos que son necesarios más ensayos de interacción receptor ligando para trabajar de forma más precisa en este tipo de experimentos. Como se mencionó previamente, se ha demostrado la existencia de dos isoformas del receptor GPR17 y se han descrito diferencias en la expresión de una u otra según los diferentes tejidos. Ninguno de estos hace alusión a la isoforma que se encuentra en las células endimarias del CC de médula espinal. Asimismo, se ha observado que la activación de una u otra isoforma a través de UDP-glucosa varían en gran medida. Por lo tanto, es necesario en un futuro poder determinar cuál de estas dos isoformas es la que se encuentra expresada en este linaje celular y poder definir su umbral de activación. Para esto podrían realizarse ensayos in vitro, por ejemplo trabajar con cultivos organotípicos del canal central, en los cuales se mantiene de manera aproximada la estructura tisular. Esto permitiría por un lado confirmar que los resultados inmunohistoquímicos no hayan sido inespecíficos y también se podría estudiar de forma más precisa el perfil de activación por el agonista UDP-glucosa y también estudiar la existencia de algún agonista secundario de este receptor.

Una estrategia interesante a evaluar en un futuro es el rol que tiene este receptor en las lesiones espinales a largo plazo. Nuestro estudio se focalizó en los eventos que se observan hasta 8 días luego de una inyección de UDP-glucosa. Sería interesante estudiar estos procesos en un periodo más largo, y de esta forma poder evaluar el rol que cumple el receptor en la formación de la

cicatriz glial. Asimismo, en este modelo experimental podría evaluarse si existen efectos sobre la recuperación locomotora luego de la antagonización del receptor GPR17. Esto podría llevarse a cabo con pruebas comportamentales como el test de escalera horizontal. Esta prueba permite evaluar la función de las extremidades anteriores y posteriores de los animales de estudio, así como la coordinación entre las mismas. La prueba consiste en hacer que el animal camine a lo largo de una escalera horizontal a la cual se le cambia el espaciado de los peldaños periódicamente, de forma que no existan mecanismos de memoria y aprendizaje (Metz et al., 2002, Cummings et al., 2007, Basso et al., 2006). Esta prueba presenta la ventaja de que, sin ser un test complicado, ya que el animal simplemente tiene que caminar por la escalera, es una prueba sensible que permite recopilar información respecto al movimiento de las extremidades de los animales y así reconocer fácilmente si existe o no una mejoría en los movimientos. Este tipo de análisis sería fundamental para evaluar la importancia funcional de este receptor en el contexto de la auto-reparación luego de una lesión.

Por otro lado, se ha propuesto que el receptor GPR17 puede ser antagonizado por Pranlukast y Montelukast, dos antagonistas de receptores de cisteinil leucotrienos que se utilizan para tratar el asma (Pugliese et al., 2009, Eberini et al., 2011, Fratangeli et al., 2012, Coppi et al., 2013). Asimismo, se ha propuesto que luego de una injuria cerebral o medular, al silenciar al receptor con estos antagonistas, así como con oligonucleótidos anti-sentido, se genera una protección sólida contra el daño inducido en el tejido luego de la lesión (Cianna et al., 2006, Lecca et al., 2008, Ceruti et al., 2009, Pugliese et al., 2009). De esta forma, para completar la primer batería de experimentos bioquímicos del receptor GPR17, queda pendiente hacer experimentos que lo antagonicen. De hecho, estos experimentos estaban previstos dentro de esta tesina de grado, pero por distintos motivos no pudimos llevarlos a cabo en tiempo y forma para incluirlos. El protocolo experimental planificado consistía en la inducción de una lesión medular, luego se inyectaría de forma intraperitoneal dos dosis del antagonista Montelukast, la primera 1 h post lesión y la siguiente a las 5 h. Posterior a esto, se evaluaría la respuesta del tejido mediante ensayos de inmunohistoquímica. Este protocolo se diseñó siguiendo el modelo de Genovese et al. (2008) en el cual se evalúa el efecto del Montelukast frente una lesión en la medula espinal, y en el mismo se observó una mejora significativa en el tejido luego de esta injuria. Estos experimentos son necesarios para poder completar la caracterización de la función del receptor GPR17 y a su vez para poder evaluar si existe una mejora en el tejido al antagonizar a este receptor.

Por otro lado, en los experimentos realizados en esta tesina de grado nos propusimos estudiar los cambios en la expresión de la proteína GFAP al activar el receptor GPR17. Nuestros resultados revelaron que en este caso no se

genera ningún cambio en su expresión. En un futuro, podría estudiarse el rol que tiene este receptor en la expresión de otras proteínas que podrían sufrir cambios en este tipo de injurias. Las células ependimarias expresan nestina y vimentina, dos proteínas de los filamentos intermedios que están asociadas a células neurales inmaduras (Meletis et al., 2008). Los filamentos intermedios son un grupo diverso de proteínas conservadas filogenéticamente y están involucrados en múltiples procesos celulares, entre ellos la migración celular. Ya que las células ependimarias mostraron una migración celular con marcada quimiotaxis, sería interesante evaluar las proteínas involucradas en este proceso. Por lo tanto, es razonable proponer el estudio de la vimentina, actina, nestina, otras proteínas pertenecientes al grupo de filamentos intermedios en relación a la activación del receptor GPR17. En resumen, los resultados expuestos en esta tesis ponen en evidencia que el receptor GPR17 se encuentra involucrado en la activación de las células ependimarias del canal central luego de una lesión medular. Esta información es de suma importancia para comenzar a entender los procesos moleculares y bioquímicos que subyacen a este tipo de injuria y así, en un futuro poder desarrollar terapias o fármacos que mejoren las condiciones de vida de las personas que sufren estas devastadoras lesiones.

Agradecimientos

A Raúl, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el laboratorio y permitirme hacer mi tesina de grado.

A Spring por haberme enseñado y tutorado durante todo el proceso de la tesis.

A los evaluadores por tomarse el tiempo y dedicación de corregir la tesina.

A Gabi, Vicky e Ine por ayudarme cada vez que lo precise, no solo en la tesis sino durante todos estos años en el laboratorio, con charlas y sonrisas cada día.

Al resto del equipo de NFCM, Ceci M, Ceci R, Jime, Omar, Adrián y Fede por permitirme formar parte de este grupo de trabajo tan lindo, por la dedicación y el amor a la Ciencia y por hacer de este proceso una experiencia única.

A todos los amigos que me llevo de la facultad, por acompañarme en la carrera, con el estudio y todos los momentos de diversión, sin duda hicieron que todo este camino fuera mucho más cálido y divertido.

A mis padres, mi hermano y el resto de la familia por siempre apoyarme de forma incondicional.

A mis amigas de la infancia por estar conmigo desde siempre, por bancarme en todos los aspectos, por las risas y el cariño de todos estos años.

A Facu, por escucharme, acompañarme, alentarme y por el cariño de todos los días.

Bibliografía

Abbracchio, M. P., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M. T., King, B. F., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A., & Burnstock, G. (2003). Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends in pharmacological sciences*, 24(2), 52–55. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)00038-X)

Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A., & Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews*, 58(3), 281–341. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.3>

Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in neurology*, 10, 282. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>

Anderson K. D. (2004). Targeting recovery: priorities of the spinal cord-injured population. *Journal of neurotrauma*, 21(10), 1371–1383. <https://doi.org/10.1089/neu.2004.21.1371>

Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience letters*, 565, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>

Barnabé-Heider, F., Göritz, C., Sabelström, H., Takebayashi, H., Pfrieger, 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>

Basso, D. M., Fisher, L. C., Anderson, A. J., Jakeman, L. B., McTigue, D. M., & Popovich, P. G. (2006). Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *Journal of neurotrauma*, 23(5), 635–659. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.635>

Bened-Jensen, T., & Rosenkilde, M. M. (2010). Distinct expression and ligand-binding profiles of two constitutively active GPR17 splice variants. *British journal of pharmacology*, 159(5), 1092–1105. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00633.x>

Bjornsson, C. S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., & Temple, S. (2015). It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Developmental cell*, 32(4), 435–446.

Boccazzi, M., Lecca, D., Marangon, D., Guagnini, F., Abbracchio, M. P., & Ceruti, S. (2016). A new role for the P2Y-like GPR17 receptor in the modulation of multipotency of oligodendrocyte precursor cells in vitro. *Purinergic signalling*, 12(4), 661–672. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9530-7>

Boda, E., Viganò, F., Rosa, P., Fumagalli, M., Labat-Gest, V., Tempia, F., Abbracchio, M. P., Dimou, L., & Buffo, A. (2011). The GPR17 receptor in NG2 expressing cells: focus on in vivo cell maturation and participation in acute trauma and chronic damage. *Glia*, 59(12), 1958–1973. <https://doi.org/10.1002/glia.21237>

Bonfanti, E., Gelosa, P., Fumagalli, M., Dimou, L., Viganò, F., Tremoli, E., Cimino, M., Sironi, L., & Abbracchio, M. P. (2017). The role of oligodendrocyte precursor cells expressing the GPR17 receptor in brain remodeling after stroke. *Cell death & disease*, 8(6), e2871. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.256>

Bonfanti, L., & Peretto, P. (2011). Adult neurogenesis in mammals--a theme with many variations. *The European journal of neuroscience*, 34(6), 930–950. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07832.x>

Braun, S. M., & Jessberger, S. (2014). Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. *Development (Cambridge, England)*, 141(10), 1983–1986. <https://doi.org/10.1242/dev.104596>

Buccioni, M., Marucci, G., Dal Ben, D., Giacobbe, D., Lambertucci, C., Soverchia, L., Thomas, A., Volpini, R., & Cristalli, G. (2011). Innovative functional cAMP assay for studying G protein-coupled receptors: application to the pharmacological characterization of GPR17. *Purinergic signalling*, 7(4), 463–468. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9245-8>

Cavus, G., Altas, M., Aras, M., Ozgür, T., Serarslan, Y., Yilmaz, N., ... & Ulutas, K. T. (2014). Effects of montelukast and methylprednisolone on experimental spinal cord injury in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18(12), 1770-7.

Ceruti, S., Villa, G., Genovese, T., Mazzon, E., Longhi, R., Rosa, P., Bramanti, P., Cuzzocrea, S., & Abbracchio, M. P. (2009). The P2Y-like receptor GPR17 as a sensor of damage and a new potential target in spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology*, 132(Pt 8), 2206–2218. <https://doi.org/10.1093/brain/awp147>

Chen, Y., Wu, H., Wang, S., Koito, H., Li, J., Ye, F., Hoang, J., Escobar, S. S., Gow, A., Arnett, H. A., Trapp, B. D., Karandikar, N. J., Hsieh, J., & Lu, Q. R. (2009). The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination. *Nature neuroscience*, 12(11), 1398–1406. <https://doi.org/10.1038/nn.2410>

Ciana, P., Fumagalli, M., Trincavelli, M. L., Verderio, C., Rosa, P., Lecca, D., Ferrario, S., Parravicini, C., Capra, V., Gelosa, P., Guerrini, U., Belcredito, S., Cimino, M., Sironi, L., Tremoli, E., Rovati, G. E., Martini, C., & Abbracchio, M. P. (2006). The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. *The EMBO journal*, 25(19), 4615–4627. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601341>

Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P., & Stojilkovic, S. S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews*, 63(3), 641–683. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003129>

Coppi, E., Maraula, G., Fumagalli, M., Failli, P., Cellai, L., Bonfanti, E., Mazzoni, L., Coppini, R., Abbracchio, M. P., Pedata, F., & Pugliese, A. M. (2013). UDP-glucose enhances outward K(+) currents necessary for cell differentiation and stimulates cell migration by activating the GPR17 receptor in oligodendrocyte precursors. *Glia*, 61(7), 1155–1171. <https://doi.org/10.1002/glia.22506>

Cosentino, S., Castiglioni, L., Colazzo, F., Nobili, E., Tremoli, E., Rosa, P., Abbracchio, M. P., Sironi, L., & Pesce, M. (2014). Expression of dual nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor GPR17 in early trafficking of cardiac stromal cells after myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(9), 1785–1796. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12305>

Cummings, B. J., Engesser-Cesar, C., Cadena, G., & Anderson, A. J. (2007). Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behavioural brain research*, 177(2), 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.042>

DeBrot, A., & Yao, L. (2018). The combination of induced pluripotent stem cells and bioscaffolds holds promise for spinal cord regeneration. *Neural regeneration research*, 13(10), 1677–1684. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.238602>

Di Virgilio, F., Ceruti, S., Bramanti, P., & Abbracchio, M. P. (2009). Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends in neurosciences*, 32(2), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.003>

Duncan, G. J., Manesh, S. B., Hilton, B. J., Assinck, P., Plemel, J. R., & Tetzlaff, W. (2020). The fate and function of oligodendrocyte progenitor cells after traumatic spinal cord injury. *Glia*, 68(2), 227–245. <https://doi.org/10.1002/glia.23706>

Eberini, I., Daniele, S., Parravicini, C., Sensi, C., Trincavelli, M. L., Martini, C., & Abbracchio, M. P. (2011). In silico identification of new ligands for GPR17: a promising therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Journal of computer-aided molecular design*, 25(8), 743–752. <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9455-8>

Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B., & Sofroniew, M. V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(9), 2143–2155. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004>

Fitch, M. T., & Silver, J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental neurology*, 209(2), 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.05.014>

Franke, H., Parravicini, C., Lecca, D., Zanier, E. R., Heine, C., Bremicker, K., Fumagalli, M., Rosa, P., Longhi, L., Stocchetti, N., De Simoni, M. G., Weber, M., & Abbracchio, M. P. (2013). Changes of the GPR17 receptor, a new target for neurorepair, in neurons and glial cells in patients with traumatic brain injury. *Purinergic signalling*, 9(3), 451–462. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9366-3>

Fratangeli, A., Parmigiani, E., Fumagalli, M., Lecca, D., Benfante, R., Passafaro, M., Buffo, A., Abbracchio, M. P., & Rosa, P. (2013). The regulated expression, intracellular trafficking, and membrane recycling of the P2Y-like receptor GPR17 in Oligodendroglial cells. *The Journal of biological chemistry*, 288(7), 5241–5256. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404996>

Fumagalli, M., Daniele, S., Lecca, D., Lee, P. R., Parravicini, C., Fields, R. D., Rosa, P., Antonucci, F., Verderio, C., Trincavelli, M. L., Bramanti, P., Martini, C., & Abbracchio, M. P. (2011). Phenotypic changes, signaling pathway, and functional correlates of GPR17-expressing neural precursor cells during oligodendrocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 286(12), 10593–10604. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.162867>

Fumagalli, M., Lecca, D., & Abbracchio, M. P. (2016). CNS remyelination as a novel reparative approach to neurodegenerative diseases: The roles of purinergic signaling and the P2Y-like receptor GPR17. *Neuropharmacology*, 104, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.005>

Fumagalli, M., Lecca, D., Coppolino, G. T., Parravicini, C., & Abbracchio, M. P. (2017). Pharmacological Properties and Biological Functions of the GPR17 Receptor, a Potential Target for Neuro-Regenerative Medicine. *Advances in experimental medicine and biology*, 1051, 169–192. https://doi.org/10.1007/5584_2017_92

Genovese, T., Rossi, A., Mazzon, E., Di Paola, R., Muià, C., Caminiti, R., Bramanti, P., Sautebin, L., & Cuzzocrea, S. (2008). Effects of zileuton and montelukast in mouse experimental spinal cord injury. *British journal of pharmacology*, 153(3), 568–582. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707577>

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>

Gross, C. G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(1), 67-73.

Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current opinion in cell biology*, 32, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>

Idzko, M., Ferrari, D., & Eltzschig, H. K. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, 509(7500), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nature13085>

Kang, Y., Ding, H., Zhou, H., Wei, Z., Liu, L., Pan, D., & Feng, S. (2018). Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review. *Journal of Neurorestoration*, 6(1), 3.

Kirshblum, S. C., Burns, S. P., Biering-Sorensen, F., Donovan, W., Graves, D. E., Jha, A., Johansen, M., Jones, L., Krassioukov, A., Mulcahey, M. J., Schmidt-Read, M., & Waring, W. (2011). International standards for neurological classification of spinal cord injury (revised 2011). *The journal of spinal cord medicine*, 34(6), 535–546. <https://doi.org/10.1179/204577211X13207446293695>

Korkmaz, K., Gedik, H. S., Budak, A. B., Yener, A. U., Kaya, E., Genc, S. B., & Cagli, K. (2015). Effect of Montelukast on Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury. *Turkish neurosurgery*, 25(5), 757-765.

Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*, 32, 149–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>

Lecca, D., & Ceruti, S. (2008). Uracil nucleotides: from metabolic intermediates to neuroprotection and neuroinflammation. *Biochemical pharmacology*, 75(10), 1869–1881. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.12.009>

Lecca, D., Trincavelli, M. L., Gelosa, P., Sironi, L., Ciana, P., Fumagalli, M., Villa, G., Verderio, C., Grumelli, C., Guerrini, U., Tremoli, E., Rosa, P., Cuboni, S., Martini, C., Buffo, A., Cimino, M., & Abbracchio, M. P. (2008). The recently identified P2Y-like receptor GPR17 is a sensor of brain damage and a new target for brain repair. *PLoS one*, 3(10), e3579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003579>

Lesiones medulares. (2013, 19 noviembre). Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>

Levine, J. M., Reynolds, R., & Fawcett, J. W. (2001). The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends in neurosciences*, 24(1), 39–47. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01691-x](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01691-x)

Li WJ, Mao FX, Chen HJ, Qian LH, Buzby JS. Treatment with UDP-glucose, GDNF, and memantine promotes SVZ and white matter self-repair by endogenous glial progenitor cells in neonatal rats with ischemic PVL. *Neuroscience*. 2015;284:444-458. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.10.012

Li, N., & Leung, G. K. (2015). Oligodendrocyte Precursor Cells in Spinal Cord Injury: A Review and Update. *BioMed research international*, 2015, 235195. <https://doi.org/10.1155/2015/235195>

Li, W. J., Mao, F. X., Chen, H. J., Qian, L. H., & Buzby, J. S. (2015). Treatment with UDP-glucose, GDNF, and memantine promotes SVZ and white matter self-repair by endogenous glial progenitor cells in neonatal rats with ischemic PVL. *Neuroscience*, 284, 444–458. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.10.012>

Maciel, C. (2019). Modulación purinérgica en las células endimarias de la médula espinal (Tesis de maestría). Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

Maisel, M., Herr, A., Milosevic, J., Hermann, A., Habisch, H. J., Schwarz, S., Kirsch, M., Antoniadis, G., Brenner, R., Hallmeyer-Elgner, S., Lerche, H., Schwarz, J., & Storch, A. (2007). Transcription profiling of adult and fetal human neuroprogenitors identifies divergent paths to maintain the neuroprogenitor cell state. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(5), 1231–1240. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0617>

Malatesta, P., Appolloni, I., & Calzolari, F. (2008). Radial glia and neural stem cells. *Cell and tissue research*, 331(1), 165-178.

Mao, F. X., Li, W. J., Chen, H. J., Qian, L. H., & Buzby, J. S. (2012). Periventricular leukomalacia long-term prognosis may be improved by treatment with UDP-glucose, GDNF, and memantine in neonatal rats. *Brain research*, 1486, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.09.033>

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., Reali, C., Trujillo-Cenóz, O., & Russo, R. E. (2017). Spinal cord stem cells in their microenvironment: the ependyma as a stem cell niche. *Stem Cell Microenvironments and Beyond*, 55-79.

Marucci, G., Dal Ben, D., Lambertucci, C., Santinelli, C., Spinaci, A., Thomas, A., Volpini, R., & Buccioni, M. (2016). The G Protein-Coupled Receptor GPR17: Overview and Update. *ChemMedChem*, 11(23), 2567–2574. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600453>

Maynard, F. M., Jr, Bracken, M. B., Creasey, G., Ditunno, J. F., Jr, Donovan, W. H., Ducker, T. B., Garber, S. L., Marino, R. J., Stover, S. L., Tator, C. H., Waters, R. L., Wilberger, J. E., & Young, W. (1997). International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury. American Spinal Injury Association. *Spinal cord*, 35(5), 266–274. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3100432>

Meletis, K., Barnabé-Heider, F., Carlén, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O., & Frisé, J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS biology*, 6(7), e182. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060182>

Metz, G. A., & Whishaw, I. Q. (2002). Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore-and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *Journal of neuroscience methods*, 115(2), 169-179.

Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*, 93(3), 421–443. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>

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>

National Institute of Neurological Diseases and Stroke (NINDS). (2014). Spinal Cord Injury: Hope Through Research. (E. a. U.S. Department of Health, Ed.) Bethesda, Maryland, Estados Unidos . Obtenido de <https://catalog.ninds.nih.gov/pubstatic//14-160/14-160.pdf>

Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U. K., Kirchhoff, F., & Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia*, 33(1), 72–86.

Nyamoya, S., Leopold, P., Becker, B., Beyer, C., Hustadt, F., Schmitz, C., Michel, A., & Kipp, M. (2019). G-Protein-Coupled Receptor Gpr17 Expression in Two Multiple Sclerosis Remyelination Models. *Molecular neurobiology*, 56(2), 1109–1123. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1146-1>

Orr, M. B., & Gensel, J. C. (2018). Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 15(3), 541–553. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0631-6>

Ou, Z., Sun, Y., Lin, L., You, N., Liu, X., Li, H., Ma, Y., Cao, L., Han, Y., Liu, M., Deng, Y., Yao, L., Lu, Q. R., & Chen, Y. (2016). Olig2-Targeted G-Protein-Coupled Receptor Gpr17 Regulates Oligodendrocyte Survival in Response to Lysolecithin-Induced Demyelination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(41), 10560–10573. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0898-16.2016>

Oyinbo C. A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 71(2), 281–299.

Panara, M. R., Renda, G., Sciulli, M. G., Santini, G., Di Giamberardino, M., Rotondo, M. T., Tacconelli, S., Seta, F., Patrono, C., & Patrignani, P. (1999). Dose-dependent inhibition of platelet cyclooxygenase-1 and monocyte cyclooxygenase-2 by meloxicam in healthy subjects. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 290(1), 276–280.

Parravicini, C., Ranghino, G., Abbracchio, M. P., & Fantucci, P. (2008). GPR17: molecular modeling and dynamics studies of the 3-D structure and purinergic ligand binding features in comparison with P2Y receptors. *BMC bioinformatics*, 9, 263. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-263>

Pugliese, A. M., Trincavelli, M. L., Lecca, D., Coppi, E., Fumagalli, M., Ferrario, S., Failli, P., Daniele, S., Martini, C., Pedata, F., & Abbracchio, M. P. (2009). Functional characterization of two isoforms of the P2Y-like receptor GPR17: [35S]GTPgammaS binding and electrophysiological studies in 1321N1 cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 297(4), C1028–C1040. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00658.2008>

Raport, C. J., Schweickart, V. L., Chantry, D., Eddy, R. L., Jr, Shows, T. B., Godiska, R., & Gray, P. W. (1996). New members of the chemokine receptor gene family. *Journal of leukocyte biology*, 59(1), 18–23. <https://doi.org/10.1002/jlb.59.1.18>

Reynolds, B. A., & Rietze, R. L. (2005). Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nature methods*, 2(5), 333–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth758>

Sabelström, H., Stenudd, M., & Frisén, J. (2014). Neural stem cells in the adult spinal cord. *Experimental neurology*, 260, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.026>

Sabelström, H., Stenudd, M., Réu, P., Dias, D. O., Elfineh, M., Zdunek, S., Damberg, P., Göritz, C., & Frisén, J. (2013). Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6158), 637–640. <https://doi.org/10.1126/science.1242576>

Silva, N. A., Sousa, N., Reis, R. L., & Salgado, A. J. (2014). From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in neurobiology*, 114, 25–57. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.002>

Simpson, L. A., Eng, J. J., Hsieh, J. T., Wolfe, D. L., & Spinal Cord Injury Rehabilitation Evidence Scire Research Team (2012). The health and life priorities of individuals with spinal cord injury: a systematic review. *Journal of neurotrauma*, 29(8), 1548–1555. <https://doi.org/10.1089/neu.2011.2226>

Surprenant, A., & North, R. A. (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annual review of physiology*, 71, 333–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630>

Thietje R., Hirschfeld S. (2017) Epidemiology of Spinal Cord Injury. In: Weidner N., Rupp R., Tansey K. (eds) *Neurological Aspects of Spinal Cord Injury*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46293-6_1

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

Wang, X., Arcuino, G., Takano, T., Lin, J., Peng, W. G., Wan, P., Li, P., Xu, Q., Liu, Q. S., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2004). P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nature medicine*, 10(8), 821–827. <https://doi.org/10.1038/nm1082>

Wang, Y., Yang, Y., Zhang, S., Li, C., & Zhang, L. (2020). Modulation of neuroinflammation by cysteinyl leukotriene 1 and 2 receptors: implications for cerebral ischemia and neurodegenerative diseases. *Neurobiology of aging*, 87, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.12.013>

Yuan, Y. M., & He, C. (2013). The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neuroscience bulletin*, 29(4), 421–435. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1358-3>

Zhao, B., Wang, H., Li, C. X., Song, S. W., Fang, S. H., Wei, E. Q., & Shi, Q. J. (2018). GPR17 mediates ischemia-like neuronal injury via microglial activation. *International journal of molecular medicine*, 42(5), 2750–2762.

Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645–660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>

Zhao, R., Shi, W. Z., Zhang, Y. M., Fang, S. H., & Wei, E. Q. (2011). Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist, attenuates chronic brain injury after focal cerebral ischaemia in mice and rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(4), 550-557.