Propiedades de los componentes celulares en un nicho neurogénico de la médula espinal



Cecilia Reali

Tésis de doctorado Neurofisiología Celular y Molecular Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay

Propiedades de los componentes celulares en un nicho neurogénico de la médula espinal

Mag. Cecilia Reali

Neurofisiología Celular y Molecular Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay

Orientador: Dr. Raúl Russo Co-orientador: Dr. Omar Trujillo-Cenóz Tribunal: Cristina Arruti Alejandro Shinder Michel Borde

INDICE

-Agradecimientos		1
-Abreviaturas		2
-Resumen		3
-Introducción general		
A. Reseña histórica	sobre la neurogénesis	5
B. Una visión del pre	esente	6
C. Neurogéneis pos	t-natal en la médula espinal	7
D. La médula espina	al de la tortuga: un modelo valioso para estudiar aspectos	clave
de los mecanismos	neurogénicos	8
-Métodos		
A. General		10
B. Inyección de Brd	J	10
C. Preparación y reg	gistro electrofisiológico	11
D. Drogas		12
E. Imagenología de	Ca ²⁺	13
F. Identificación de l	as células registradas	14
G. Inmunohistoquím	ica	14
-Capítulo I. El epéndimo	de la médula espinal como nicho neurogénico	
IA. Antecedentes		16
IA.1. Células precur	soras alrededor del CC	16
IA.2. Nuevas neuror	nas en los nichos neurogénicos	17
IB. Resultados		
IB.1. La zona que ro	dea al CC es un nicho de células proliferantes	18
IB.2. Un dominio de	precursores acoplados por difusión de colorante en los	
cuadrantes laterales	del CC	20
IB2.1. Fenotipo	s de los precursores en los cuadrantes laterales del CC	20
IB2.2. Heteroge	eneidad electrofisiológica de los "clusters" de precursores	22
IB2.3. Los "clus	ters" laterales contienen GRs	24
IB2.4. Fenotipo	molecular de los precursores en los cuadrantes laterales o	lel
CC: ¿un precur	sor neuronal?	26
IB2.5. Relación	espacial entre precursores PLBP ⁺ y neuronas inmaduras	27
IB2.6. Bases m	oleculares del acoplamiento entre precursores	29

IB.2.7. Los "clusters" laterales BLBP ⁺ contienen células que se dividen31
IB.3. GRs en los cuadrantes mediales del CC31
IB.4. Neuronas inmaduras alrededor del CC35
IB.5. ¿Formas celulares de "transición"?
IC. Discusión
IC.1. El acople a través de uniones "gap" de los precursores: ¿una asociación para
proliferar?41
IC.2. La Cx43 delimita espacialmente dominios de precursores neurogénicos42
IC.3. Heterogeneidad electrofisiológica de las GRs conectadas al CC44
IC.4. Neuronas en distintos grados de maduración46
IC.5. Formas celulares de "transición"47

-Capítulo II. Señalización vía neurotransmisores en el nicho neurogénico que rodea al CC

IIA. Antecedentes			
IIA.1. Señalización GABAérgica en nichos neurogénicos49			
IIA.2. Señalización purinérgica y neurogénesis50			
IIB. Resultados			
IIB.1. EI GABA alrededor del CC51			
IIB.2. Corrientes inducidas por GABA en las células precursoras			
IIB.3. Corrientes inducidas por GABA en las neuronas inmaduras que contactan el			
CC			
IIB.4. Respuestas de Ca ²⁺ intracelulares inducidas por GABA62			
IIB.5. Respuestas al ATP en las células precursoras64			
IIB.6. Origen de las respuestas de Ca ²⁺ intracelulares generadas por el ATP66			
IIB.7. El bloqueo de las uniones de tipo "gap" y/o hemicanales de conexinas cambia			
las respuestas de los precursores al ATP67			
IIC. Discusión			
IIC.1. El origen de GABA alrededor del CC69			
IIC.2. Señalización GABAérgica en los precursores espinales70			
IIC.3. GABA: ¿una señal para la maduración?72			
IIC.4. GABA y Ca ²⁺ : un tándem para la neurogénesis73			
IIC.5. Señalización purinérgica sobre los precursores espinales: corrientes			
complejas y aumentos de Ca ²⁺ 74			

IIC.6. Importancia de la regulación vía neurotransmisores en el epéndimo76

Conclusión y Perspectivas77
A. ¿Células madre y células amplificadoras en el epéndimo?77
B. Heterogeneidad funcional de las GRs y su probable significado funcional78
C. Nuevas neuronas en el epéndimo: ¿elementos de remplazo para los circuitos
espinales?80
D. Regulación de la neurogénesis por neurotransmisores
-Referencias
Anexo: Artículos publicados con datos de esta Tesis

A mi familia y especialmente a mi madre y a Florencia que siempre me ayudaron con todo y más de lo que se imaginan...

A Raúl Russo quien me ha enseñado y orientado en el mundo de la ciencia hace ya más de 10 años...

A Omar Trujillo-Cenóz y a Omar Macadar que me enseñan en todos los sentidos de la vida...

A Milka Radmilovich, Anabel Fernández, Gabriela Fabbiani, María Ines Rehermann, Omar Trujillo-Cenóz y Raúl Russo por ser parte de este trabajo.

A doña Carmen por cuidar a quienes hicieron posible esta investigación: las tortugas...

A Gabriela Fabbiani, Gabriela García, Lucía Perez, Nicolás Marichal, Rossana Perrone, Ana Silva, Laura Quintana, Felipe Sierra, Lucia Zubizarreta y Gervasio Batista por estar siempre...

A Michel Borde por sus enseñanzas no solo como tribunal de esta Tesis sino también durante toda mi carrera.

A Cristina Arruti por el tiempo dedicado a corregir y mejorar esta Tesis.

A Alejandro Shinder por aceptar ser miembro del tribunal y dedicar su tiempo a esta Tesis.

El esfuerzo lo es todo...

Abreviaturas

AMF: Ácido meclofenámico BLBP: "Brain lipid-binding protein" BrdU: Bromodeoxiuridina CC: Canal central Cbx: Carbenoxolona Cx26: Conexina 26 Cx43: Conexina 43 EGABA: Potencial de reversión de las corrientes de GABA EK: Potencial de reversión de las corrientes de K+ GAT1: GABA transportador-1 GAT3: GABA transportador-3 GFAP: "Glial fibrillary acidic protein" GR: Glia radial GAD-65/67: "glutamic acid decarboxylase" 65/67 HuC/D: "Human neuronal protein" I_A: corriente de K⁺ de tipo A I_{KD} : corrientes de K⁺ de tipo rectificador retardado KCC2: K+-Cl- co-transportador NKCC1: Na+-K+-2CI- co-transportador PM: Potencial de membrana R_{IN}: resistencias de entrada SNC: Sistema Nervioso Central **TEA:** Tetraetilamonio TTX: Tetrodotoxina ZSG: Zona subgranular ZSV: Zona subventricular

Resumen

Numerosos estudios sugieren que la neurogénesis post-natal podría formar parte del conjunto de mecanismos subyacentes a la asombrosa plasticidad del sistema nervioso central (SNC). En mamíferos, existen dos nichos en el cerebro adulto -la zona subventricular (ZSV) y la zona subgranular (ZSG)- con la capacidad de alojar células precursoras y generar nuevas neuronas que se integran funcionalmente a los circuitos existentes. A pesar de que actualmente se reconocen sólo estos dos nichos neurogénicos, existen otras regiones del SNC que tienen características que hacen suponer cierta potencialidad neurogénica. Por ejemplo, las células que rodean el canal central (CC) de la médula espinal adulta derivan de la parte ventral del tubo neural y parecen haber conservado algunas de las propiedades de los precursores presentes durante el desarrollo embrionario. A pesar de esto, cuando se produce una lesión de la médula espinal la reparación endógena es mínima, contrastando con lo que ocurre en vertebrados inferiores en los cuales los circuitos pueden ser reparados mediante mecanismos que incluyen fenómenos neurogénicos. Sin embargo, los componentes celulares y moleculares que caracterizan estos nichos neurogénicos son prácticamente desconocidos. Un paso importante para entender la neurogénesis post-natal en la médula espinal es profundizar en el conocimiento de los precursores y de las neuronas inmaduras a través de un enfogue multi-técnico. En este sentido, la médula espinal en las tortugas de agua dulce Trachemys dorbignyi representa un modelo ideal para este tipo de estudio. Nuestro grupo encontró que rodeando el CC de la médula espinal de las tortugas existen células mitóticamente activas que darían lugar tanto a glías como a neuronas y células que expresan marcadores típicos de neuronas inmaduras con la capacidad de descargar potenciales de acción. En esta Tesis nos planteamos profundizar en el conocimiento de las propiedades de los precursores y las neuronas inmaduras presentes en este modelo. Combinando registros de "patch-clamp", inmunohistoguímica, microscopía electrónica e imagenología de Ca²⁺ aportamos variadas evidencias de que las células que contactan el CC comparten propiedades fundamentales con los precursores y con las neuronas inmaduras presentes en el embrión y en nichos neurogénicos de los cerebros de aves y mamíferos adultos. Encontramos que rodeando al CC existen distintos tipos de células precursoras y que las células con potencialidad neurogénica están espacialmente confinadas a dominios en los cuadrantes laterales del CC acoplados a través de uniones

de tipo "gap". Asimismo, presentamos evidencias que sugieren que en el epéndimo hay células que se encuentran en diferentes grados de maduración neuronal y describimos fenotipos celulares que parecen representar formas transicionales entre los precursores y las neuronas inmaduras. Finalmente, estudiamos la señalización a través del GABA y el ATP, dos neurotransmisores importantes para la modulación de los procesos neurogénicos. Nuestros resultados representan la primera evidencia de que el epéndimo en la médula espinal tiene varios componentes de la señalización GABAérgica y purinérgica característicos de los nichos neurogénicos. El hecho de que las propiedades encontradas en este nicho sean conservadas a lo largo de la evolución sugiere que el estudio en la médula espinal de la tortuga es sumamente valioso para entender aspectos clave de los mecanismos neurogénicos que están ausentes, o permanecen latentes en la médula espinal de mamíferos adultos, y que podrían ser manipulados para promover la reparación de la médula espinal dañada.

Introducción general

A. Reseña histórica sobre la neurogénesis

El concepto, casi un dogma, que considera a la organización del SNC adulto como fija, en el cual las neuronas solo pueden morir pero no nacer (Santiago Ramón y Cajal, 1914), prevaleció hasta los inicios de la década de los 60. Este dogma, se originó fundamentalmente por la poca capacidad de reparación del SNC, que hace de los animales y seres humanos con lesiones cerebrales o espinales, minusválidos permanentes. Los primeros datos que cuestionaron esa "visión estática" del SNC se originaron a partir del uso de la timidina tritiada que permitió localizar con técnicas autorradiográficas a las células en fase de síntesis del ADN. Aplicando esta técnica, Altman encontró células marcadas en el cerebro de mamíferos adultos a las que identificó como neuronas (Altman, 1962; 1963; Altman y Das, 1965). Posteriormente, otros investigadores (Kaplan y Hinds, 1977; Kaplan, 1985) confirmaron estos resultados combinando la autorradiografía y la microscopía electrónica. Sin embargo, no fue hasta la introducción de la técnica de inmunomarcado con bromodeoxiuridina (BrdU, un análogo sintético de la timidina) que se pudo identificar en forma rigurosa la naturaleza de las células proliferantes y sus progenies. Una de las ventajas del uso del BrdU es la posibilidad de combinar su detección con la de otros marcadores aptos para la determinación inmunohistoquímica del fenotipo celular. Los resultados obtenidos con estas técnicas confirmaron los hallazgos pioneros de Altman, extendiéndolos a diversas especies de invertebrados y vertebrados incluyendo al hombre (Nottebohm y col., 1994; Cayre y col., 1996; Eriksson y col., 1998). Todas estas aproximaciones experimentales presentan limitaciones como por ejemplo el hecho de que marcadores típicos de neuronas pueden reconocer células gliales (ver Rakic, 2002 a-b). Esto generó la necesidad de incluir otros criterios para determinar, sin ambigüedades, la existencia de neurogénesis post-natal. Se hizo necesario entonces analizar la capacidad de generar potenciales de acción al igual que la presencia de sinapsis funcionales en células candidatas a ser nuevas neuronas. La aplicación de estos abordajes multi-técnicos ha llevado a la acumulación de evidencia concluvente que hace hoy comúnmente aceptable la afirmación de que las neuronas en el cerebro adulto pueden ser generadas a lo largo de toda la vida (Gross, 2000, Gage y col., 2008). Se debe hacer notar que la incorporación de nuevas neuronas en circuitos adultos varía según la especie, y está limitada a algunas regiones particulares del cerebro. Por ejemplo, en los mamíferos se acepta la existencia de solo dos nichos neurogénicos que persisten en el adulto: la ZSV y la ZSG del giro dentado. Estas regiones poseen la capacidad de alojar células precursoras y generar nuevas neuronas que se integran funcionalmente al bulbo olfatorio y al hipocampo, respectivamente (ver Álvarez-Buylla y Lim, 2004). La existencia en organismos inferiores de neurogénesis post-natal en otras estructuras del SNC pone en evidencia la necesidad de estudiar las diferencias en potencial neurogénico en diversos grupos zoológicos y distintas regiones del sistema nervioso (Gage, 2002). Los datos aportados por estudios comparativos, podrían ser importantes para entender el papel funcional de la neurogénesis post-natal, y en el hombre su vinculación con la posibilidad de recuperación en enfermedades degenerativas o traumáticas.

B. Una visión del presente

Numerosos estudios sugieren hoy que la neurogénesis post-natal podría formar parte del conjunto de mecanismos que hacen posible la asombrosa plasticidad del SNC y que son el sustrato de fenómenos plásticos tan diversos como los cambios estacionales en el canto de las aves (Nottebohm, 1987), la discriminación de olores en el bulbo olfatorio (Carleton y col., 2003; Lazarini y Lledo, 2011) y la memoria en el hipocampo (van Praag y col., 2002). Además, estudios recientes sugieren que en el giro dentado no solo las nuevas neuronas maduras cumplen un papel funcional, sino que también las neuronas en vías de diferenciación son relevantes en el procesamiento de la información (Marín-Burgin y Schinder, 2011). Sin embargo, para preservar el funcionamiento de los circuitos adultos debe de existir una eficiente regulación de los fenómenos neurogénicos. Estos parecen estar controlados no solo por programas genéticos sino por factores epigenéticos que aseguran el correcto ensamblado y funcionamiento de las nuevas células nerviosas (Spitzer, 2006; Ben-Ari y Spitzer, 2010). Un componente fundamental del control epigenético es la regulación a través de la señalización por neurotransmisores (Nguyen y col., 2001; Ma y col., 2009). En este sentido, hay indicios de que los procesos neurogénicos son modificados en los mamíferos por el estrés (Gould y col., 1998; Tanapat y col., 2001) y otros factores ambientales (van Prag y col., 2000) así como por la actividad motora (van Praag y col., 1999; Brown y col., 2003). Por lo tanto, un paso importante para entender los procesos de neurogénesis post-natal es comprender cómo las células progenitoras deciden sus destinos y cómo las neuronas recién nacidas migran y se

6

integran correctamente a circuitos con funciones ya especificadas.

C. Neurogéneis post-natal en la médula espinal

En la médula espinal, la neurogénesis adulta parece haber desaparecido en los mamíferos pero se ha mantenido en peces (Birse y col., 1980), anfibios (Clorfene y Pollack, 1994) y reptiles (Fernández y col., 2002; Russo y col., 2004). También se sabe que en respuesta a diferentes estímulos, la actividad neurogénica puede ser modulada o reiniciada. Por ejemplo, en peces se ha demostrado que luego de una lesión espinal los circuitos pueden ser reparados mediante mecanismos endógenos que incluyen fenómenos neurogénicos (Dervan y Roberts, 2003). Las células que rodean el CC de la médula espinal adulta derivan de la parte ventral del tubo neural y este hecho parece haber sido conservado durante la evolución (Fu y col., 2003). En las primeras etapas del desarrollo del tubo neural, códigos dinámicos de transcripción definen dominios de precursores de los cuales se originan subtipos específicos de neuronas espinales (Lee y Pfaff, 2001). Briscoe y col. (2000) han propuesto que el neuroepitelio espinal ventral se puede dividir en cinco dominios diferentes basados en la expresión combinatoria de proteínas de la familia de los homeodomineos. La región de la cual provienen las células ependimarias deriva del dominio de los precursores de motoneuronas e interneuronas V2 (Briscoe y col., 2000). En este sentido, las células que rodean al CC adulto parecen haber conservado parte de la señalización molecular que funciona durante la embriogénesis (Tanaka y Ferreti, 2009). Es de destacar, además, que algunas de sus células retienen propiedades de los precursores primitivos (Tanaka y Ferreti, 2009).

A pesar de que en la médula espinal de los mamíferos existen células en contacto con el CC con la capacidad de proliferar, cuando se produce daño espinal la reparación endógena es mínima (Johansson y col., 1999; Meletis y col., 2008). Según Horner y col. (2000) las células proliferantes inducidas por la lesión generalmente se diferencian para dar lugar a nuevas células gliales. Sin embargo, también existen estudios que sugieren que se pueden generar nuevas neuronas si el ambiente es adecuado. Kehl y col. (1997) mostraron que en cultivos celulares obtenidos a partir de la médula espinal de ratas adultas, existen precursores que pueden dan lugar a células identificadas por sus propiedades electrofisiológicas e inmunohistoquímicas como neuronas. Más interesante aún, Shihabudding y col. (2000) demostraron a través del trasplante al hipocampo de precursores espinales -que normalmente no producen neuronas- que en ese nuevo medio

adquieren capacidad neurogénica. Esto significa que el ambiente en que se encuentran normalmente los precursores puede inhibir la diferenciación hacia el linaje neuronal. Por otro lado, se ha reportado en un modelo experimental de esclerosis múltiple en ratas adultas, que los cambios en el medio ambiente de la médula espinal en esta patología permiten la génesis de nuevas neuronas a partir de las células que rodean al CC (Danilov y col., 2006). Finalmente, datos recientes obtenidos en ratones adultos sin ningún tipo de enfermedad o trauma (Shechter y col., 2007) sugieren la generación de nuevas células en el epéndimo que expresan marcadores típicos de neuronas inmaduras. Estos autores describieron que tanto la proliferación de los precursores como su sobrevida son moduladas por la estimulación mecanosensorial (Shechter y col., 2010). Sin embargo, nunca encontraron en estas nuevas células marcadores típicos de neuronas maduras, por lo que suponen que no se integrarían a los circuitos espinales existentes (Shechtery col., 2010). Estos resultados son objeto de controversias, ya que tanto la expresión de neurotransmisores (Araque y col., 2001) como de proteínas típicas de neuronas inmaduras (Kuhn y Peterson, 2008) pueden ocurrir ocasionalmente en células de estirpe glial. En su conjunto, los antecedentes mencionados sugieren que en los mamíferos además de la ZSV y la ZSG- el epéndimo en la médula espinal constituye un nicho de células precursoras con capacidad para generar nuevas neuronas luego del nacimiento.

D. La médula espinal de la tortuga: un modelo valioso para estudiar aspectos clave de los mecanismos neurogénicos

Es importante mencionar que hasta ahora las características electrofisiológicas de las células progenitoras neurales y los mecanismos que participan en la incorporación de nuevas neuronas a los circuitos espinales maduros es un tema no abordado aun. Por lo tanto, un paso importante para entender los procesos de neurogénesis post-natal en la médula espinal es profundizar en el conocimiento de los precursores y de las neuronas inmaduras a través de un enfoque multi-técnico. En este sentido, la médula espinal de las tortugas se presenta como un modelo ideal para este tipo de estudio. La excelente resistencia a la anoxia de las tortugas (Jackson, 2002) constituye una ventaja única para hacer registros electrofisiológicos ya que permite mantener rodajas de tejido vivo por largos períodos de tiempo (varios días a 4 °C o por más de 24 hs a temperatura ambiente). Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, en la medula espinal de estos quelonios persisten alrededor del CC células que se dividen junto con

células que expresan marcadores típicos de neuronas inmaduras con la capacidad de descargar potenciales de acción (Fernández y col., 2002; Russo y col., 2004). Además, en esta región la proliferación celular es regulada por diferentes factores como la temperatura ambiental (Radmilovich y col., 2003) o el daño tisular (Rehermann y col, 2009; 2011). Por lo tanto, los datos obtenidos por nuestro grupo de trabajo ponen al epéndimo de la tortuga como un nicho neurogénico activo inmerso en redes ya operantes. Cabe resaltar que según Zardoya y Meyer (1998), la relación filogenética entre los mamíferos y quelonios es cercana. Más aún, la morfología de los precursores alrededor del CC de la tortuga es similar a la descrita por Lenhossek (1895) y Ramón y Cajal (1909) en seres humanos recién nacidos. Estudios comparativos entre mamíferos y reptiles podrían ser importantes para entender aspectos clave de los mecanismos neurogénicos que están ausentes, o permanecen latentes en la médula espinal de mamíferos adultos, y que podrían ser manipulados para promover la reparación de la médula espinal dañada.

En esta Tesis, nos planteamos contribuir al conocimiento de las propiedades de los progenitores neurales y las neuronas inmaduras en el CC de la médula espinal de tortugas juveniles, con el objetivo de entender los procesos neurogénicos en circuitos espinales maduros. En ese contexto, nos propusimos responder a tres interrogantes que consideramos relevantes: a) ¿cuáles son las características moleculares, morfológicas y electrofisiológicas que poseen las células progenitoras neurales en la médula espinal de las tortugas juveniles?, b) ¿qué cambios experimentan estas células durante el proceso de maduración neuronal?, c) ¿Cómo es la señalización por neurotransmisores de las células progenitoras y en las neuronas inmaduras? Es así que en la primera parte de esta tesis identificamos y caracterizamos a las células progenitoras neurales. También estudiamos las características electrofisiológicas de las neuronas inmaduras en contacto con la luz del CC. A lo largo de nuestro estudio no solo encontramos dos tipos celulares fácilmente identificables sino también fenotipos que llamamos de transición. Por último, estudiamos la señalización a través del GABA y el ATP, dos neurotransmisores que parecen ser importantes en la modulación de los procesos neurogénicos. Nuestros resultados muestran que los componentes celulares del epéndimo de la médula espinal de las tortugas comparten propiedades fundamentales con los precursores y las neuronas inmaduras presentes en el embrión y en nichos neurogénicos de cerebros de aves y mamíferos adultos (Doetsch y col., 1997; Alvarez-Buylla y col., 2002).

Métodos

A. General

Se utilizaron tortugas juveniles *Trachemys dorbignyi* cuyos tamaños estuvieron comprendidos entre 5–7 cm (largo de caparazón) siguiendo las normas éticas establecidas por nuestro Comité Local para la Protección de los Animales y la Investigación en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Los animales fueron mantenidos a una temperatura controlada (24–26°C) bajo iluminación natural y alimentados diariamente con lombrices pequeñas.

Desde el punto de vista sensorio-motor, las tortugas juveniles son indistinguibles de los especímenes adultos. Estudios previos (Reali y Russo, 2005) mostraron que los fenotipos electrofisiológicos de las neuronas en animales juveniles es idéntico a aquellos encontrados en tortugas adultas (Russo y Hounsgaard, 1996a; 1996b) y ratas adultas registradas *in vivo* (Reali y col., 2011).

B. Inyección de BrdU

Para estudiar la población de células proliferantes, usamos un protocolo acumulativo de BrdU (Nowakowski y col., 1989). Las tortugas (n= 5) recibieron siete inyecciones intraperitoneales de BrdU (50 µg/g peso corporal; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disuelto en 0.9% NaCl, con 0.007N NaOH, en un lapso de 24 hs. De acuerdo a Cameron y McKay (2001), la dosis usada en este trabajo provee a la mayoría de las células que están sintetizando ADN con la suficiente cantidad de BrdU para que aparezcan marcadas con claridad (Taupin, 2007). Dado que las células mitóticamente activas en la médula espinal tienen un ciclo celular largo (Horner y col., 2000), nosotros asumimos que un intervalo de 4 hs entre inyecciones era suficiente para marcar la totalidad de la población de células cuyo ciclo mitótico estuviera comprendido en un lapso de 24 hs. Los animales fueron sacrificados 4 hs luego de la última inyección y se hicieron rodajas como se describe más abajo. Los estudios de cuantificación fueron hechos en otro grupo experimental de animales (n= 4) usando el mismo protocolo de inyección, pero las tortugas fueron fijadas por perfusión y los cortes fueron hechos de 50–80 µm de espesor (ver más adelante).

C. Preparación y registro electrofisiológico

Para la obtención de las rodajas, las tortugas se sacrificaron por decapitación y se perfundieron intraventricularmente con una solución Ringer (6°C) constituida por NaCl 96.5 mM; KCl 2.6 mM; NaHCO₃ 31.5 mM; CaCl₂ 3 mM; MgCl₂ 2 mM; glucosa 10 mM. Dicha solución se saturó con carbógeno (O₂ 95%, CO₂ 5%) para mantener un pH de 7.6. El ensanchamiento espinal cervical se aisló y se cortaron rodajas transversales de 300 µm de espesor con un micrótomo vibratorio (HM 650 V, Microm International GmbH). Dado que las tortugas son extremadamente resistentes a la hipoxia (Jackson, 2002), algunas rodajas se utilizaron el mismo día de la disección mientras que otras se colocaron en un recipiente cerrado a 4 °C hasta el momento de su utilización (no más del segundo o tercer día siguientes a la disección). Durante los experimentos las rodajas se mantuvieron a temperatura ambiente (20-22 °C) y se perfundieron continuamente con solución de Ringer a una velocidad de flujo de 1ml/min. Las células fueron visualizadas con un microscopio (Leica DM LFS; Leica, Wetzlar, Germany) equipado con contraste de interferencia diferencial (DIC) y un objetivo de 40X (0.8 de apertura numérica).

Los registros de "patch" en modo "whole-cell" se hicieron con electrodos que contenían la siguiente solución: gluconato de K 122 mM; Na₂-ATP 5 mM; MgCl₂ 2.5 mM; CaCl₂ 0.0003 mM; gluconato de Mg 5.6 mM; K-Hepes 5 mM; H-Hepes 5 mM; EGTA 1 mM; pH 7.4, 5–10 MΩ. En algunos casos se agregaron fluoróforos tales como Lucifer yellow (0,1%, Sigma-Aldrich), Alexa 488 hidrazida (250-500 μ M) o Alexa 488 conjugada con dextran (500 μ M, peso molecular 10.000; Invitrogen, Eugene O) para ver a las células vivas luego de sus registros, utilizándose una fuente de epifluorescencia (Leica EL 6000) en el microscopio. Para una posterior caracterización morfológica de las células en las rodajas fijadas, siempre se agregó biocitina (10 mM) a la solución de la pipeta de registro.

Para estudiar los efectos fisiológicos del GABA –que actua como un neurotransmisor excitador en etapas tempranas de la neurogénesis debido a una alta concentración de CI- intracelular (Owens y Kriegstein, 2002)-, utilizamos la técnica de registro con gramicidina que genera poros permeables solamente a cationes monovalentes y pequeñas moléculas sin carga (Akaike, 1996) y permite un acceso "whole-cell" sin modificar la concentración de CI⁻ intracelular (Myers y Haydon, 1972). La gramicidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se disolvió en DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 5 mg/ml, mantenida a -20° C) y posteriormente se diluyo (5 µg/ml) en la solución de "patch" pre-filtrada y se usó dentro de las 2 h posterior a su preparación. Para facilitar la formación del sello, la punta del electrodo se llenó con solución de "patch" sin gramicidina

sumergiendo brevemente (~ 1-2 s) la parte de atrás de la pipeta en la solución. Luego de 15-30 minutos se obtuvieron registros perforados estables (< 70 M Ω resistencia en serie). Se usaron dos métodos para confirmar que los registros fueron obtenidos en la configuración de "patch" perforado: 1) la observación de la difusión del fluoróforo desde la pipeta hacia la célula, concomitantemente al pasaje de la configuración "perforada" a la "whole-cell" convencional; y 2) el uso de una alta concentración de Cl⁻ en la solución de "patch" (122 mM KCI), en cuyo caso la rotura del "patch" se evidenció por la aparición de una gran corriente entrante que revirtió cerca de los +6 mV, como cabe esperar de acuerdo a la ecuación de Nernst. La posibilidad de que el GABA actuara como un transmisor excitador fue también evaluada en registros realizados en el modo "cellattached". Esta modalidad de registro también se utilizó para estimar el potencial de membrana (PM) de las células sin el error introducido por la caída de potencial a través del sello (Verheugen y col., 1999; Fricker y col., 1999; Wang y col., 2003). Para esto, se usó una concentración de K⁺ en la pipeta similar a las estimadas en el interior de otras células (158 mM, Hille, 1992), y el PM se calculó a partir del potencial de reversión de las corrientes de K⁺ dependientes del voltaje (E_K). Para activar los canales de K⁺ dependientes del voltaje, aplicamos rampas de voltaje (de -140 a +200 mV). El E_K se obtuvo de la intersección entre la corriente de K⁺ y el ajuste al componente lineal.

Las células se estudiaron bajo condiciones de fijación de corriente y/o de voltaje usando un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, Palo Alto, CA). Los protocolos de estimulación fueron producidos utilizando el programa pClamp 10 (Molecular Devices, Palo Alto, CA), el cual también se utilizó para el posterior análisis de los datos. La resistencia en serie y la capacidad no fueron compensadas. En fijación de voltaje, las células fueron mantenidas a -70 mV (a no ser que se mencione otro valor) y el potencial de membrana de reposo se estimó de la relación corriente-voltaje (a l= 0). Los potenciales de unión se determinaron y corrigieron (Barry y Diamond, 1970). Los valores son expresados como el promedio ± el error estándar de la media (S.E.M.).

D. Drogas

Tanto el GABA (0.1-1 mM) como el baclofen (50 μ M), el muscimol (30-60 μ M) y el ATP (0.1-1 mM) fueron disueltos en solución de Ringer y aplicados por presión usando un Picospritzer III (Parker Instrumentation) con una pipeta de "patch" (2 μ m de diámetro en la punta) ubicada a 15-20 μ m del soma de la célula registrada. En algunos experimentos las

siguientes drogas fueron aplicadas al baño: carbenoxolona (Cbx, 100 μ M; Sigma-Aldrich, MO) o ácido meclofenámico (AMF, 100 μ M; Sigma-Aldrich, MO) para bloquear uniones tipo "gap"; tetraetilamonio (TEA, 10 mM; Sigma-Aldrich, MO) para bloquear los canales de K⁺; tetrodotoxina (TTX, 1 μ M; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) para bloquear canales de Na⁺; gabazina (10-20 μ M, Tocris Bioscience, Ellisville, MO) y bicuculina (40 μ M, Sigma-Aldrich, MO) para bloquear los receptores GABA_A; ácido nipecotico (0.1-1 mM, Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) o (S) SNAP 5114 (100 μ M, Sigma-Aldrich, MO) para bloquear las corrientes transportadoras de GABA; bumetanida (10-20 μ M, Sigma-Aldrich, MO) y furosemida (50-200 μ M, Sigma-Aldrich, MO) para bloquear los co-transportadores catiónicos de cloro; DNQX (20 μ M; Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) para bloquear los receptores GABA, Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) para bloquear los receptores CABA; bumetanida (10-20 μ M, Sigma-Aldrich, MO) y furosemida (50-200 μ M, Sigma-Aldrich, MO) para bloquear los co-transportadores catiónicos de cloro; DNQX (20 μ M; Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) para bloquear los receptores AMPA; AP-5 (50 μ M, Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) para bloquear los receptores NMDA y suramina (100 μ M, Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) para bloquear los receptores para el ATP.

E. Imagenología de Ca²⁺

Para hacer un marcado masivo de las células en contacto con el CC, las mismas se llenaron con el indicador de calcio Fluo-4 (Invitrogen) bajo la forma de acetoxymetil ester (Fluo4-AM, 15-20 µM) aplicado al medio por presión desde una pipeta de "patch" (Picospritzer III, Parker Instrumentation). Este indicador de Ca²⁺ se disolvió en 0.007% de ácido plurónico (Invitrogen) y 0.3% DMSO (Sigma-Aldrich, MO). Alternativamente, se realizó la electroporación de células únicas mediante la aplicación de dos pulsos de voltaje (10 ms, 10 V) a pipetas de "patch" colocadas sobre las células que contactan el CC y llenas con la sal de K⁺ del Fluo-4 (200-500 µM) disuelto en solución de "patch" sin EGTA. La excitación se realizó con una fuente de fluorescencia (Leica EL 6000) equipada con un obturador controlado por un pulso TTL. Los filtros para la imagenología de Ca²⁺ que se utilizaron fueron: filtro de excitación 470 ± 40 nm; espejo dicroico 500 nm; filtro de emisión 525 ± 50 nm (Leica Microsystems, Weztlar; Germany). La adquisición de las imágenes se realizó con el programa ImageJ (NIH) utilizando una tarjeta de adquisición (LG7, Scion Instruments) conectada a una cámara CCD (TM-300, Pulnix). Las imágenes fueron tomadas a intervalos de 1 a 5 s y ajustadas para minimizar el ruido de fondo y evitar la saturación. Las mediciones de intensidad fueron realizadas con el programa ImageJ (NIH) para regiones de interés definidas (ROI) y expresadas como el cambio de fluorescencia relativo a la fluorescencia de ruido de fondo (Δ F/F0).

F. Identificación de las células registradas

Luego de los experimentos electrofisiológicos, muchas células fueron visualizadas en las rodajas vivas a través de la inyección de "Lucifer yellow", Alexa 488 o Alexa 488 dextrano. Las imágenes fueron adquiridas con un una tarjeta de adquisición FG7 (Scion Instruments, Frederick, MD) usando el programa ImageJ. Todas las rodajas fueron posteriormente fijadas por inmersión en paraformaldehído al 4 % en amortiguador de fosfato (AF) (0.1 M, pH 7.4) para luego revelar las células registradas con streptoavidina conjugada con un fluoróforo o con avidina conjugada con HRP. En los casos en los que se obtuvieron buenas imágenes celulares, se realizaron experimentos de doble marcado para diferentes moléculas como se describe más adelante. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal (FV 300; Olympus, Tokyo, Japan) y ulteriormente procesadas para su edición.

G. Inmunohistoquímica

Los animales se anestesiaron (50 mg/kg pentobarbital; I.P.) y se fijaron por perfusión intracardiaca de una solución al 4% o 10% de paraformaldehido en 0.1M AF (pH 7.4) luego de remover la sangre con solución salina isotónica (pH 7.4). Para el inmunomarcado con GABA, las tortugas se fijaron en 4% de paraformaldehido y 0.5% de glutaraldehido en 0.1 M PB (pH 7.4). Los tejidos fueron cortados en 60-80 µm con un micrótomo vibratorio (Series 1000, Sectioning System) y puestos en AF con 0.5% de suero bovino por 30 minutos e incubados con los anticuerpos primarios diluidos en AF con 0.3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich). La tabla adjunta más abajo incluye a los distintos anticuerpos empleados, sus fuentes y las concentraciones óptimas para el sistema nervioso de tortuga. Para revelar la presencia de BrdU, antes de la incubación con el anticuerpo primario (ver más arriba), los cortes o rodajas previamente registradas se incubaron en 2N HCl con 0,2 mg/ml de proteinasa K durante 10 minutos. En el caso particular de la Cx26, también antes de la incubación con el anticuerpo primario, los cortes fueron sumergidos en un amortiguador de citrato (10 mM) a 80° C durante 30 minutos para recuperar el epítope. Luego de un lavado en AF, los tejidos fueron incubados en anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos Alexa (Invitrogen). El marcado con el kit Zenon (Invitrogen) se utilizó cuando se combinaron anticuerpos generados en la misma especie. En experimentos de co-localización se utilizó el Alexa 488 y el 633 para evitar la

14

interacción entre fluoróforos ("bleeding"). Los experimentos control se realizaron omitiendo el anticuerpo primario o secundario del medio de incubación. En esos experimentos no se detectó marcado. El material histológico se visualizó con microscopia confocal (FV 300; Olympus, Tokyo, Japan). Las imágenes se adquirieron con el programa Fluoview 5 (Olympus) y se exportaron al Photoshop 7 o Corel Draw para el ajuste de las imágenes.

Antígeno	Anticuerpo	Dilución
"Brain lipid-binding protein" (BLBP)	policlonal de conejo, no. AB9558, Chemicon International, Temecula, CA, USA	1: 1000
Bromodeoxiuridina (BrdU)	Dako Cytomation, mouse monoclonal, cat. no. M0744, lot. no. 00004862	1:500
conexina 26 (Cx26)	policlonal de conejo Zymed, San Francisco, CA	1:25
conexina 43 (Cx43)	policional de conejo, donación del Dr. J. C. Sáez, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile	1:3000
GABA	policlonal de conejo,; # 20094, Immunostar, Hudson, WI, USA	1:100
GABA transportador-1 (GAT1)	policlonal de conejo, no. AB1570W, Chemicon	1:500
GABA transportador-3 (GAT3)	policlonal de conejo, no. AB1574, Chemicon	1:200
"Glial fibrillary acidic protein" (GFAP)	policlonal de conejo, Sigma-Aldrich	1:500
"glutamic acid decarboxylase" 65/67 (GAD-65/67) (C-20)	policlonal de cabra, no. sc-7513, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:200
"Human neuronal protein" (HuC/D)	monoclonal de ratón, no. A-21271, Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:50
K⁺-Cl⁻ co- transportador (KCC2)	policlonal de conejo, no. 07–432, Millipore, Temecula, CA, USA	1:1000
Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ co- transportador (NKCC1, T4)	monoclonal de ratón, Developmental Studies Hybridoma Bank	1:10
Pax6	monoclonal de ratón, Developmental Studies Hybridoma Bank	01:10
S100β	monoclonal de ratón, no. S2532, Sigma-Aldrich	1:500

Capítulo I. El epéndimo de la médula espinal como nicho neurogénico

IA. Antecedentes

El concepto de que las células precursoras residen usualmente en nichos específicos fue inicialmente sugerido por Schofield (1978) estudiando trasplantes de progenitores hematopoyéticos. Los nichos están definidos por su habilidad de alojar a las células progenitoras y controlar funcionalmente su desarrollo. Como se mencionó anteriormente, solamente en la ZSV y ZSG del cerebro adulto de los mamíferos se generan nuevas neuronas. Los componentes celulares y moleculares que caracterizan estos nichos neurogénicos han sido bien estudiados y comparten varias características con los encontrados durante el desarrollo (ver Gage y col., 2008). En estas regiones, existen diversos tipos de células precursoras que proliferan activamente y nuevas neuronas en diversos grados de diferenciación (ver Gage y col., 2008). Sin embargo, a pesar de las evidencias que ponen al epéndimo de mamíferos como potencial nicho neurogénico (Kehl y col., 1997; Shihabudding y col., 2000; Danilov y col., 2006; Shechter y col., 2007), se sabe muy poco sobre sus características y si son o no similares a las encontradas en el embrión o en los nichos neurogénicos del adulto. Como fue mencionado anteriormente, nuestro grupo de trabajo encontró que el epéndimo de la médula espinal de la tortuga es un nicho neurogénico al alojar células mitóticamente activas que dan lugar tanto a glías como a neuronas y células con características de neuronas inmaduras (Fernández y col., 2002; Russo y col., 2004). En esta parte de la tesis nos planteamos estudiar las propiedades de las células que rodean al CC de la médula espinal de la tortuga.

IA.1. Células precursoras alrededor del CC

Las células con capacidad proliferativa en el sistema nervioso parecen pertenecer al linaje que abarca a las células neuroepiteliales, glias radiales (GRs) y astrocitos (Álvarez-Buylla y col., 2001). En etapas embrionarias avanzadas los precursores neuroepiteliales primitivos dan lugar a las GRs. Estas, durante el desarrollo del sistema nervioso, parecen no sólo cumplir la función de guiar la migración de las neuronas inmaduras (Rakic, 1972) sino también la de oficiar de progenitores, tanto gliales como neuronales (Noctor y col., 2001, 2002; Alvarez-Buylla y col, 2001; Campbell y Götz, 2002; Tramontin y col. 2003). En una primera etapa del desarrollo, las GRs generan neuronas, para posteriormente dar lugar a células de estirpe glial cuando la migración neuronal ha finalizado (Noctor y col., 2001). Las GRs tienen un fenotipo molecular y funcional característico: expresan proteínas específicas tales como la nestina (Chanas-Sacre y col., 2000; Hartfuss y col., 2001; Misson y col., 1988), vimentina (Schnitzer y col., 1981; Noctor y col., 2002) y BLPB (Feng y col, 1994; Hartfuss y col., 2001; Noctor y col., 2002) y carecen de propiedades activas de membrana (Noctor y col., 2002). Otra característica de los progenitores es su acoplamiento a través de uniones tipo "gap" (Lo Turco y Kriegstein, 1991; Bittman y col., 1997; Noctor y col., 2001, 2002), hecho que parece crítico para el mantenimiento del fenotipo y la capacidad de proliferar (Bruzzone y Dermietzel, 2006).

En los mamíferos las GRs desaparecen luego del nacimiento y dan lugar a varios tipos celulares incluyendo aquellos que expresan la proteína GFAP, considerados responsables de la generación de nuevas neuronas en los nichos neurogénicos adultos (Doetsch y col., 1999; Doetsch y Scharff; 2001; Morshead y Van der Kooy, 2001; García y col., 2004). Sin embargo, las células con morfología de GR permanecen en etapas postnatales en el cerebro de las aves (Alvarez-Buylla y col, 2001) y en los vertebrados de sangre fría, tanto en el cerebro (Connors y Ranson, 1987) como alrededor del CC de la médula espinal (Sala, 1894; Fernández y col., 2002; Rakic, 2003). Además, es interesante el hecho de que la reparación endógena del SNC en peces y anfibios parece estar mediada por las GRs (Dervan y Roberts, 2003; Zupanc y Clint, 2003; Tanaka y Ferreti, 2009). Nuestras investigaciones previas en tortugas revelaron una empalizada de GRs distribuidas alrededor del CC que expresan la proteína S 100 (marcador de GRs y de células precursoras) (Russo y col., 2004). Sin embargo, poco se sabe sobre las propiedades de estos probables progenitores en la médula espinal madura. Por lo tanto, en la primera parte de este capítulo nos propusimos identificar y caracterizar las células progenitoras que rodean el CC de la médula espinal de las tortugas juveniles.

IA.2. Nuevas neuronas en los nichos neurogénicos

La detección de células destinadas a ser neuronas es un importante indicador de la existencia de nichos neurogénicos en el adulto (Gage y col., 2008). En el epéndimo de la médula espinal de la tortuga existen células con características morfológicas, moleculares y electrofisiológicas de neuronas inmaduras (Fernández y col., 2002; Russo y col., 2004).

Sin embargo, poco se sabe sobre el grado de diferenciación de estas células. Tanto en el bulbo olfatorio como en el hipocampo (Carleton y col., 2003; Espósito y col., 2005) se han estudiado sistemáticamente los pasos de maduración e integración funcional de las nuevas neuronas. En relación al proceso de diferenciación de la excitabilidad neuronal, los potenciales de acción son inicialmente mediados por Na⁺ como se ha descrito en neuronas espinales de roedores y pollos durante el desarrollo (Spitzer y col., 2000). Sin embargo, durante el desarrollo de Xenopus, en las primeras etapas de diferenciación las neuronas espinales generan potenciales de acción de Ca²⁺ que pasan a depender mavormente de Na⁺ en etapas tardías (Spitzer y Lamborghini, 1976; Blair, 1983; O'Dowd, 1983). En este sentido, nuestros estudios muestran que el desarrollo de la excitabilidad en las neuronas inmaduras en la médula espinal de tortugas (Fernández y col., 2002; Russo y col., 2004) podría ser parecido al primer mecanismo mencionado (Russo y col., 2004). Por otra parte, durante el desarrollo y en nichos neurogénicos adultos se ha visto que durante la maduración de la excitabilidad desde una descarga única a una descarga repetitiva, ocurren varios cambios en la expresión de diversos canales de K^+ (Blair y Dione, 1985; Desarmenien y col., 1993; Gao y Ziskind-Conhaim, 1998) y un aumento de la densidad de canales de Na⁺ en la membrana celular (Gao y Ziskind Conhaim, 1998; Carleton y col., 2003; Espósito y col., 2005). Nuestros estudios previos mostraron que las neuronas inmaduras alrededor del CC varían en cuanto a la forma y amplitud del potencial de acción y en la capacidad de descargar repetitivamente (Russo y col., 2004). Por lo tanto, nos preguntamos si estas diferencias podrían ser explicadas por mecanismos similares a los que ocurren durante el proceso de maduración neuronal observado en otros nichos neurogénicos. Para esto, estudiamos las corrientes de Na⁺ v K⁺ dependientes del voltaje de las neuronas inmaduras conectadas al CC.

IB. Resultados

IB.1. La zona que rodea al CC es un nicho de células proliferantes

El primer requisito para identificar a una célula como progenitora es que pueda entrar en el ciclo mitótico. Para revelar la población de células que se dividen alrededor del CC, utilizamos un protocolo de saturación de BrdU durante 24 hs (inyecciones de 50 g/g cada 4 hs, n= 4 tortugas, Fig. 1A). Asumiendo que las células mitóticamente activas en la médula espinal tienen un ciclo celular largo (Horner y col., 2000), un intervalo de



Figura 1. Proliferación celular alrededor del CC de la médula espinal. **A**, esquema del protocolo de BrdU utilizado. **B**, las células que incorporaron BrdU (verde) se concentraron en los cuadrantes laterales del epéndimo. Los núcleos fueron visualizados con Syto 64 (rojo). **C**, célula marcada con BrdU en telofase (sección confocal e iluminación DIC) cerca del CC. El inserto muestra el plano de clivaje (flechas). **D**, Densidad de núcleos marcados con BrdU en las regiones laterales (L) y mediales (M) del epéndimo (promedio \pm SEM). El dibujo muestra esquemáticamente los límites de las regiones (área sombreada) en las cuales se contaron los núcleos BrdU. Barras de calibración: **B**, 10 µm; **C**, 20 µm; inserto, 10 µm.

4 hs entre inyecciones sería suficiente para marcar la totalidad de la población de células que están ciclando durante esas 24 hs. Nuestros resultados mostraron que las células que incorporaron BrdU se encontraron rodeando el CC (Fig. 1B y C). Dado que en otros nichos neurogénicos los precursores se encuentran agrupados en dominios espaciales bien definidos (Doetsch y col., 1997), nos preguntamos si lo mismo podría pasar alrededor del CC. Para esto se dividió a la región que rodea el CC en zonas laterales y mediales (inserto en Fig.

1D). La densidad de núcleos marcados con BrdU encontrada fue significativamente mayor en los cuadrantes laterales (cuadrante lateral: 1.31 ± 0.18 núcleos/mm²; cuadrantes mediales: 0.10 ± 0.04 núcleos/mm²; n= 38 secciones; p < 0.01, Test de t pareado) (Fig. 1D). Algunos núcleos marcados mostraron un patrón "punteado", mientras que otros aparecieron marcados uniformemente (datos no ilustrados). Para excluir la posibilidad de que los gránulos de cromatina reflejaran daño celular inducido por el BrdU, se marcaron cortes de médula espinal de tortugas no inyectadas con un marcador nuclear (Syto 64) y se encontró una distribución similar en animales no tratados (datos no ilustrados). Además, como describieron Cameron y McKay (2001) en el giro dentado de ratones, la presencia de "grumos" en los núcleos no puede atribuirse a una acción tóxica del BrdU sino que simplemente refleja la aglutinación de una gran proporción de ADN en forma de heterocromatina replicada al final de la fase S (Lima-de-Faria y Jaworska, 1968). Finalmente, un requisito fundamental para determinar con certeza la existencia de nuevas células es la presencia de figuras mitóticas (Rakic, 2002 a-b). En este sentido, ocasionalmente se encontraron típicas mitosis cerca de la luz del CC (Fig. 1C, panel central e inserto), como ocurre en el embrión cuando los núcleos migran hacia la luz del tubo neural para dividirse (Sauer, 1935). Concluyendo, nuestros resultados muestran que existe proliferación celular alrededor de todo el CC y sugieren que la capacidad proliferativa en los diferentes cuadrantes no es homogénea.

IB.2. Un dominio de precursores acoplados por difusión de colorante en los cuadrantes laterales del CC

IB2.1. Fenotipos de los precursores en los cuadrantes laterales del CC

Tanto en los nichos neurogénicos embrionarios como adultos (Lledo y col., 2006), las células precursoras tienen características electrofisiológicas únicas. Dado que la densidad de núcleos marcados con BrdU fue mucho mayor en los cuadrantes laterales, comenzamos explorando en esta zona el fenotipo electrofisiológico de los precursores utilizando la técnica de "patch-clamp" en modo "whole-cell". Al igual que en el embrión y en nichos neurogénicos adultos (Lledo y col., 2006), las células que no descargaron potenciales de acción mostraron respuestas pasivas de sus membranas (Fig. 2A1) con una relación corriente/voltaje lineal (Fig. 2A2), bajas resistencias de entrada (R_{IN}) (de 7.6 a 700 M Ω ; promedio= 167 ± 16 M Ω ; n= 102; Fig. 2C, control) y potenciales de membrana (PM) generalmente hiperpolarizados (desde -50 a -104 mV, promedio= -87.4 ± 1.1 mV; n= 96; Fig. 2E, control). El 80 % de estas células formaron parte de grandes racimos o "clusters" de células acopladas por difusión del colorante, ubicados en los cuadrantes laterales del CC. Como se muestra en la figura 2A, la inyección de "Lucifer Yellow" reveló la célula registrada directamente, con un cuerpo celular pequeño y esférico del cual se desprende un proceso único y fino que termina en un pie en contacto con el CC (Fig. 2A3). En este ejemplo, la célula registrada se encontró acoplada por difusión del colorante con células vecinas formando un "cluster" compacto de células (Fig. 2A3) que engloba a elementos no acoplados (Fig. 2A3, asteriscos). Una interpretación razonable del acople por difusión del colorante y la baja R_{IN} de las células es que estas propiedades se deban a un acople a través de uniones tipo "gap". Para evaluar esta hipótesis, agregamos al baño de perfusión 100 µM de Cbx, un bloqueante inespecífico de las uniones tipo "gap". En



Figura 2. Propiedades de los precursores en los cuadrantes laterales del CC. **A**, respuesta representativa de una célula de tipo precursor a pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante (1) con una relación corriente/voltaje lineal (2). La célula apareció acoplada por colorante con las vecinas al inyectar "Lucifer yellow" desde la pipeta de registro (3; LY). Nótese las células no acopladas marcadas con asteriscos. **B**, la Cbx (100 μ M) aumentó la resistencia de entrada (R_{IN}) de las células en el cuadrante lateral. **C**, histograma que muestra la distribución de la R_{IN} en condiciones control y en presencia de Cbx en el baño. **D**, luego de 15 min de preincubación con MFA (100 μ M), todas las células registradas en los cuadrantes laterales del CC (n=10) se encontraron no acopladas por colorante. **E**, histograma que muestra el efecto sobre el potencial de membrana (PM) al desacoplar con Cbx (100 μ M). Barra de calibración: A3, D, 15 μ m.

todos los casos (n= 34) la R_{IN} aumentó significativamente (102.3 ± 12.1 MΩ en condiciones control y 780.8 ± 89.9 MΩ luego de 100 µM Cbx; n= 34; p < 0.01, Test de t independiente) (Fig. 2B, C), sin cambios significativos de la resistencia de acceso (Fig. 2B, inserto). Es improbable que el bloqueo de hemicanales en la membrana que no estén formando uniones de tipo "gap" hayan contribuido al efecto de la Cbx sobre la R_{IN} ya que la mayoría deberían de estar cerrados considerando las concentraciones extracelulares de Ca²⁺ usadas en este estudio (Sáez y col., 2005). Por lo tanto, el aumento en la R_{IN}

inducido por la Cbx puede ser atribuido al desacople de las células registradas de sus vecinas. En soporte a esta posibilidad, la incubación de las rodajas en MFA (100 µM; n= 10) o Cbx (100 µM; n= 3) antes de los registros de "patch-clamp" bloqueó el acople por difusión del colorante. En la figura 2D se muestra una célula registrada luego de 15 min de pre incubación con MFA que presenta un cuerpo celular chico y esférico, conectado al CC por un proceso fino que termina en un pie. Nótese que el Alexa 488, un fluoróforo permeable a las uniones de tipo "gap", no reveló acoplamiento por colorante en presencia de MFA. En línea con esto, la R_{IN} de las células registradas en presencia de MFA fue de 1.96 \pm 0.27 G Ω . El desacople con Cbx también despolarizó el PM de las células registradas de un valor promedio de -88.1 \pm 1.3 a -77.7 \pm 1.9 mV (n= 30; p < 0.01, Test de t independiente; Fig. 2E). Es probable que esta diferencia en el potencial de membrana sea debida a la introducción de una conductancia de pérdida por el sello que despolarice significativamente a las células desacopladas. Esto es debido a que en presencia de Cbx la R_{IN} se hace del orden de la resistencia del sello (usualmente menor de 10 GΩ) y esto puede introducir un error en la medida (ver más adelante). Sin embargo, al igual que las diferencias en R_{IN} encontradas, las variaciones en el potencial de membrana también podrían reflejar diferentes estados funcionales de las células estudiadas.

IB.2.2. Heterogeneidad electrofisiológica de los "clusters" de precursores

Las células agrupadas en los cuadrantes laterales del CC presentaron un comportamiento pasivo, al igual que los precursores acoplados durante el desarrollo de la corteza cerebral de los mamíferos (Hartfuss y col., 2001; Noctor y col., 2002). Sin embargo, durante el desarrollo y en nichos neurogénicos adultos, algunos precursores poseen corrientes salientes activadas por voltaje (Bahrey y Moody, 2003; Liu y col., 2006). Esto sugiere que los precursores son un grupo heterogéneo integrado por diferentes fenotipos electrofisiológicos. Debido a que pequeñas corrientes dependientes del voltaje pueden ser enmascaradas por las grandes corrientes de pérdida presentes en las células acopladas, utilizamos un protocolo de sustracción de las corrientes de pérdida. En la figura 3 se muestran los registros con las corrientes de pérdida sustraídas y las totales en respuesta a pulsos de voltaje despolarizantes e hiperpolarizantes a partir de un potencial de mantenimiento de - 70 mV. La sustracción de las corrientes de pérdida reveló que la mayoría de las células acopladas (46 of 50) generaron corrientes salientes (65.5 ± 8.6 pA; corriente al pico a 30 mV) en respuesta a pulsos de voltaje despolarizantes (Fig. 3A1, trazo superior). La Cbx (100 µM) redujo sustancialmente estas corrientes en los trazos no sustraídos (Fig. 3A2, trazo del medio) y el pico de las corrientes sustraídas en

22



Figura 3. Heterogeneidad electrofisiológica de los precursores en los cuadrantes laterales del CC. **A**, registros con las corrientes de pérdida sustraídas y las corrientes totales (trazo superior y medio, respectivamente) en respuesta a pulsos de voltaje (trazo inferior). Las corrientes con sustracción mostraron un curso temporal lento (trazo superior; 1). La Cbx (100 μ M) bloqueó un componente substancial de la corriente total (trazo del medio; 2) pero le hizo poco a la corriente con sustracción (trazo superior; 2). El TEA (10mM) bloqueó la corriente saliente (3). **B**, una célula con corriente saliente dependiente del voltaje (trazo superior) bloqueada por Cbx (trazo del medio). **C**, unos pocos "clusters" no presentaron corrientes salientes activadas por voltaje como se muestra en las corrientes con sustracción (trazo superior).

un 50% (34.7 ± 5.3 pA a 30 mV; p < 0.05, Test pareado de Wilcoxon; Fig. 3A2, trazado superior). En presencia de Cbx, el curso temporal de la corriente saliente fue más rápido que bajo condiciones control, presumiblemente debido a una mejor fijación espacial del voltaje cuando la célula está desacoplada de sus vecinas. El TEA (10 mM) redujo la pequeña corriente saliente registrada en presencia de Cbx (Fig. 3A3), sugiriendo la participación de un rectificador retardado de K⁺. En algunos (6 de 21), la Cbx bloqueó la corriente saliente (Fig. 3B) indicando un comportamiento pasivo de la célula registrada, mientras que en otros "clusters" (4 de 50) la sustracción del componente pasivo no reveló ninguna corriente activa (Fig. 3C). Concluyendo, esto último junto con el hecho de observar algunas células sin corrientes salientes y otras con corrientes salientes

bloqueables por TEA en presencia de Cbx (a pesar de que la Cbx puede bloquear algunos canales de K⁺ dependientes del voltaje), sugieren que tanto los "clusters" como las células que los componen son heterogéneos desde el punto de vista de sus propiedades eléctricas.

IB.2.3. Los "clusters" laterales contienen GRs

Aunque el "Lucifer Yellow" y el Alexa 488 permitieron la visualización de las células registradas y sus vecinas, el revelado histoquímico de la biocitina inyectada intracelularmente permitió un análisis más exhaustivo de la morfología de los "clusters". Como se muestra en la figura 4, el tamaño de los mismos varió de grandes grupos de células que cubrieron todo el cuadrante lateral del CC (Fig. 4A) a conglomerados pequeños (Fig. 4B). La extensión rostrocaudal de estos "clusters" varió entre 8.9 y 47 µm (21.4 ± 2.1 µm; n= 26). Dado que el número de células fue difícil de calcular (incluso con marcadores nucleares), debido a la íntima asociación entre las células, se calculó un índice de volumen (área en el plano transversal X profundidad en el eje rostrocaudal) como una medida del tamaño del "cluster". El índice de volumen se correlacionó inversamente con las R_{IN} de las células registradas (Fig. 4C), lo que sugiere que la baja R_{IN} de las células se debió principalmente a la cantidad de células acopladas. No hubo correlación entre la duración del registro y el tamaño del "cluster", lo que indica que incluso el menor de los tiempos de registro fue suficiente para teñir adecuadamente todas las células acopladas.

Para visualizar mejor la morfología de las células individuales dentro de los "clusters", combinamos la inyección de biocitina con Alexa 488 dextrano, que debido a su peso no atraviesa las uniones tipo "gap". Esta estrategia reveló que las células (n= 6) tenían la típica morfología bipolar de las GRs, con un proceso apical corto que termina en un pie en contacto con el CC (Fig. 4D1-D3) (véase también la Fig. 2D) y un largo proceso que alcanza la superficie subpial (Fig. 4D1, D4, puntas de flecha). Los procesos distales de muchas células forman paquetes que proyectan ipsilateralmente a tres lugares bien definidos: la cara ventrolateral del funículo lateral (100 %; n= 72), el rafe dorsal (44.5 %) y el ventral (23.6 %) (Fig. 4E). Los tres modelos de proyección se observaron en un solo grupo (Fig. 4A) (16.7 %), pero la mayoría de los grupos mostró la proyección ventrolateral, ya sea sola (48.6 %) (Fig. 4B, D, H) o junto con la proyección hacia el rafe dorsal (27.8 %)(Fig. 4F). Como se describe en la corteza en desarrollo (Noctor y col., 2002), los

24



Figura 4. Los "clusters" contienen GRs y son morfológicamente heterogéneos. A, grupo de células acopladas por colorante que cubre toda la región lateral del epéndimo. Obsérvese las tres proyecciones de las fibras derivadas del núcleo del "cluster". B, pequeño "cluster" que cubre una reducida zona del CC con pocos procesos que proyectan ventrolateralmente. C, relación entre las R_{IN} y el índice de volumen (área X extensión del "cluster" en el eje z). D, las células agrupadas presentaron la morfología típica de las GRs. La inyección del colorante impermeable a las uniones de tipo "gap", Alexa 488 dextran (peso molecular de 10.000), reveló una célula con morfología bipolar (1) con un proceso central en contacto con el CC y un proceso periférico que proyectó ventrolateralmente hacia la pía (cabeza de flecha). La inyección de biocitina (revelado con estreptavidina-Alexa 633) mostró que la célula pertenecía a un "cluster" (2, 3). El proceso distal de la célula registrada corrió junto con otros procesos de células acopladas (4, flechas). 1-3 secciones ópticas confocales, mientras que el 4 es un conjunto de secciones ópticas. E, dibujo esquemático que muestra la frecuencia (porcentaje del número total de "clusters") de las distintas proyecciones de los procesos distales. F, "cluster" con procesos que proyectan hacia el rafe dorsal. Los procesos terminaron en grandes pies en contacto con la pía (recuadro). Alguno de los procesos mostraron espinas y varicosidades (flecha). G, "cluster" con proyecciones ventrolaterales y ventrales que llegaron hasta el surco medial. El área ampliada muestra el contacto de los procesos con la pía a nivel del surco. H, cuerpos celulares (flechas) separados del grupo principal de las células del "cluster". La flecha del área ampliada (en un plano focal diferente) muestra un cuerpo celular mezclado con el conjunto de procesos. I, una célula con morfología de GR que apareció desacoplada en la zona lateral del epéndimo. Barras de calibración: A, 30 µm, B, D1-D3, 20 μm, D4, 50 μm, F, imagen principal, 25 μm; inserto, 5 μm, G, imagen principal, 60 μm; zona ampliada, 10 μm; H, imagen principal, 20 μm; área ampliada, 10 μm; I, 10 μm.

procesos distales de estas células presentaron varicosidades (Fig. 4F, la flecha en el recuadro) y terminaron en amplios pies en contacto con una región limitada de la superficie pial (Fig. 4F, G, insertos). En algunos casos, los cuerpos celulares se encontraron lejos del CC en el conjunto de las fibras que irradian desde el "cluster" (Fig. 4H, cabezas de flechas). Ocasionalmente encontramos células desacopladas en el centro del cuadrante lateral con la morfología típica de las GRs (n= 13) (Fig. 4E).

IB.2.4. Fenotipo molecular de los precursores en los cuadrantes laterales del CC: ¿un precursor neuronal?

Nuestros datos indican que algunas de las células en el cuadrante lateral del CC poseen características electrofisiológicas y morfológicas de GRs. Además, las GRs parecen ser un grupo heterogéneo al igual que lo descrito en otros nichos neurogénicos en donde muestran diversos fenotipos moleculares con diferentes capacidades para proliferar y diferenciarse hacia distintos linajes celulares (Campbell y Götz, 2002; Pinto y Götz, 2007). Por lo tanto, exploramos la expresión de diferentes moléculas que se expresan en este tipo celular (Pinto y Götz, 2007). Encontramos que la ubicación de los "clusters" es prácticamente idéntica a la de las células que expresan BLBP (Fig. 5A), un marcador típico de GR (Feng y col, 1994). Los procesos distales de estas células BLBP⁺ se agrupan formando haces que se introducen en la parte ventrolateral de la médula (Fig. 5A, puntas de flecha) y el rafe dorsal (Fig. 5A, flecha). En algunos tramos, los procesos BLBP proyectaron hacia el surco ventral (Fig. 5, flecha en el recuadro). Para comprobar que las células acopladas por difusión del colorante expresan BLBP, combinamos el registro de las células en los cuadrantes laterales con la tinción inmunohistoquímica para el BLBP. Como cabe esperar de acuerdo a los datos electrofisiológicos e inmunohistoquímicos, la figura 5B muestra que las células de un "cluster" lleno con biocitina (Fig. 5B1) expresaron BLBP (Fig. 5B2, B3).

Los resultados mostrados anteriormente sugieren que las GRs BLBP⁺ son precursores con el potencial de generar células que se diferencien al linaje neuronal. Debido a que Pax6 ha sido identificado como un importante regulador de la neurogénesis en las GRs (Pinto y Götz, 2007), exploramos la expresión de este factor de transcripción. Pax6 se expresó selectivamente en los cuadrantes laterales del CC, que coincide con el lugar de células BLBP⁺ (Fig. 6A). Para probar si realmente los "clusters" contenían células Pax6⁺, se combinaron registros de "patch" con inmunohistoquímica para el Pax6. La figura 6

26



Figura 5. Los "clusters" de células acopladas en los cuadrantes laterales expresan BLBP. **A**, la expresión de BLBP coincidió con la ubicación de los "clusters" de células acopladas por colorante. Nótese que al igual que en los "clusters" acoplados por colorante, se vieron fibras BLBP hacia el rafe dorsal (flecha) y proyectando ventrolateralmente (puntas de flecha). En algunos cortes, también se observaron haces de fibras BLBP dirigiéndose hacia el surco ventral (flecha en el recuadro). Los núcleos en el recuadro se marcaron con Syto 64. **B**, se muestra una sección óptica confocal de un "cluster" llenado con biocitina (1) y teñido con BLBP (2). Las imágenes muestran que la mayoría de las células del "cluster" expresaron BLBP (3). Barras de calibración: A, 40 μm; inserto, 10 μm, B, 5 μm.

muestra un "cluster" marcado con biocitina (Fig. 6B1, la imagen principal y recuadro) y la expresión de Pax6 en la misma sección óptica (Fig. 6B2). Como lo demuestra la imagen fusionada (Fig. 6B3), algunas células dentro del "cluster" expresaron Pax6. Para cuantificar la población de células BLBP⁺ que también expresan Pax6, se combinó la inmunohistoquímica para estos dos marcadores (Fig. 6C1-C3). Encontramos que la gran mayoría de células BLBP⁺ expresaron Pax6 (486 de 493 células BLBP⁺). Además, la mayoría de las células Pax6⁺ fueron también BLBP⁺ (486 de 548 células Pax6⁺). En conjunto, estos datos

indican que la mayoría de las células BLBP⁺ en el cuadrante lateral del CC representan un subtipo de GR neurogénica.

IB.2.5. Relación espacial entre precursores BLBP⁺ y neuronas inmaduras

En otros nichos neurogénicos, las células precursoras envuelven a los neuroblastos de una manera que sugiere una señalización activa entre estos dos tipos celulares



Figura 6. Las células BLBP+ expresan Pax6. A, la expresión de Pax6 coincidió con la ubicación de las células BLBP. B, la combinación de registros de "patch" con la tinción con biocitina (1) e inmunocitoquímica para Pax6 (2) muestra que los precursores acoplados expresan ese factor de transcripción (3). El recuadro en la parte B1 es un conjunto de secciones que muestran todo el conjunto de células unidas por colorante. Las imágenes principales son secciones ópticas confocales. C, expresión de BLBP (1) y Pax6 (2) en el epéndimo. Las imágenes muestran que la mayoría de las células BLBP co-expresan Pax6 (3). Barras de calibración: A, 30 μm, B, C, 20 μm.

(Doetsch y col., 1997; Campbell, 2003; Wurmser y col., 2004). Además, la expresión de BLBP en las GRs depende de manera crítica de la señalización de las neuronas vecinas en el desarrollo (Feng y Heintz, 1995). Cuando los "clusters" fueron cortados en planos parasagitales (Fig. 5C y Fig. 7), se hizo evidente que las células del "cluster" forman una red tridimensional de canales ocupados por células desacopladas (Fig 5C y Fig. 7, recuadro). Nosotros especulamos que las células desacopladas englobadas por los progenitores BLBP⁺ son neuronas inmaduras. Para testar esta idea, combinamos los registros de "patch" y la identificación morfológica de los "clusters" a través de técnicas inmunohistoquímicas aptas para el marcado de neuronas inmaduras HuC/D. La figura 7B muestra una sección óptica de un grupo de células que contienen biocitina en el que una célula no marcada es evidente (Fig. 7 B1, flecha). La misma sección iluminada con el láser de 633 nm reveló una corona de células HuC/D⁺ rodeando el CC (Fig. 7B2). Como se muestra en la imagen fusionada, la célula HuC/D⁺ señalada por la flecha no pertenecía al "cluster" (Fig. 7B3, flecha). Del mismo modo, las células BLBP⁺ rodearon las células HuC/D⁺ (Fig. 7C). Aunque el HuC/D es un marcador neuronal temprano, esta proteína se expresa también en un subconjunto de células progenitoras neuronales en la corteza



Figura 7. Los "clusters" de células $BLBP^+$ envuelven a las neuronas inmaduras. **A**, "cluster" de células acopladas por difusión del colorante. El recuadro muestra un corte parasagital a nivel de la línea blanca en la imagen principal. Las células acopladas se encontraron formando una estructura similar a una malla que rodea a las células no acopladas. **B**, otro "cluster" con el fenotipo electrofisiológico típico de las células precursoras (1). La flecha apunta al perfil de una célula que no pertenece a las acopladas. En la misma sección confocal, el marcador temprano neuronal HuC/D se expresó en células que rodean el CC (2). Las imágenes fusionadas muestran que la célula HuC/D señalada por la flecha (2) estaba rodeada por el grupo de células acopladas (3). Obsérvese también la falta de co-localización, indicando que los neuroblastos no se acoplan a los precursores (3). **C**, la inmunohistoquímica para el BLBP y HuC/D muestra la íntima relación espacial entre los precursores y neuroblastos. D, una célula llena de biocitina que generó potenciales de acción apareció rodeada por las células BLBP. Barras de calibración: A, 50 µm; inserto, 10 µm, B, C, 20 µm, D, 10 µm.

cerebral embrionaria (Miyata y col., 2004). Por lo tanto, para confirmar que las células HuC/D⁺ inmersas dentro de las células acopladas BLBP⁺ eran realmente neuronas inmaduras, registramos células en el cuadrante lateral con la morfología característica de los neuroblastos (Russo y col., 2004). En efecto, la figura 7D muestra una célula rodeada de células BLBP⁺ que generó potenciales de acción en respuesta a un pulso de corriente despolarizante.

IB.2.6. Bases moleculares del acoplamiento entre precursores

Los datos electrofisiológicos y nuestros estudios de microscopía electrónica (ver Trujillo-Cenóz y col., 2007) apuntan a la existencia de uniones tipo "gap" entre GRs vecinas. Estas uniones tipo "gap" son mediadas por conexones que pertenecen a una familia extensa de proteínas con características particulares (Nagy y col., 2004). A pesar de que varias conexinas (componentes de los conexones) se expresan en el desarrollo del cerebro, la Cx26 y Cx43 son los subtipos principales en la zona subventricular del cerebro anterior en desarrollo (Nadarajah y col, 1997; Bittman y Lo Turco, 1999). Por lo tanto, para explorar su posible participación en el acoplamiento entre los precursores de la médula espinal, utilizamos técnicas inmunocitoquímicas para detectar Cx26 y Cx43. Encontramos abundantes "puncta" de Cx26 formando un anillo alrededor del CC a una distancia de 5 µm de la luz, que se extendió simétricamente alrededor de 5 µm hacia la periferia (Fig. 8A). Por lo tanto, aunque no podemos descartar una contribución de la Cx26 en el acoplamiento celular, su distribución espacial homogénea alrededor del CC no puede explicar la localización selectiva de los "clusters" en los cuadrantes laterales. Por otro lado, también encontramos "puncta" de Cx43 ampliamente distribuida tanto en la sustancia gris como en la blanca de la médula espinal, probablemente correspondiente a su expresión por los astrocitos. Cabe destacar que una alta densidad de estos "puncta" se localizó cerca de la luz del CC en los cuadrantes laterales (Fig. 8B, flechas). Esta alta densidad de "puncta" no se observó en las caras dorsal y ventral del CC. También examinamos cortes longitudinales de la médula para explorar la distribución de la Cx43 a



Figura 8. Bases moleculares del acople. A, "puncta" de Cx26 forman un anillo alrededor del CC. B, los agregados de "puncta" de Cx43 se concentran en los cuadrantes laterales y en estrecha aposición con la luz del CC (flechas). C, una sección longitudinal a nivel del CC muestra una distribución discreta de "puncta" de Cx43 (entre paréntesis) a lo largo del eje rostrocaudal (doble flecha). D, "puncta" de Cx43 localizada en el segmento apical de las células de un "cluster". Las "puncta" de Cx43 (puntas de flecha) se presentaron en forma simétrica con respecto a las zonas CClaterales del (sección óptica confocal). El recuadro muestra un conjunto de secciones del mismo "cluster". Barras de calibración: A, C y D, 20 µm; B, 30 µm, inserto, 100 µm.

lo largo del eje rostrocaudal. Curiosamente, observamos marcado de agregaciones discretas de "puncta" de Cx43, cuya extensión en la dimensión rostrocaudal varió de 6 a $42 \mu m (14.7 \mu m \pm 3.3 \mu m; n=11)$ (Fig. 8C). Estos hallazgos sugieren que la distribución de Cx43 puede explicar el acople de los "clusters" de células, tanto en el plano transversal como en el eje rostrocaudal. Para probar la existencia de una correspondencia topológica entre la alta concentración de Cx43 cerca de la luz del CC y la distribución de células unidas por colorante, se combinaron registros de "patch" y marcado con biocitina de los progenitores, con la inmunohistoquímica para la Cx43. Nuestros resultados demuestran una estrecha correspondencia espacial consistente con la hipótesis de que el acoplamiento dentro de los "clusters" está mediado por Cx43 (Fig. 8D). En conjunto, nuestros hallazgos muestran que aunque tanto la Cx26 como la Cx43 se expresan en el epéndimo, la distribución espacial de estas conexinas sugiere que la Cx43 es el subtipo que permite el acople de las células que integran los "clusters" en los cuadrantes laterales del CC.

IB.2.7. Los "clusters" laterales BLBP⁺ contienen células que se dividen

Nuestros resultados mostraron que alrededor del CC, la tasa más alta de proliferación se da en los cuadrantes laterales en donde se ubican GRs formando dominios de células acopladas por difusión de colorante. Por lo tanto, nos planteamos la posibilidad que como acontece en el desarrollo de la corteza (Bittman y col, 1997), estos "clusters" contengan células activas mitóticamente. Para probar esta posibilidad, combinamos un protocolo de saturación de BrdU con inmunohistoquímica para BLBP y registros de "patch". Encontramos que los "clusters" contienen entre una (1 de 6 "clusters") y dos células (5 de 6) que incorporan BrdU (Fig. 9A, B). Como era de esperar por la correlación entre el "cluster" y la expresión de BLBP en la parte lateral del CC, las células mitóticamente activas que incorporaron BrdU expresaron BLBP (Fig. 9C).

IB.3. GRs en los cuadrantes mediales del CC

Los experimentos de marcado con BrdU mostraron que en los cuadrantes mediales también existe una población de células con capacidad de proliferar (ver Fig. 1). Nuestros análisis electrofisiológicos demostraron que existen células que no descargan potenciales


Figura 9. Los "clusters" BLBP* contienen células que se dividen. A, un "cluster" grande de células acopladas por difusión del colorante contiene un núcleo BrdU⁺ (flecha). El recuadro muestra en otro plano confocal del mismo "cluster" otro núcleo BrdU cerca de la luz del CC. B, un pequeño "cluster" de tres células (1) con dos núcleos que incorporaron BrdU (2). C, células BLBP⁺ (1) en el cuadrante lateral del epéndimo. Un núcleo BrdU se superpuso al campo de las células BLBP (2). La fusión de las imágenes muestra que el núcleo BrdU⁺ pertenece a una célula BLBP. Todas las imágenes son secciones ópticas confocales. Barras de calibración: A, B, 5 µm, C, 10 µm.

de acción y muestran el fenotipo típico de GRs: un pie sobre el CC y un proceso distal que se proyecta hacia el surco medial ventral (Fig. 10A) o al rafe dorsal (Fig. 10B, C). En varios casos (23 de 79) corroboramos que las proyecciones llegaban hasta la superficie medular (Fig. 10A e inserto inferior en C). La mayoría de las células existentes en la parte medial del epéndimo se mostraron desacopladas (Fig. 10A, B) (24 de 32 células), mientras que el resto formaban parte de "clusters" pauci-celulares compuestos de dos a cinco células (Fig. 10C). Nótese en la figura 10C que, a diferencia de lo observado en los "clusters" laterales, en estos casos los extremos apicales de las células en contacto con el CC no se tocan entre sí.

Como se muestra en los registros de la Figura 10, estas células presentaron distintos fenotipos electrofisiológicos. Algunas (11 de 21 ventrales y 6 de 58 dorsales) generaron una rectificación al igual que lo encontrado en células desacopladas o en "clusters" de la zona lateral (Fig. 10A, inserto). Asimismo también se encontraron células dominadas por propiedades pasivas (4 de 21 ventrales y 11 de 58 dorsales) (Fig. 10B, inserto). Estos dos fenotipos electrofisiológicos fueron encontrados en su gran mayoría %). desacoplados (80 Finalmente, un tercer grupo presentó características electrofisiológicas atípicas, una rectificación de salida en respuesta a pulsos de corriente (Fig. 10C inserto, Fig. 11A). Pulsos de corriente hiperpolarizantes repetidos a intervalos de 500 ms (Fig. 11B) y hasta de varios segundos (Fig. 11B inserto) generaron un aumento en la rectificación de salida o "wind up" de la respuesta frente al mismo estímulo acompañado de una hiperpolarización del PM (Fig. 11B). La aplicación repetida de pulsos de corriente despolarizantes generó el efecto contrario, una disminución de la rectificación entrante junto a un aumento en el PM (Fig. 11 B). Estas células fueron encontradas mayormente en el cuadrante dorsal del CC (41 de 58 células) desacopladas (58 %, Fig.



Figura 10. GRs en los cuadrantes mediales del CC. **A**, célula en el cuadrante ventral con el proceso apical tocando el CC y un proceso distal que llegó hasta la pía en el surco ventral (VS). **B**, otra GR pero en el cuadrante dorsal con su prolongación dirigiéndose al rafe dorsal. **C**, "cluster" pequeño de GRs acopladas por colorante en el cuadrante dorsal. Nótese que los extremos apicales de las células en contacto con el CC no se tocan entre sí. Los insertos en todos los paneles representan las respuestas de cada célula a inyecciones de corriente. En el inserto inferior en C se muestran los conos sub-piales de las tres células acopladas. Barras de calibración: A e inserto en C, 5 μm; B y C, 10 μm; insertos: 20 mV y 200 ms; A, 20 pA, B y C, 100 pA.

11D) o formando pequeños "clusters" pauci-celulares en las partes dorsolaterales (42 %, Fig. 10C). En todos los casos sus procesos se dirigían hacia el rafe dorsal. Los distintos grados de acople que presentaron estas células también fueron indirectamente observados con los cambios encontrados en la R_{IN} en los experimentos que se utilizó Cbx (desde cambios casi insignificantes hasta aumentos de unas 4 veces, datos no ilustrados, n= 5). La aplicación de Cbx en el baño aumentó la R_{IN}, generalmente sin producir diferencias aparentes en la relación corriente-voltaje (no se muestra). Sin embargo, en algunos casos la rectificación de salida desapareció en presencia de Cbx. Esto podría



Figura 11. GRs atípicas en los cuadrantes dorsales del CC. **A**, rectificación de salida y rectificación de entrada frente a la aplicación de pulsos de corriente hiperpolarizante o despolarizante, respectivamente. **B**, pulsos de corriente repetidos a intervalos de 500 ms generan un aumento o "wind up" de la respuesta frente al mismo estímulo tanto si es despolarizante como hiperpolarizante. Nótese que este fenómeno es acompañado de una hiperpolarización o despolarización acumulativa del potencial de membrana según la corriente inyectada. En el inserto se muestra a mayor escala un "wind up" de la respuesta a pulsos hiperpolarizantes de corriente (no se muestran) repetidos cada 3 segundos. **C**, respuesta de corriente a pulsos de voltaje. Tanto los registros de las corrientes obtenidas sustrayendo las corrientes de pérdida (trazo superior) así como las corrientes totales (trazo del medio) mostraron la presencia de una corriente de cola lenta cuando se vuelve al potencial de mantenimiento de -70 mV. **D**, fenotipo morfológico característico de estas células. Barra de calibración: 20 μm.

atribuirse a que esta corriente parece ser muy lábil, desapareciendo usualmente a los pocos minutos de acceder a la configuración "whole-cell". De igual forma, el hecho de que en varios casos el agregado de TEA (40 mM, n= 6) o 4-AP (2 mM, n= 2) al baño no modificó la rectificación de salida, sugieren que la misma no es mediada por canales de K⁺ dependientes del voltaje. Además, como se muestra en la figura 11A, B y C, los perfiles de respuesta de estas células son muy distintos a los que presentan las células que poseen solamente rectificaciones mediadas por canales de K⁺ dependientes del voltaje (ver Fig. 3). Por otra parte, aplicando el método de substracción de las corrientes de pérdida (Fig. 11C) observamos cuando se vuelve a potenciales de mantenimiento de -70 mV la existencia de una corriente entrante de cola, que no está presente en las células que poseen solo rectificaciones de corriente salientes mediadas por K⁺ (ver Fig. 3).

IB.4. Neuronas inmaduras alrededor del CC.

Otro grupo de células en contacto con el CC se caracterizó por la capacidad de descargar potenciales de acción (Fig. 12A y B) mediados por corrientes de Na⁺ y expresar el marcador neuronal temprano HuC/D (Russo y col., 2004). Al igual que lo descrito en nuestros estudios previos (Russo y col., 2004), este grupo puede dividirse en dos grandes subpoblaciones, las células que dispararon uno o unos pocos potenciales de acción al principio de la respuesta a un pulso de corriente sostenido (Fig. 12A, n= 45), y las que descargaron repetitivamente durante todo el pulso (Fig 12B, n= 59). La diferencia más conspicua entre ambos subgrupos fue la forma del potencial de acción, con una hiperpolarización post-espiga lenta observada en las células que descargaron repetitivamente pero no en las de descarga única (Fig. 12C). Para estudiar los mecanismos responsables de esas diferencias, utilizamos la técnica de fijación de voltaje que permite hacer un análisis cuantitativo de las corrientes iónicas que subyacen a las



Figura 12. Corriente de Na⁺ en las neuronas inmaduras que contactan el CC. **A**, respuestas de una célula que descargó solo un potencial de acción (DU) en respuesta a un pulso de corriente despolarizante. **B**, en otra célula, el mismo tipo de estímulo generó una descarga repetitiva (DR). **C**, superposición del potencial de acción mostrado en A y el primero que se observa en B. **D**, respuestas de corriente a pulsos de voltaje despolarizantes de una célula de DU. Los registros mostrados son con sustracción de las corrientes de pérdida. **E**, el mismo protocolo que en D, generó corrientes entrantes más grandes en una célula con DR. **F**, densidad de corriente máxima de Na⁺ en células de DU y DR.

propiedades de respuesta observadas en fijación de corriente. En la figura 12 se muestran las corrientes activas aplicando el método de substracción de las corrientes de pérdida en una célula de descarga única (Fig. 12D) y en otra de descarga repetitiva (Fig. 12E). En ambos casos los pulsos de voltaje despolarizantes produjeron una corriente entrante seguida por una corriente saliente. Sin embargo, la corriente entrante fue mucho menor en la célula de descarga única (Fig. 12D) que en la que descargó repetitivamente (Fig. 12E). Una posibilidad es que, al igual que ocurre en el embrión (Gao y Ziskind-Conhaim, 1998) y en los nichos neurogénicos adultos (Carleton y col., 2003; Espósito y col., 2005) un aumento de la densidad de canales de Na⁺ sea una estrategia común durante la maduración de la excitabilidad. Por lo tanto, estimamos la densidad de corriente de Na⁺ midiendo la relación entre la corriente máxima durante los pulsos de voltaje y la capacidad de membrana. Los datos indican que las células capaces de descargar repetitivamente presentan densidades mayores de corrientes entrantes de Na⁺ (Fig. 12F, n= 10).

Las diferencias encontradas en las densidades de corrientes de Na⁺ podrían explicar, en parte, las distintas propiedades de respuesta de las neuronas que contactan el CC. Sin embargo, la aparición de conductancias de K⁺ en las neuronas espinales es importante para la maduración de los potenciales de acción y la descarga repetitiva (Gao y Ziskind-Conhaim, 1998, Russo y Hounsgaard, 1999). Datos previos (ver Russo y col., 2004) mostraron que las neuronas que rodean el CC poseen canales dependientes del voltaje sensibles al TEA, lo que sugiere la presencia de corrientes de K⁺ de tipo rectificador retardado (I_{KD}). En el presente trabajo, pulsos de voltaje despolarizantes a partir de PMs de -90 mV provocaron corrientes salientes tipo I_{KD} que, en algunos casos, presentaron un componente que se inactivó al principio de la respuesta el cual puede reflejar la presencia de una corriente de K⁺ de tipo A (I_A) (Fig. 13A1). Para separar las corrientes, aplicamos el mismo protocolo de pulsos de voltaje pero desde potenciales de mantenimiento despolarizados (Fig. 13A2). Como se muestra en la parte 3 de la figura 13, se observó una corriente saliente con una rápida activación e inactivación.

Tanto para la I_{KD} y la corriente tipo I_A , las células de descarga única presentaron una mayor densidad que las de descarga repetitiva (Fig. 13 B y C, n= 6 en los dos casos). Finalmente, aplicando un protocolo de inactivación previa por pulsos despolarizantes, se pudo testar la hipótesis de que la corriente con inactivación es de la familia de las de tipo I_A por su característica dependencia con el voltaje (Fig. 13D, ver Connor y Stevens, 1971). Además, el agregado al baño de 4-AP (1mM) -un bloqueante de la familia de canales de K⁺ de tipo A- abolió esta respuesta (n= 3, no se muestra). Al igual que para las densidades de corriente, encontramos diferencias en el curso temporal de la inactivación de la



Figura 13. Corrientes de K^+ en las neuronas inmaduras que contactan el CC. **A**, corrientes salientes en respuesta a pulsos de voltaje despolarizantes desde un potencial de mantenimiento de -90 mV (1). Los mismos pulsos despolarizantes pero desde potenciales de -30 mV activan mayormente una I_{KD} (2). La diferencia entre las corrientes obtenidas con los protocolos en la parte 1 y 2 muestra la presencia de una corriente tipo I_A en esa célula (3). **B y C**, densidad de la corriente máxima I_{KD} (B) e I_A (C) en función del potencial de membrana para células de descarga única (DU) y repetitiva (DR). **D**, protocolo de voltaje para mostrar el curso temporal de la inactivación de la I_A . En el inserto se muestra la diferencia entre el curso temporal de las corrientes en una célula con DU y otra de DR (corrientes normalizadas).

corriente de tipo I_A entre las células de descarga única y repetitiva (inserto Fig. 13D). El proceso de inactivación se midió a +30 mV luego de un prepulso de -100 mV y la caída de corriente se ajustó a una función exponencial de primer orden. La constante de tiempo (Tau) fue de 22.63 ± 6.29 ms (n= 6) en las células de descarga única y de 7.1 ± 1.6 ms (n= 6) en las de descarga repetitiva. La cinética de inactivación más rápida en las corrientes tipo I_A de las células con descarga repetitiva, podría relacionarse al proceso de maduración de la forma del potencial de acción, la cual es determinante para la descarga repetitiva (Connor y Stevens, 1971). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que los cambios en las corrientes de K⁺ también podrían contribuir a la forma de descargar de las neuronas inmaduras que contactan el CC.

IB.5. ¿Formas celulares de "transición"?

En un nicho neurogénico es esperable la presencia de formas celulares de "transición" que reflejen el pasaje de un fenotipo celular al otro, de progenitor a neurona inmadura. En la figura 14A1 se muestra una célula que, al igual que las GRs en los cuadrantes laterales, tenía un largo segmento apical, el cuerpo celular distante al lumen del CC y un proceso que se dirigió hacia la superficie ventrolateral de la médula. Sin embargo, a pesar de su ubicación y morfología esta célula fue BLBP⁻ (Fig. 14A1). Además, presentó propiedades funcionales difíciles de atribuir a un tipo celular definido: una alta R_{IN} y un rectificador de salida retardado cuando se despolarizaba desde el reposo (Fig. 14A2). En la figura 14B se muestra un ejemplo distinto de forma celular de "transición". En



Figura 14. Formas celulares de "transición". *A*, célula llenada con biocitina (verde) rodeada por células *BLBP*⁺ (rojo) (1). Nótese que la célula registrada es *BLBP*⁻. El recuadro muestra en otro plano confocal la morfología de la célula llenada con biocitina. Esta célula generó una rectificación en respuesta a pulsos de corriente despolarizantes (2). *B*, otra célula del tipo "transicional" con un largo segmento apical y dos procesos tipo dendritas proyectando a la sustancia gris (1). La célula tenía un solo cilio que se vio claramente en la luz del CC (recuadro). Al igual que en A, los registros electrofisiológicos mostraron una rectificación de salida en respuesta a pulsos de corriente despolarizantes (2). La relación corriente-voltaje se muestra en 3. Barras de calibración: A y B, 10 μm; inserto en B, 2 μm.

este caso, el cuerpo celular se encontró cerca del CC y tenía dos procesos bien desarrollados, como se puede esperar de un "neuroblasto multipolar" más maduro (Fig. 14B1). Sin embargo, la célula fue incapaz de generan potenciales de acción, lo que sugiere un alto grado de inmadurez o una naturaleza no neuronal. En cambio, al igual que el primer ejemplo, esta célula mostró una alta R_{IN} y un rectificador de salida retardado (Fig. 14B2 y 3). Estas formas celulares de "transición" tuvieron PMs (-66.4 ± 3.05 mV, n= 25) que fueron menos negativos y R_{IN} (3.9 ± 0.77 GΩ; n= 29) muy superiores a los que normalmente se encuentran en células gliales típicas (alrededor de -86 mV y 300 MΩ respectivamente). Mediante el uso de la técnica de fijación de voltaje, en algunos casos (n= 4) observamos una pequeña corriente entrante en respuesta a pulsos de voltaje despolarizantes. En la figura 15A se observa el perfil de respuesta de una de estas células tanto en condiciones de fijación de corriente (Fig. 15A1) como en condiciones de fijación de voltaje. En esta última modalidad de registro puede observarse una pequeña corriente entrante en condiciones de substracción de las corrientes de pérdida (Fig. 15A2). En dos



Figura 15. Corriente entrante en una célula de tipo "transicional". **A**, rectificación de salida en respuesta a pulsos de corriente despolarizantes. **B**, respuestas de corriente a diferentes pulsos de voltaje. Nótese en el registro con sustracción de las corrientes de pérdida (trazo superior) la pequeña corriente entrante al principio de las respuestas a los pulsos de voltaje más grandes (flecha). **C**, respuestas con sustracción de las corrientes de los mismos pulsos de voltaje en condiciones control (1), en presencia de TEA (10 mM, 2) y posteriormente con el agregado de TTX al baño (2 μM, 3).

de estas células, el TEA no afectó a la corriente entrante pero si disminuyó la corriente saliente (Fig. 15B1). La disminución de la corriente entrante en presencia de TTX (2 μ M, Fig. 15B2, n= 2) sugiere que es mediada por canales de Na⁺. El hecho de que existe una pequeña corriente entrante en algunas de estas células podría ser el primer vestigio funcional hacia la diferenciación neuronal. Apoyando esta hipótesis, el marcado con HuC/D de 2 de las células con pequeñas corrientes entrantes dio niveles similares al ruido de fondo (datos no ilustrados).

IC. Discusión

Nuestros resultados muestran que la región que rodea al CC en las tortugas juveniles es un nicho neurogénico complejo, con células precursoras mitóticamente activas, fenotipos neuronales que parecen estar en diversos grados de diferenciación y células que podrían representar formas de transición entre las células progenitoras y las neuronas inmaduras. Esta región de la médula espinal comparte algunas de las características citológicas y funcionales básicas de los sitios que mantienen la capacidad neurogénica después del nacimiento (Doetsch y col., 1997; Alvarez-Buylla y col., 2002).

De acuerdo a los criterios actuales, las células precursoras en el SNC deberían reunir las siguientes características: a) poseer baja R_{IN} y estar acopladas eléctricamente (Lo Turco y Kriegstein 1991; Bitmman y col., 1997; Noctor y col., 2001), b) portar un cilio único en contacto con el líquido céfalo-raquídeo, en contraste con los ependimocitos multiciliados que se consideran células ya diferenciadas (Alvarez-Buylla y col., 2001), c) expresar -según la especie y el órgano- diferentes moléculas existentes en células de tipo glial (vimentina, nestina, GFAP, S 100, BLPB, etc.) (Alvarez-Buylla y col., 2001), y d) mantener un contacto íntimo con la lámina basal de los vasos o la pía (Alvarez-Buylla y col., 2001; Alvarez-Buylla y Lim, 2004). Los datos mostrados en esta parte de la tesis y los publicados por nuestro grupo (Trujillo-Cenóz y col., 2007) concuerdan con todos estos criterios reafirmando la tendencia actual de considerar a las GRs células precursoras.

El encare multi-técnico utilizado aquí nos permitió revelar que en la médula espinal de tortugas, hay un dominio de precursores en los cuadrantes laterales que están acoplados a través de Cx43. Estas GRs se dividen a tasas mucho mayores que las GRs encontradas en los cuadrantes mediales donde están generalmente desacopladas. La expresión robusta de BLBP restringida a los grupos de células acopladas en los

cuadrantes laterales indica que esas células representan un subtipo de GR (Pinto y Götz, 2007), con propiedades electrofisiológicas similares a los precursores que se encuentran en zonas neurogénicas del cerebro adulto (Noctor y col., 2002; Filippov y col., 2003; Wang y col., 2003; Liu y col., 2006). En estos "clusters", la expresión de Pax6 es compatible con la potencialidad neurogénica de los precursores (Pinto y Götz, 2007), una propiedad que puede estar relacionada con la capacidad de las tortugas para recuperarse después de una lesión en la médula espinal (Rehermann y col., 2009). Además, como se ha descrito en otros nichos neurogénicos (Doetsch y col., 1997; Campbell, 2003; Wurmser y col., 2004), nuestros resultados apoyan la idea de que existen neuronas inmaduras en distintos grados de maduración envueltas por células precursoras en los cuadrantes laterales de tal forma que sugiere una señalización activa entre estos dos tipos celulares (ver Capítulo 2).

IC.1. El acople a través de uniones "gap" de los precursores: ¿una asociación para proliferar?

El acople por uniones de tipo "gap" parece ser una característica general entre algunos precursores en el desarrollo (Lo Turco y Kriegstein, 1991; Bittman y col., 1997), la ZSV (Liu. y col., 2006) y la ZSG (Kunze y col., 2009) del cerebro adulto. Los registros de "patch" revelaron en los cuadrantes laterales del CC células acopladas por difusión de colorante con bajas R_{IN} y un fenotipo electrofisiológico dominado por corrientes de fuga, propiedades similares a la de los precursores de la corteza en desarrollo (Noctor y col., 2001, 2002) y los precursores tipo-1 en el hipocampo adulto (Filippov y col. 2003). La baja R_{IN} en los "clusters" celulares se debe principalmente al gran número de células acopladas, ya que existió una relación lineal entre la R_{IN} y el volumen de los "clusters". Además, la R_{IN} de células individuales desacopladas por Cbx llegó a ser de un orden de magnitud mayor que la de los "clusters". Estos resultados, junto con el hecho de que en los "clusters" hay GRs mitóticamente activas que se dividen a tasas mucho mayores que las GRs mayormente desacopladas en los cuadrantes mediales, sugieren una relación entre la proliferación de los precursores y el acoplamiento por uniones de tipo "gap". Comparando los datos que existen hasta el momento junto con los mostrados en esta tesis, se desprende la idea de que el acoplamiento a través de uniones "gap" integra un mecanismo general relacionado con la proliferación de los precursores tanto en el desarrollo como en el adulto, así como entre diferentes especies y regiones del SNC. Durante el desarrollo de la corteza, el acoplamiento por uniones de tipo "gap" es dinámico

(Bittman y col., 1997.). Se ha postulado que el acople y desacople de las células precursoras regula la entrada o salida al ciclo celular (Bittman y col., 1997; Bittman y LoTurco, 1999). A medida que los precursores avanzan a través del ciclo celular, se acoplan en "clusters" en la fase S, se mantienen acoplados durante G2, se desacoplan en la fase M y se reacoplan a lo largo de G1 (Bittman y col., 1997). En la neurogénesis temprana, el reacople se completa en la próxima fase S. Sin embargo, en la neurogénesis tardía el reacoplamiento no se completa hasta G2. Además, si las células de la ZV no reentran en la fase S (ej., si las células migran o se quedan los neuroblastos en la ZV), no se acoplan en "clusters" (Bittman y col., 1997). También demostraron que el acople es necesario para permitir que las células entren en la fase S y que podría jugar un rol central en la regulación de la neurogénesis (Bittman y col., 1997). En este sentido, estudios recientes en la ZSG, han demostrado que la interferencia con el acople da lugar a una disminución de la tasa de proliferación así como una reducción en el número de células proliferantes y el número de granos en el giro dentado adulto (Kunze y col., 2009). Por lo tanto, el acople también parece regular el proceso neurogénico en nichos en el adulto. Es razonable especular que la comunicación a través de uniones de tipo "gap" en los progenitores localizados en los cuadrantes laterales del CC tenga un rol similar a lo postulado en el desarrollo y en nichos neurogénicos adultos.

IC.2. La Cx43 delimita espacialmente dominios de precursores neurogénicos

Las conexinas juegan un papel importante en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación (Bruzzone y Dermietzel, 2006). Tanto la Cx43 como la Cx26 se expresan diferencialmente durante el desarrollo (Nadarajah y col., 1997; Bittman y Lo Turco, 1999). A pesar de que la Cx26 se expresa alrededor del CC, nuestros resultados indican que es la Cx43 la que tendría un rol determinante en el acoplamiento de los precursores en los cuadrantes laterales del CC. Esta conclusión está de acuerdo con el reconocido papel de la Cx43 en el mantenimiento de los precursores neurales en un estado proliferativo (Duval y col., 2002; Cheng y col., 2004).

La Cx43 se concentró en los polos apicales de las GRs en contacto con el CC, proporcionando así la base molecular que determina la ubicación de los "clusters" de precursores en los cuadrantes laterales. El hecho de que la Cx43 se concentre en los pies de las GRs cerca de la luz del CC es potencialmente importante. El polo apical de los progenitores concentra una batería de moléculas (Chenn y col., 1998), que se cree tienen

consecuencias funcionales críticas para la biología de estas células (Götz y Huttner, 2005). Este compartimiento celular, ha sido propuesto como un lugar donde se detectan señales que regulan la proliferación celular y la diferenciación (Alvarez-Buylla y col., 2001; Pinto y Götz, 2007). El acoplamiento por uniones "gap" de los precursores espinales a nivel de los polos apicales permitiría una comunicación eficaz de moléculas tales como morfógenos, que regulan la división o la diferenciación celular (Bruzzone y Dermietzel, 2006). Se ha propuesto que la herencia asimétrica de algunas moléculas de acuerdo con el plano de la división celular es un determinante importante del destino de las células hijas (Götz y Huttner, 2005). Nuestros resultados nos permiten especular que la Cx43 localizada en los segmentos apicales está en una ubicación ideal para ser una de estas moléculas clave, cuya herencia asimétrica podría decidir el destino de las células hijas. Si el plano de división no es paralelo al eje principal de la GR, una célula hija no heredaría la Cx43 y permanecería desacoplada. Esta última célula se diferenciaría en una glia o neurona postmitótica, porque el desacoplamiento se correlaciona con la diferenciación celular a partir de un progenitor indiferenciado (Duval y col., 2002; Bruzzone y Dermietzel, 2006).

Además de su reconocida función en el acople, ha sido demostrado recientemente que las conexinas están involucradas en la migración de las células a lo largo de los procesos de las GRs en la corteza en desarrollo (Elias y col., 2007). En línea con esto, las células acopladas por difusión del colorante que se encontraron en los procesos de las GRs (Fig. 4H, recuadro) podrían ser células que migran lejos del CC. La Cx43 y Cx26 también podrían afectar a la proliferación, migración y diferenciación de los precursores de la médula espinal por mecanismos no convencionales, a través de interacciones moleculares con una variedad de proteínas (Kardami y col., 2007). Curiosamente, el papel de las conexinas en la migración durante el desarrollo es también mediado por la facilitación de la adhesión célula-célula además de sus funciones como canales (Elias y col., 2007).

Los "clusters" de células acopladas por uniones de tipo "gap" expresaron BLBP, formando una red tridimensional que engloba a las neuronas inmaduras. Este resultado está de acuerdo con el hecho de que la expresión de BLBP por los precursores necesita de una íntima relación espacial con neuronas en diferenciación (Feng y Heintz, 1995). Se ha propuesto que las GRs que expresan BLBP se comportan como precursores bipotentes o pluripotentes (Hartfuss y col., 2001; Pinto y Götz, 2007), planteando la posibilidad de que las GRs en el cuadrante lateral del CC representen dominios neurogénicos. El hecho de que algunas células BLBP acopladas también expresen Pax6,

43

un factor de transcripción identificado como un regulador clave del subconjunto de GRs neurogénicas (Heins y col., 2002; Pinto y Götz, 2007), apoya nuestra hipótesis de un dominio neurogénico segregado espacialmente al cuadrante lateral del CC. En la médula espinal, el Pax6 es parte de un código basado en la expresión de factores de transcripción que definen dominios de precursores a partir de los cuales se generan los distintos subtipos de neuronas espinales (Lee y Pfaff, 2001). La expresión de Pax6 en las células que revisten el CC disminuye a medida que avanza el desarrollo (Fu y col., 2003) y no se detecta en la médula de mamíferos adultos (Yamamoto y col., 2001). Sin embargo, la lesión de la médula espinal induce la re-expresión de Pax6 en las células ependimarias y promueve la división celular (Yamamoto y col., 2001). El hecho de que la expresión de Pax6 persista en nichos neurogénicos del cerebro adulto de mamíferos (Kohwi y col., 2005; Nacher y col., 2005) sugiere un papel de este factor de transcripción en la neurogénesis post-natal, y apoya la idea de que la médula espinal de tortugas conserva la plasticidad de generar nuevas neuronas.

IC.3. Heterogeneidad electrofisiológica de las GRs conectadas al CC

Los registros mostraron distintos fenotipos electrofisiológicos de GRs alrededor del CC. Esto concuerda con el hecho de que las GRs representan una población heterogénea con diversos fenotipos moleculares con diferentes capacidades para proliferar y diferenciarse hacia distintos linajes celulares (Campbell y Götz, 2002; Pinto y Götz, 2007). Las GRs en la médula, además de variar en su grado de acople, presentaron R_{IN} muy variadas en presencia de Cbx o en las células normalmente desacopladas. El rango medio y alto de R_{IN} fue similar a los reportados en la zona subventricular post-natal para los precursores GFAP⁺ (aprox. 300 M Ω) (Liu y col., 2006) y progenitores neuronales (4 GΩ) (Wang y col., 2003), respectivamente. Como los precursores en la SVZ de la rata adulta (Wang y col., 2003; Liu y col., 2006) y la corteza del embrión de ratón (Bahrey y Moody, 2003), la mayoría de las células acopladas poseen un componente dependiente del voltaje sensible al TEA que sugiere la presencia de un rectificador retardado de K⁺. Sin embargo, algunas células acopladas tuvieron un comportamiento pasivo como las GRs de la zona ventricular (Noctor y col., 2002). Por otro lado, la mayoría de las células en el cuadrante dorsal presentaron respuestas electrofisiológicas atípicas, una rectificación de salida que presento un aumento o "wind up" de la respuesta frente al mismo estímulo repetido a intervalos de hasta varios segundos. Por lo tanto, las GRs parecen ser heterogéneas con distintos fenotipos electrofisiológicos. Esta heterogeneidad electrofisiológica puede reflejar distintos estados funcionales relacionados con las diferentes fases del ciclo celular, la dinámica de maduración de las células o la heterogeneidad intrínseca de los precursores. Por ejemplo, en células madre mesenquimales, tanto el PM como el rectificador retardado cambian durante el ciclo celular (Deng y col., 2007). Los canales de K⁺ regulan la proliferación celular, probablemente por la regulación del volumen celular y el PM (Pardo, 2004). De hecho, las corrientes mediadas por canales de K⁺ tipo rectificador retardado (Subunidad Kv1.3) son esenciales para la transición G1/S y por lo tanto para la proliferación de los precursores de oligodendrocitos (Chittajallu y col., 2002). Es tentador especular que la I_{KD} también pueda desempeñar un papel en el control de la proliferación de los precursores de la médula espinal, una posibilidad que necesita ser puesta a prueba experimentalmente.

Por otra parte, las GRs en los cuadrantes mediales del CC se encuentran generalmente desacopladas y parecen presentar tasas de división mucho más bajas que las presente en los cuadrantes laterales. Por lo tanto, existe la posibilidad de que hayan dos poblaciones de células precursoras con diferentes tasas de división al igual que lo descrito en otros nichos neurogénicos (Maslov y col, 2004). Si esto es así, se podría postular que las GRs en los cuadrantes mediales del CC son células madre neurales que se dividen lentamente para dar lugar a precursores acoplados en los cuadrantes laterales que amplificarían la producción de nuevas neuronas como en otros nichos neurogénicos (ver Alvarez-Buylla y col., 2002). Sin embargo, el hecho de que se encontrara una menor tasa de división en los cuadrantes mediales podría deberse solamente al número de células ciclando en cada zona y no a una diferencia en la tasa de división. Finalmente, otra heterogeneidad de las GRs es la relacionada con las proyecciones distales que proyectan hacia diferentes zonas de la médula espinal. Al igual que en el cerebro postnatal del ratón, las proyecciones distales de las GRs acopladas a lugares espacialmente restringidos puede reflejar algún tipo de información sobre la posición que define a precursores con potencialidades diferentes (Merkle y col., 2007). El marcado selectivo de los grupos de GRs que proyectan sobre las tres localizaciones descritas en el presente estudio permitirá evaluar la hipótesis de que la proyección distal hacia diferentes zonas de la médula determina distintos tipos de precursores.

IC.4. Neuronas en distintos grados de maduración

Nuestros datos sugieren que las células HuC/D⁺ que contactan el CC son neuronas inmaduras en diferentes estados de maduración de la excitabilidad. En las primeras etapas las células generarían potenciales de acción mediados por Na⁺ al igual que ocurre durante el desarrollo en las neuronas de roedores y pollos (Spitzer y col., 2000) y en el hipocampo (Espósito y col., 2005). A medida que las células se diferencian, aumentaría la densidad de canales de Na⁺ dependientes del voltaje, una estrategia común durante la maduración de la excitabilidad en el embrión (Gao y Ziskind-Conhaim, 1998) y en los nichos neurogénicos adultos (Carleton y col., 2003; Espósito y col., 2005). Por otra parte, tanto las células de descarga única como repetitiva presentaron I_{KD}, en línea con un desarrollo temprano del mismo durante la diferenciación (Spitzer y Ribera, 1998). Sin embargo, las células capaces de descargar repetitivamente presentaron una menor densidad de corrientes de K⁺ dependientes del voltaje y una cinética más rápida de inactivación de la corriente tipo IA. Esto último podría relacionarse al proceso de maduración de la forma del potencial de acción en el cual la aparición de cinéticas de inactivación rápidas de la IA es determinante para la descarga repetitiva (Connor y Stevens, 1971). Por otra parte, durante el desarrollo la maduración de los canales de K⁺ dependientes del Ca²⁺ es otro de los mecanismos subvacentes a la maduración del potencial de acción (Gao y Ziskind-Conhaim, 1998; Russo y Hounsgaard, 1999). Apoyando esto último, nuestros datos muestran que las células que no descargan repetitivamente no tienen grandes potenciales post-hiperpolarizantes lentos (esta tesis y Russo y col., 2004). Finalmente, ninguna de las neuronas inmaduras en contacto con el CC presentó las corrientes de Ca²⁺ que median comportamientos complejos en neuronas maduras de la médula espinal (Russo y Hounsgaard, 1999). Esto último junto con el hecho de que no se expresen marcadores típicos de neuronas maduras en el epéndimo (Fernández y col., 2002) sugieren fuertemente que solo existen neuronas inmaduras rodeando el CC.

Una cuestión fundamental en el campo de la neurogénesis adulta es estudiar las posibles funciones de las neuronas generadas. En el bulbo olfatorio la integración en los circuitos de las nuevas neuronas maduras refina la función de la red preexistente y en consecuencia el comportamiento olfativo (Lazarini y Lledo, 2011). Sin embargo, en el giro dentado cada vez se acumulan más evidencias de que los comportamientos que involucran al hipocampo activan a las neuronas inmaduras y que éstas también están involucradas en el procesamiento de la información (Marín-Burgin y Schinder, 2011). En

46

cuanto al hecho de estar conectadas con la red preexistente, nuestros resultados se asemejan más a lo que ocurre en el hipocampo. Por lo tanto, se podría especular que las neuronas inmaduras en contacto con el CC también puedan tener alguna función en la performance de los circuitos espinales. Se podría plantear que la neurogénesis alrededor del CC remplaza potenciales células sensoriales que detectarían señales generadas en el líquido cerebroespinal o perturbaciones mecánicas de la médula espinal. Este es el caso de lo que sucede en el epitelio olfativo, donde existen células proliferantes que recambian continuamente a las neuronas sensoriales (Graziadei y Graziadei, 1979). Finalmente, una interrogante hasta el momento es si las neuronas inmaduras generadas en la región del CC migran hacia la periferia. En este sentido, los estudios de Fernández y col. (2002) mostraron que podría haber una migración de las células post-mitóticas desde el CC hacia la periferia ya que encontraron una "onda expansiva" de núcleos BrdU⁺ a medida que aumenta el tiempo de sobrevida luego de la inyección de BrdU. Sin embargo, este experimento no es concluyente ya que no se exploró la identidad de las células con núcleos marcados con BrdU.

IC5. Formas celulares de "transición"

Como se podría esperar de un nicho neurogénico, encontramos células que presentaron características ambiguas en cuanto a su naturaleza glial o neuronal. Este grupo de células de "transición" presentaron propiedades funcionales difíciles de atribuir a un tipo celular definido: altas R_{IN} y la presencia de I_{KD} . El hecho de que algunas presentaron pequeñas corrientes entrantes a pesar de no generar descargas, sugiere que podrían ser neuroblastos o neuronas inmaduras en sus primeras etapas de diferenciación. Más aún, aunque la señal de HuC/D fue muy débil (datos no ilustrados), los experimentos de doble marcado sugieren que estas células expresan algo de HuC/D.

En los casos en los que no se observaron corrientes entrantes, una posibilidad es que sean células destinadas al linaje neuronal pero aún muy inmaduras o que fueran células que se diferenciaran hacia el linaje glial. Dado que las I_{KD} presentes en estas células son importantes para la mediación de cambios en el volumen celular durante la migración (Hendriks y col., 1999), este fenotipo funcional también podría corresponder a células que migran.

Concluyendo, en este capítulo hemos presentado evidencias que demuestran que la región que rodea al CC representa un nicho donde persisten GRs con propiedades heterogéneas, mezcladas con neuronas en distinto grado de maduración y fenotipos celulares que probablemente representen formas de transición entre los progenitores indiferenciados y células post-mitóticas. Los precursores con potencialidad neurogénica se hallan espacialmente confinados a dominios acoplados a través de Cx43. El epéndimo en la médula espinal de la tortuga, por lo tanto, comparte muchas de las características de los nichos neurogénicos del embrión y el adulto, representando un modelo único para estudiar la biología de la neurogénesis en circuitos espinales maduros.

Los datos de este capítulo forman parte de las dos primeras publicaciones adjuntadas al final de esta Tesis.

Capítulo II. Señalización vía neurotransmisores en el nicho neurogénico que rodea al CC

IIA. Antecedentes

La neurogénesis requiere de procesos tales como la proliferación, migración, diferenciación e integración de las nuevas neuronas a un circuito en desarrollo o maduro y va operativo. Se ha demostrado que el correcto ensamblado de los circuitos neurales depende estrechamente de la actividad (Spitzer, 2006; Ben-Ari y Spitzer, 2010) mediada por neurotransmisores actuando tanto sobre las células progenitoras como sobre los neuroblastos (Nguyen y col., 2001; Ma y col., 2009). En el cerebro en desarrollo, el GABA juega un rol central en este tipo de regulación al proveer de una influencia excitadora que controla todos los pasos en la generación de neuronas (Owens y Kriegstein, 2002; Ben-Ari, 2002; Ben-Ari y col., 2007). Sin embargo, otros neurotransmisores también son importantes en la modulación del proceso neurogénico como ocurre con el ATP (Weissman y col., 2004; Zimmermann, 2006; Dale, 2008). Aunque los estudios recientes sugieren que el GABA (Ge y col. 2006; Bordey, 2007) y el ATP (Jia y col., 2009; Langer y col., 2007; Battista y col., 2009) podrían tener roles similares en los nichos neurogénicos post-natales, no hay información concerniente a la señalización GABAérgica ni purinérgica en el epéndimo de la médula espinal. Por lo tanto, en esta parte de la tesis nos propusimos estudiar las respuestas al GABA y al ATP en las células que rodean al CC.

IIA.1. Señalización GABAérgica en nichos neurogénicos

Durante el desarrollo, el GABA liberado por las interneuronas migrantes (LoTurco y col., 1995) es el primer neurotransmisor en aparecer y sus acciones están presentes bien antes de que se formen sinapsis funcionales (ver Wang y Kriegstein, 2009). En la ZSG los progenitores y los neuroblastos reciben entradas sinápticas del circuito GABAérgico circundante (Tozuka y col., 2005) mientras que en la ZSV los procesos neurogénicos son regulados por la liberación de GABA desde los neuroblastos (Liu y col., 2005). Al igual que se ha descrito durante la embriogénesis (Doetsch y col., 1997; Campbell, 2003) y en la ZSV (Bolteus y Bordey, 2004; Platel y col., 2008), los progenitores BLBP/Pax6⁺ en el CC envuelven a las neuronas inmaduras, sugiriendo una íntima relación apta para una señalización entre ambos tipos celulares. Por otra parte, al igual que en la ZSG, alrededor

del CC existen terminales GABAérgicas (Trujillo-Cenóz y col., 2007) y las neuronas inmaduras en el epéndimo reciben contactos GABAérgicos funcionales (Russo y col., 2004). Por lo tanto, postulamos que la señalización GABAérgica en el epéndimo pueda compartir características con las de los nichos neurogénicos bien reconocidos.

En todos los circuitos estudiados hasta el momento, el GABA regula la neurogénesis a través de la activación de los receptores GABA_A (Wang y col., 2003; LoTurco y col. 1995; Liu y col, 2005; Hughes y col., 2009). En etapas tempranas del proceso neurogénico, la activación de los receptores GABA_A genera despolarizaciones que se convierten en inhibiciones cuando las neuronas maduran (Ben-Ari, 2002; Owens y Kriegstein, 2002; Cherubini y col., 2010). Esto es debido principalmente a la presencia de cotransportadores que acumulan el Cl en el interior celular y que generan la salida del mismo cuando los receptores GABA_A se abren (Rivera y col., 1999; Ganguly y col., 2001). La inactivación de esos cotransportadores así como la activación de otros transportadores que remueven el Cl⁻ intracellular producen el cambio de excitación a inhibición que ocurre cuando las neuronas maduran (Ben-Ari, 2002; Spitzer, 2010). Dado que nuestros estudios previos así como los datos presentados en el primer capítulo de esta tesis sugieren que las neuronas inmaduras están en distintos grados de maduración, nos propusimos estudiar cómo eran las respuestas GABAérgicas en estas células y si existían diferencias entre ellas. Finalmente, ya que las despolarizaciones producidas por el GABA en los otros nichos neurogénicos genera un aumento de Ca²⁺ intracelular que media la mayoría de sus acciones (Ge y col., 2006; Bordey, 2007), implementamos la técnica de imagenología de Ca²⁺ para explorar esta posibilidad en nuestro sistema.

IIA.2. Señalización purinérgica y neurogénesis

Un número creciente de estudios sugieren un rol importante de la señalización purinérgica en el desarrollo del sistema nervioso, tanto en etapas tempranas a través de la regulación de la proliferación, como en etapas tardías modulando la migración y diferenciación (Zimmermann 2006; Majumder y col., 2007; Dale, 2008). Por otra parte, en etapas post-natales la señalización a través de receptores purinérgicos participa en la formación y estabilización de los circuitos neurales (Zimmermann 2006). Su relevancia ha sido bien documentada en el desarrollo de la retina, la cóclea y el neocórtex (Dale, 2008). Tanto en la retina como en la corteza cerebral, la liberación de ATP controla la proliferación de los precursores neuronales. En cultivos organotípicos al final de la primera

etapa del desarrollo, el bloqueo farmacológico de los receptores para el ATP inhibe la propagación de las ondas de Ca²⁺ necesarias para entrar a la fase S del ciclo celular (Bittman, y col., 1997; Weissman y col., 2004). En la retina, la liberación de ATP a través de hemicanales de conexinas, produce ondas de Ca²⁺ que regulan la proliferación y la migración nuclear durante el ciclo celular (Pearson y col., 2005). Un estudio reciente del desarrollo en Xenopus demostró que la señalización purinérgica induce la trascripción del factor Pax6, iniciando así el desarrollo de los ojos (Masse y col., 2007). Recientemente Liu y col. (2008), utilizando herramientas farmacológicas o con un "knockdown" para un receptor del ATP, demostraron la importancia de la señalización purinérgica en la migración de los progenitores desde la zona ventricular a la subventricular y su papel en la apropiada formación de la zona subventricular. Finalmente, en el desarrollo de la cóclea, Tritsch y col. (2007) mostraron que la liberación de ATP actúa coordinando la actividad espontanea requerida para la sobrevida neuronal así como para refinar y mantener los mapas tonotópicos en el núcleo coclear.

En los nichos neurogénicos adultos la señalización purinérgica ha sido muy poco estudiada. En el epitelio olfativo, donde persisten precursores que generan nuevas neuronas durante toda la vida, la activación de receptores para el ATP induce la proliferación y la diferenciación neuronal (Jia y col., 2009). En neuroesferas derivadas de la SZV adulta, los agonistas para los receptores de ATP así como la adenosina aumentan el factor de crecimiento que media la proliferación de las células precursoras, apoyando a la idea de que la señalización purinérgica contribuye a la neurogénesis adulta. Finalmente, como ya fue mencionado, los posibles efectos del ATP sobre los procesos neurogénicos en el epéndimo de la médula espinal son desconocidos. Dado que en los cuadrantes laterales del CC de la tortuga existen precursores que proliferan activamente, acoplados por conexinas, y que además expresan el factor Pax6, especulamos que el ATP podría actuar sobre los progenitores espinales en forma similar a las descritas en la retina y el cortex en desarrollo. Por lo tanto, en la última parte de esta Tesis estudiamos las respuestas al ATP de los progenitores neuronales en los cuadrantes laterales del CC.

2B. Resultados

IIB.1. El GABA alrededor del CC

El GABA liberado por los neuroblastos (Wang y col., 2003; Hack y col., 2005) o por

las interneuronas vecinas GABAérgicas (Tozuka y col., 2005), regula la neurogénesis en el embrión y en el cerebro adulto (Bordey, 2007). Para explorar la posible fuente de GABA alrededor del CC, realizamos la identificación inmunohistoquímica del GABA y la de la enzima que lo sintetiza (la decarboxilasa del ácido glutámico, GAD). Encontramos numerosas terminales GAD⁺ en todo el epéndimo (Fig. 16A) y en la parte lateral del CC, muchas de estas estaban en estrecha aposición con cuerpos celulares (Fig. 16A, panel principal y recuadro superior) y con los procesos de los precursores BLBP⁺ (Fig. 16A, panel principal y recuadro inferior). La inmunoreactividad para GAD fue nula o muy débil en la mayoría de las células que contactan el CC. Sin embargo, unas pocas células localizadas en las zonas dorso-laterales fueron positivas para GAD (Fig. 16A, puntas de flecha, B1, flechas). Las células GAD⁺ son neuronas inmaduras, ya que co-expresaron el



Figura 16. Fuente de GABA alrededor del CC. **A**, inmunohistoquímica para GAD-65/6 (rojo) y para BLBP (verde). Un plexo de terminales GAD⁺ rodea al CC. Unas pocas células en contacto con el CC en la zona dorso-lateral del epéndimo aparecen teñidas positivamente para el GAD (puntas de flecha). Se encontraron muchas terminales GAD⁺ en estrecha aposición tanto con procesos proximales (flechas en recuadro superior) como distales (flecha en recuadro inferior) de las células BLBP⁺. **B**, terminales GAD⁺ alrededor del CC. Nótese una expresión menor del GAD en el citoplasma de algunas células ubicadas en la parte dorsal (flechas en 1). Estas células GAD⁺ expresan el marcador temprano neuronal HuC/D (flechas en 2). Sin embargo, la mayoría de las células HuC/D⁺ fueron GAD⁻(1-3). **C**, en contraste con la expresión de GAD, el CC está rodeado por un gran número de células que contienen GABA (1), que también expresaron HuC/D (2 y 3). Panel principal en A, B y C son secciones ópticas confocales. Los recuadros superiores e inferiores son la superposición de 10 secciones ópticas. Barras de calibración: A, 20 µm; insertos en A, 10 µm; B y C, 10 µm.

marcador neuronal temprano HuC/D (Fig. 16B1-3, flechas). En contraste con la débil expresión de GAD, muchas células en contacto con el CC fueron positivas para el anticuerpo anti-GABA (Fig. 16C1). La mayoría de las células GABA⁺ (159 de 177 células) también pertenecen al linaje neuronal, ya que expresaron HuC/D (Fig. 16C1-3).

IIB.2. Corrientes inducidas por GABA en las células precursoras

En la ZSV, la activación tónica de los receptores GABA tiene un papel importante en la regulación de la capacidad proliferativa de los precursores (Liu y col., 2005; Bordey, 2007). Nuestros estudios inmunohistoquímicos sugieren que el GABA también podría ser una señal para los precursores que contactan el CC. Para explorar esta posibilidad, realizamos registros de "patch" de los precursores en la zona lateral del CC a la vez que aplicamos GABA localmente. La Figura 17 muestra el fenotipo electrofisiológico típico de los precursores BLBP⁺ que contactan el CC (Fig. 17A1, ver también Fig. 2) y el acople por difusión del colorante Alexa 488 (Fig. 17A2). Como era de esperar, estos grupos de células se encontraron en estrecha proximidad con terminales GAD⁺ (Fig. 17A2, recuadro). En línea con estos resultados, la mayoría de los precursores acoplados (48 de 59) respondieron con pequeñas despolarizaciones a la aplicación de GABA (Fig. 17B1, C1). En una sub-población de precursores (26 de 57), el GABA generó corrientes entrantes (Fig. 17B2) que no revirtieron en el rango de potencial de membrana de -100 a 20 mV (Fig. 17B3). En los casos restantes (31 de 57), encontramos corrientes (Fig. 17C2), que revirtieron entre -75 y -27 mV (-49,1 ± 4,3 mV, n= 31; Fig. 17C3). En todos los casos, el GABA tuvo un efecto despolarizante ya que los PMs de reposo de las células fueron más negativos (-85,6 ± 2,5 mV, n= 31) que el potencial de reversión de las corrientes de GABA (E_{GABA}).

Debido a que los precursores en contacto con el CC están acoplados a través de uniones de tipo "gap" (ver capítulo I), las corrientes inducidas por GABA pueden ser aportadas por la célula registrada y/o sus vecinas. Para evaluar la contribución de la célula registrada a la corriente total generada por el GABA, utilizamos el bloqueante de uniones "gap" Cbx (100 μ M). La Cbx desacopló la célula registrada de sus vecinas (Fig. 17D-1), redujo la amplitud de las corrientes de GABA y generó un cambio en el E_{GABA} hacia potenciales mas hiperpolarizados (Fig. 17D2, 13,2 ± 2,6 mV, n= 5). En una minoría de los casos (2 de 8), la Cbx suprimió las corrientes inducidas por GABA sin potencial de



Figura 17. Respuestas al GABA en células precursoras. **A1**, corrientes obtenidas en modo "whole-cell" en respuesta a una serie de pulsos de voltaje. **A2**, luego del revelado de la biocitina, la célula registrada apareció acoplada por difusión del colorante con células vecinas. La inmunoihstoquímica para el GAD mostró botones (ver inserto) sobre el grupo de células acopladas. **B**, la aplicación local de GABA (100 μ M) despolarizó a este tipo de células (1) y, en algunos casos, generó corrientes entrantes que no revirtieron (2) en todo el rango de potenciales de mantenimiento estudiados (3). **C**, en otra célula de tipo precursor la despolarización (1) fue producida por una corriente que revirtió a -45 mV (2, 3). **D**, la Cbx (100 μ M) aumentó la R_{IN} (1) y disminuyó la corriente inducida por GABA, desplazando el E_{GABA} de -49 a -60 mV (2). En algunos casos, la corriente inducida por GABA desapareció en presencia de Cbx (3). Potencial de mantenimiento en D2 y 3, -100 mV. A2, sección óptica confocal. Barra de calibración: A, 20 μ m; inserto en A, 3 μ m.

reversión (Fig. 17D3), lo que indica que la corriente se originó tanto en la célula registrada como en las vecinas acopladas a la misma. En los restantes casos la amplitud de la corriente disminuyó (4 de 8) o se desenmascaró una pequeña corriente en respuesta al GABA que revertió a potenciales relativamente hiperpolarizados (2 de 8, datos no mostrados).

Los datos de la figura 17 sugieren diferentes mecanismos que generan las distintas corrientes inducidas por GABA. Para explorar los mecanismos, agregamos ácido nipecótico -un bloqueador no selectivo de los transportadores de GABA (GAT)- en el baño y los antagonistas selectivos de los receptores GABA_A gabazina o bicuculina. En 7 de 15 "clusters", las corrientes inducidas por GABA fueron mediadas por receptores GABA_A y GAT dado que la corriente se redujo en presencia de ácido nipecotico (1 mM) y gabazina (20 µM) y se suprimió cuando ambos fármacos se aplicaron juntos (Fig. 18A). En otros casos (4 de 15), las corrientes fueron mediadas solo por los transportadores GAT dado que se bloquearon con ácido nipecotico (1 mM), pero no con gabazina (20 µM) (Fig. 18B).

En el resto de los "clusters" (4 de 15) las corrientes inducidas por GABA fueron abolidas por gabazina (20 μ M) o bicuculina (40 μ M) (Fig. 18C).

Las células progenitoras en la SVZ del adulto expresan transportadores GAT3/4 (Bolteus y Bordey, 2004). Por lo tanto, para probar si las corrientes inducidas por GABA sensibles al ácido nipecotico eran mediadas por GAT3 como en otros nichos neurogénicos, utilizamos el SNAP 5114 que es un antagonista selectivo de estos transportadores. El SNAP 5114 (100 µM) bloqueó reversiblemente las corrientes inducidas por GABA que no revierten (Fig. 18D1, n= 4). En línea con estos resultados, la inmunohistoquímica apta para revelar GAT3 y el marcador de las células gliales y



Figura 18. Mecanismos de las corrientes inducidas por GABA en los progenitores. **A**, corriente inducida por GABA con componentes sensibles al ácido nipecótico (ac. nip., 1 mM) y a la gabazina (20 μ M). La aplicación de ambas drogas bloqueó la respuesta. **B**, en los casos en que la corriente inducida por GABA no revirtió, la respuesta fue abolida por el ac. nip. (1 mM) y no fue afectada por gabazina (20 μ M). **C**, en una tercera clase de progenitores, las corrientes inducidas por GABA fueron bloqueadas por gabazina (20 μ M) o bicuculina (40 μ M). **D**, el antagonista para los transportadores GAT3, el SNAP 5114 (100 μ M), bloqueó la corriente inducida por GABA que no revertía (1). El doble marcado para GAT3 y S100 mostró colocalización de estos marcadores en algunas células cerca del lumen del CC (flechas en 2). **E**, el NKCC1 (1) se expresa fuertemente en los procesos apicales de las células BLBP (2). El bloqueo de NKCC1 con bumetanida (20 μ M) cambió el E_{GABA} a potenciales más hiperpolarizados (2 y 3). Todos los registros se realizaron en el modo "whole-cell" a un potencial de mantenimiento de –100 mV. D2 y E1, superposición de 10 secciones ópticas. Barra de calibración: 5 μ m.

ependimarias S100 -que se expresa también en células BLBP (Trujillo-Cenoz y col., 2007)- mostraron que en los cuadrantes laterales del epéndimo las células inmunoreactivas para S100 también expresan GAT3 (Fig. 18D2, flechas).

El hecho de que el E_{GABA} fuera más despolarizado de lo esperado (-78 mV, a partir de la ecuación de Nernst) sugiere un mecanismo robusto para la acumulación de Cl⁻ en las células progenitoras BLBP⁺. Debido a que el efecto excitador del GABA durante el desarrollo se debe principalmente a la actividad del co-transportador de Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC1) (Owens y Kriegstein, 2002; Spitzer, 2010), realizamos experimentos inmunohistoquímicos para revelar la presencia de NKCC1. Como se muestra en la Figura 18E1, el NKCC1 se expresó alrededor de todo el CC y en particular en los pies de las prolongaciones que contactan la luz del CC de los progenitores BLBP⁺. De acuerdo con esto, la bumetanida –un antagonista selectivo para NKCC1- desplazó hacia potenciales más hiperpolarizados el E_{GABA} (20 µM; Fig. 18E2 y E3, promedio del cambio= -9,4 ± 1,8 mV, n= 7).

IIB.3. Corrientes inducidas por GABA en las neuronas inmaduras que contactan el CC

Debido a que la región que rodea al CC es un nicho neurogénico (ver también Fernández y col., 2002; Russo y col., 2004, 2008), especulamos que la señalización GABAérgica debería reflejar los diferentes grados de maduración de las neuronas inmaduras que contactan el CC. Para probar esta idea, analizamos las respuestas de las mismas a la aplicación local de GABA. Los registros de "patch" en modo "whole-cell" mostraron que el GABA (n= 11), o el agonista selectivo para los receptores GABA_A muscimol (n= 10, datos no ilustrados) generaron corrientes que revirtieron entre -81 y -49mV (-65.5 \pm 4,2, n= 18) en todas las neuronas inmaduras en contacto con el CC (Fig. 19A-C). Las corrientes inducidas por GABA fueron mediadas en su totalidad por la activación del receptor GABA_A, ya que fueron abolidas en presencia de gabazina (Fig. 19D, 20 μ M, n= 3) o bicuculina (40 μ M, n= 2, no se muestra). La aplicación local de 50 μ M de baclofen, un agonista de los receptores GABA_B, no produjo ningún efecto en las neuronas en contacto con el CC (n= 8, datos no ilustrados). En los neuroblastos del cerebro adulto de mamíferos, los receptores de GABA son tónicamente activados por GABA en el ambiente (Ge y col., 2006; Bordey, 2007). Del mismo modo, encontramos que

la aplicación de gabazina (20 μ M) bloqueó la corriente tónica en las neuronas que contactan el CC (n= 11; Fig. 19E).



Figura 19. Las neuronas inmaduras que contactan el CC poseen receptores GABAA funcionales. A, respuestas de voltaje a pulsos de célula corriente en una que descargó repetitivamente. B y C, la aplicación breve de GABA (40 ms, 100 µM) en esta célula generó corrientes (B) que revirtieron a -70 mV (C). D, el agregado de gabazina (20 µM) al baño abolió la respuesta al GABA. E, en otro neuroblasto la gabazina (20 µM) -en presencia de TTX (1 µM)bloqueó una corriente saliente tónica. Los registros fueron hechos en el modo "whole-cell". Potenciales de mantenimiento: D, -100 mV; E, -40 mV.

En las neuronas inmaduras el GABA actúa como un neurotransmisor excitador mientras que su acción pasa a ser inhibitoria en las neuronas cuando completan su diferenciación (Ben-Ari, 2002; Owens y Kriegstein, 2002; Cherubini y col., 2010). Si las neuronas inmaduras que contactan el CC se encuentran en diferentes etapas de maduración, es razonable especular que el GABA produzca efectos heterogéneos. Para probar el efecto fisiológico del GABA en las neuronas que contactan el CC, hicimos registros de "patch" en el modo perforado con gramicidina. Las corrientes inducidas por GABA en las neuronas que contactan el CC (Figs. 20A1 y 21A1) revirtieron entre -34 y -81 mV (-56.1 \pm 1.9mV, n= 41, ver Fig. 20A2 y 21A2) y como era de esperar, fueron abolidas por gabazina (n= 9, Fig. 20A3, inserto; Fig, 21A3). En 18 de 46 células, el GABA produjo una despolarización desde el reposo (Fig. 20A3) que en algunos casos fue de amplitud suficiente para generar potenciales de acción (Fig. 20 C1, 6 de 18). El resto de las células registradas con la técnica de "patch" perforado se hiperpolarizaron en respuesta al GABA (28 de 46, fig. 21A3). Para confirmar que los registros fueron hechos en la configuración perforada, de manera rutinaria se excitó el Alexa 488 contenido en la pipeta de registro sin visualizar difusión del colorante dentro de la célula (Fig. 20B1). Después de la ruptura del parche de membrana, las células registradas se llenaron



Figura 20. GABA como un neurotransmisor excitador. **A**, respuestas en modo "patch" perforado de una célula incapaz de descargar repetitivamente durante un pulso de corriente (1) y con un E_{GABA} relativamente despolarizado (-40 mV, 2). En la misma célula, la aplicación de GABA (100 μ M) produjo grandes despolarizaciones que no llegaron a producir descargas (3). El inserto muestra el bloqueo con gabazina (10 μ M) de la corriente obtenida en respuesta al GABA. **B**, imagen de la pipeta (1) luego de obtener los registros mostrados en A, y la imagen de la pipeta junto con la célula registrada luego de acceder a una configuración "whole-cell" convencional (2). **C**, respuestas de otras dos células, en modo "patch" perforado (1) y en modo "cell-attached" (1), en las cuales el GABA produjo despolarizaciones que llegaron al nivel de disparo. Estas despolarizaciones también fueron bloqueadas por gabazina (1).

rápidamente con Alexa 488 confirmando que la célula registrada contactaba la luz del CC (Fig. 20B2). Como un enfoque alternativo para evaluar la excitación inducida por GABA, se aplicó el GABA en la configuración de "cell-attached". En estas condiciones, la aplicación de GABA generó descargas de potenciales de acción en 4 de 12 células registradas (Fig. 20C2). El bloqueo completo de esta respuesta al GABA con gabazina sugiere que, a diferencia de los precursores, no hay transportadores de GABA en las neuronas inmaduras que contactan el CC. En apoyo a esta interpretación, el transportador para el GABA neuronal, GAT1, se expresó en el asta ventral y dorsal, pero no en la región que rodea al CC (datos no ilustrados).

La mayoría de las neuronas inmaduras en contacto con el CC que se hiperpolarizaron en respuesta a la aplicación local de GABA (18 de 25) descargaron repetitivamente (Fig. 21A1 y 3), lo que sugiere que pueden ser células en etapas más avanzadas de diferenciación (véase la discusión). En este sentido, algunas de estas células que se inhibieron con GABA expresaron GAD (Fig. 21B1-3, flecha), otro elemento a favor de que se encuentran en etapas más avanzadas de diferenciación.

Debido que la R_{IN} de las neuronas que contactan el CC (~ 1-4 G Ω) está cerca del valor de la resistencia del sello (~ 4-18 G Ω), es probable que el PM de reposo sea



Figura 21. GABA como neurotransmisor inhibitorio. **A**, descarga repetitiva en respuesta a un pulso de corriente y relación corriente-voltaje del pico de la corriente inducido por la aplicación de GABA (100 μ M). En la misma célula, la aplicación de GABA produjo una inhibición de la descarga (trazado superior, 3) que se bloqueó en presencia de gabazina (10 μ M, trazado inferior, 3). **B**, otra célula de descarga repetitiva que se inhibió con GABA (1, inserto) y reactiva para el GAD (2 y 3). Sección óptica confocal. Barra de calibración: 10 μ m; inserto, 10 mV y 400 ms.

subestimado en nuestro estudio debido a la fuga a tierra a través de la mencionada resistencia (Tyzio y col., 2003). Para superar este problema, medimos el potencial de inversión de las corrientes de K⁺ en el modo "cell-attached" (asumiendo que una concentración de 150 mM de K⁺ en la solución de "patch" proporciona una concentración simétrica de K⁺) para estimar el potencial de membrana en reposo (Fig. 22A; ver Wang y col., 2003). Encontramos que el potencial de reposo era más hiperpolarizado (19.5 ± 2.7mV, n= 6) que lo estimado con los registros de "patch" perforado, lo cual implica que en la mayoría de los casos el GABA despolarizaría a las neuronas que contactan el CC (Fig. 22B).

La acción despolarizante del GABA a través de receptores GABA_A se debe a una alta concentración de Cl⁻ intracelular producida por la actividad del co-transportador NKCC1, la cual es contrarrestada con la extrusión de Cl⁻ por KCC2 (Ben-Ari, 2002; Spitzer, 2010). Por lo tanto, el efecto del GABA sería determinado por el balance entre NKCC1 y KCC2 en las neuronas que contactan el CC. La figura 22C muestra que en muchas células (14 de 17) el antagonista selectivo para NKCC1 bumetanida (20 μ M) cambia el E_{GABA} a potenciales más hiperpolarizados (de -56.5 ± 2.4mV a -64.7 ± 2.2mV, p < 0.004, Test pareado de Wilcoxon, n= 14, Fig. 22C1-3). Para comprobar si el KCC2 está activo en las células con E_{GABA} relativamente hiperpolarizados (\geq -55mV), se aplicó



Figura 22. Mecanismos de las respuestas al GABA en las neuronas que contactan el CC. A, en modo "cellattach", la aplicación de una rampa de voltaje produjo una corriente activa que revirtió a 90 mV. Asumiendo que la concentración de K^+ utilizada en el interior de la pipeta es igual que la existente en el interior celular. el potencial de reversión de la corriente observada sería el inverso del potencial de reposo de la célula. B, histograma de frecuencia de los potenciales de reversión de las corrientes de GABA obtenidos en el modo "patch" perforado con la técnica de registro con gramicidina. Las flechas indican el potencial de membrana promedio obtenido con la técnica de "patch" perforado (PM PP) y el estimado en el modo "cell-attached" (PM CA). C, corrientes inducidas por GABA a -70 mV (1) en condiciones control (trazo superior) y en presencia de bumetanida (20 µM, segundo trazo desde arriba). Nótese que en presencia de bumetanida el GABA genera una corriente saliente, efecto que fue revertido con el lavado (tercer trazo desde arriba). En la misma célula, la adición de furosemida (100 µM, cuarto trazo desde arriba) aumentó la amplitud de la corriente entrante inducida por GABA. La relación corriente/voltaje de las corrientes en respuesta a una rampa de voltaje aplicada durante el pico de la respuesta al GABA muestra los cambios en el E_{GABA} inducidos por bumetanida y furosemida (2). El grafico en 3 muestra los cambios en E_{GABA} inducidos por bumetanida y furosemida para diferentes células. Las respuestas en C también fueron obtenidas en el modo "patch" perforado. **D**, la mayoría de células HuC/D⁺ (1) expresan NKCC1 (2 y 3). **E**, doble inmunohistoquímica para HuC/D (1) y KCC2 (2). El KCC2 se expresó fuertemente en neuronas fuera de la región que rodea al CC (ac flechas) mientras que en el epéndimo solo se expresó débilmente en algunas células HuC/D⁺ ubicadas en la parte dorsolateral (a-c, cabezas de flechas). D y E, secciones ópticas confocales. Barras de calibración: D y E, 20 µm.

furosemida, un antagonista no selectivo para co-transportadores catiónicos de cloro (Payne y col., 2003). En 5 de 8 células, el E_{GABA} cambió a potenciales más despolarizados (de -72 ± 3.3mV a -59.65 ± 2.8mV; *P* <0.03, Test pareado de Wilcoxon, n= 5) en presencia de furosemida (50–200 µM, Fig. 22C1–3), sugiriendo una relación de KCC2 sobre NKCC1 relativamente alta (Woodin y col., 2003). La inmunohistoquímica para estos transportadores mostró una alta expresión de NKCC1 en la mayoría de las neuronas inmaduras que contactan el CC (Fig. 22 D), mientras que la expresión de KCC2 fue

menos robusta y confinada en su mayoría a células situadas dorso-lateralmente (Fig. 22 E, puntas de flecha). Sin embargo, la expresión de KCC2 en las neuronas fuera del epéndimo fue notoria (Fig. 22E2 y 3; flechas).

Como correlato funcional de los datos inmunohistoquímicos referentes al KCC2, estimamos la actividad del mismo en neuronas en contacto con el CC con distintos E_{GABA} , utilizando una estrategia descrita por Ben-Ari y col. (2011) en el hipocampo. En registros de "patch" perforado con gramicidina aplicamos GABA a un potencial de membrana igual a E_{GABA} para luego cambiar a un potencial despolarizado (0 mV, 1min) en el cual el GABA genera grandes corrientes salientes debido a la entrada masiva de Cl⁻ a través de los receptores GABA_A (Fig. 23A y B, n= 13). Después de regresar al potencial de mantenimiento original, el GABA genera corrientes hacia el interior debido al cambio en E_{GABA} inducido por la carga de Cl⁻ (Fig. 23A y B). El curso temporal de la recuperación de E_{GABA} refleja la eliminación dinámica de Cl⁻ por el transportador KCC2 (Ben-Ari y col.,



Figura 23. Cinética de la eliminación del Cl⁻ en las neuronas que contactan el CC en el modo "patch" perforado. **A**, el GABA (50 ms, 100 μ M; flechas) se aplicó en presencia de DNQX (20 μ M) y AP-5 (50 μ M) primero a un potencial de mantenimiento igual al E_{GABA} (–35 mV, 1) y luego a 0 mV durante 1 min en donde el GABA indujo corrientes salientes. Al regresar al potencial de membrana de mantenimiento, la corriente inducida por GABA decayó poco a poco, con un tiempo medio (1/2) de decaimiento de 168 s (2). **B**, En una célula con un E_{GABA} más hiperpolarizado (–78 mV) las corrientes entrantes inducidas por GABA (1) se recuperaron con una cinética más rápida (tiempo ½ de decaimiento de 32 s, 2). El agregado de furosemida (200 μ M) al baño enlenteció el curso temporal de recuperación (2). **C**, el gráfico muestra la relación entre el E_{GABA} mas despolarizados se correlacionaron con tiempos ½ de decaimiento mayores.

2011; Nardou y col., 2011). Utilizando este protocolo, encontramos que en las células con E_{GABA} despolarizado la recuperación fue lenta, llegando a valores de hasta 10 min para la recuperación total de la E_{GABA} original (Fig. 23A1 y 2). Sin embargo, en las neuronas con un E_{GABA} más hiperpolarizado (Fig. 23B1, E_{GABA} = -78mV) la corriente entrante inducida por GABA desapareció con un curso temporal más rápido (Fig. 23B2). En estas células ($E_{GABA} \ge -68$ mV), el tiempo medio de la recuperación aumentó en presencia de furosemida (Fig. 23B2; 4 de 4 células, aumento promedio= 61.7 ± 24.7s) sugiriendo que el co-transportador KCC2 contribuye a depurar el Cl⁻ del interior celular. Estos resultados refuerzan la interpretación de que el E_{GABA} despolarizado observado en la mayoría de las neuronas inmaduras que contactan el CC se debe a bajos niveles de actividad de KCC2.

IIB.4. Respuestas de Ca²⁺ intracelulares inducidas por GABA

Muchos de los efectos regulatorios que ejerce el GABA en los precursores y neuroblastos en los distintos nichos neurogénicos son mediados por un aumento de Ca2+ intracelular (Owens y Kriegstein, 2002; Ge y col., 2006; Bordey, 2007). Para comprobar si la señalización GABAérgica alrededor del CC también produce cambios en la concentración de Ca²⁺ intracelular, realizamos imagenología de Ca²⁺ en las células que contactan el CC. Las células BLBP⁺ en las caras laterales del CC fueron cargadas con el indicador de Ca²⁺ Fluo4, ya sea mediante la aplicación por presión del Fluo4-AM o mediante electroporación de la sal de K⁺ de Fluo4. Como se muestra en la figura. 24A1, el GABA produjo un lento aumento en la concentración de Ca2+ intracelular (15.4 ± 3.7 % Δ F/F0, tiempo al pico 165.5 ± 24.2 s, n= 25) en algunas de las células cargadas con Fluo4 en las partes laterales del CC (25 de 40 células). Aunque no caracterizamos la evolución en el tiempo de la caída de las respuestas de Ca²⁺ para evitar el "blangueado" del marcador, los tiempos necesarios para la recuperación de la concentración de Ca²⁺ intracelular luego de la aplicación de GABA fueron de varios minutos (hasta 13 min, datos no ilustrados). La inmunohistoquímica para detectar BLBP confirmó que las células cargadas con Fluo4 pertenecían al dominio de GRs neurogénicas (Fig. 24A2). El aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular inducido por GABA es mediado por receptores GABA_A y requiere del Ca²⁺ extracelular ya que se redujo fuertemente añadiendo gabazina (n = 8) o reduciendo el Ca²⁺ (n = 5) en el baño a 0.2 mM (Fig. 8 B y C).

También estudiamos las respuestas de Ca²⁺ a la aplicación de GABA en las neuronas inmaduras que contactan el CC. Las neuronas inmaduras cargadas con Fluo4 fueron fácilmente identificables por sus formas similares a peras. En 19 de 32 células, el

GABA produjo un sustancial aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular (17.6 ± 8.8 % Δ F/F0, tiempo al pico 74.3 ± 13.8 s; Fig. 25A1 y B). En la médula espinal en desarrollo de Xenopus, el GABA genera un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular mediado por la activación de receptores metabotrópicos (Root y col., 2008). Sin embargo, el aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular en las neuronas inmaduras que contactan el CC fue bloqueado por gabazina, implicando así a los receptores GABA_A (Fig. 25A2 y B; n= 6). En forma similar a las células precursoras, el aumento de la concentración del Ca²⁺ intracelular en las neuronas se bloqueó en presencia de bajo Ca²⁺ (0.2 mM) extracelular (n= 6, datos no ilustrados). La naturaleza neuronal de la célula mostrada en la figura 25 fue confirmada por la expresión de HuC/D (Fig. 25C).



Figura 24. El GABA induce aumentos de Ca²⁺ en las células precursoras BLBP⁺. **A**, varias células en los cuadrantes laterales del CC cargadas con Fluo4 (1) respondieron con un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular a la aplicación local de GABA (10 s). La combinación con inmunohistoquímica para el BLBP mostró que muchas células cargadas con Fluo4 pertenecieron a un dominio de progenitores BLBP⁺ (2). **B**, la respuesta de Ca²⁺ inducida por GABA en los progenitores fue bloqueada por gabazina (20 μ M). **C**, gráfico que muestra el curso temporal del aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular inducido por GABA. Las respuestas no se produjeron con bajas concentraciones de Ca²⁺ en la solución de Ringer (0.2 mM). Barras de calibración: A y B, 10 μ m.



Figura 25. Aumentos de Ca²⁺ inducidos por GABA en las neuronas inmaduras que contactan el CC. **A**, una célula cargada con Fluo4 (aplicación por presión de la forma "ester" del Fluo4-AM) que respondió con a un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular a la aplicación de GABA (1). Este aumento fue bloqueado en presencia de gabazina (20 μ M) (2). **B**, curso temporal del aumento de la concentración del Ca²⁺ intracelular sontrol y luego del agregado de gabazina (20 μ M). **C**, la immunohistoquímica para el HuC/D confirmó que la célula mostrada en A era una neurona inmadura en contacto con el CC. Barras de calibración: A y C, 10 μ m.

IIB.5. Respuestas al ATP en las células precursoras

A diferencia del estudio de la señalización GABAérgica en el cual es importante no modificar la concentración de Cl⁻ en el interior celular, para estudiar las respuestas de Ca2+ a la aplicación local de ATP se utilizó la técnica de "patch" en modo "whole-cell" con el indicador de Ca²⁺ Fluo-4 adicionado a la solución intra-pipeta. Esto permitió estudiar los cambios en las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ y, en la misma célula, registrar las corrientes eléctricas en respuesta al ATP así como la confirmación electrofisiológica (Fig. 26A) e inmunohistoquímica (Fig. 26F y J) del fenotipo "célula precursora". Encontramos que la aplicación local de ATP produjo respuestas complejas compuestas por una corriente saliente seguida de una muy lenta corriente entrante (Fig. 26B). Aunque las respuestas eléctricas fueron similares entre las células registradas, la heterogeneidad de sus efectos pudo observarse en los diferentes tipos de aumentos de Ca²⁺ intracelulares. En la figura 26 se muestran dos ejemplos. En el primer caso el ATP (100 µM, Fig. 25C) generó un aumento de Ca²⁺ que comenzó cerca del CC (célula b) para luego propagarse a la célula registrada (célula a). En el otro caso (Fig. 26G), la aplicación local de ATP produjo un aumento de Ca²⁺ que comenzó en el pie de un proceso apical en contacto con el CC para propagarse a las prolongaciones ventrolaterales, terminando en el soma de la célula registrada. Estos aumentos de Ca²⁺ fueron transitorios como muestran los trazos Δ F/F (Fig. 26D y H). Nótese que las señales comienzan en la célula más cercana al CC (Fig. 26C) y en los procesos que contactan el CC (Fig. 26G) aunque la pipeta de "puff" estuviera más cerca de otras células o procesos (Fig. 26E e I). Las células mostradas en la parte C y G pertenecen a "clusters" de células acopladas por colorante en los cuadrantes laterales del CC (Fig. 26F y J).



Figura 26. Respuestas inducidas por ATP en precursores del CC. **A**, fenotipo electrofisiológico típico de una célula de tipo precursor. **B**, en la misma célula, una aplicación breve de ATP (5 s, 100 μ M) produjo una corriente saliente seguida por una corriente entrante. **C**, aumentos de Ca²⁺ en respuesta al ATP, que comenzó cerca del CC (célula b) para luego propagarse a la célula registrada (célula a). **D**, los transitorios de Ca²⁺ de las células a y b se muestran como trazos $\Delta F/F$. **E**, imágenes DIC mostrando la localización del electrodo de "patch" y la pipeta de "puff". **F**, el revelado de la biocitina mostró que las células en C pertenecen a un "cluster" de células acopladas por colorante. **G**, en otra célula precursora la aplicación local de ATP produjo un aumento de Ca²⁺ que comenzó en el pie que contacta el CC, se propagó a las prolongaciones ventrolaterales y terminó en el soma de la célula registrada. **H**, trazos $\Delta F/F$ de los transitorios observados en G. **I y J**, imagen DIC (I) y "cluster" al que pertenecía la célula que se muestra en G (J). Barras de calibración: C y G, 10 µm; E, F, I y J, 20µm.

IIB.6. Origen de las respuestas de Ca²⁺ intracelulares generadas por el ATP

En la corteza embrionaria, las ondas de Ca^{2+} comienzan cerca de la luz del ventrículo en células que entran en la fase S del ciclo celular (Weissman y col., 2004). Los datos mostrados en la Fig. 26 sugieren que las respuestas de Ca^{2+} son generadas por células o procesos cercanos al CC. Sin embargo, para poder explorar la dinámica de las respuestas de Ca^{2+} generadas por el ATP dentro de un "cluster" es necesario poder observar concomitantemente las variaciones de Ca^{2+} en varias células del cuadrante lateral. Dado que el fluo-4 no pasa bien las uniones "gap" y marca unas pocas células (ver fig. 26 C y G), utilizamos la aplicación extracelular de Fluo-4 AM por presión para poder estudiar varias células a la vez. En la figura 27 se puede ver un conjunto grande de células marcadas en los cuadrantes laterales que se asemeja a los "clusters" de precursores neurales descritos en el capítulo anterior. La aplicación local de ATP produjo una respuesta de Ca^{2+} que comenzó en células cercanas al CC (compárese las células a y b con c y d). Esto se ve claramente en los trazos en la parte B de la figura 27 (ver inserto a mayor escala) en el cual se muestran las diferencias de los cursos temporales de las respuestas de las células marcadas en A.



Figura 27. Origen de las respuestas de Ca²⁺ intracelulares en las regiones laterales del CC. **A**, la aplicación local de ATP produjo un aumento de Ca²⁺ que comenzó en células más cercanas al CC (comparar células a y b con c y d). **B**, trazos Δ F/F de las células marcadas en A. El inserto muestra a mayor escala las latencias de los picos máximos de Ca²⁺ en las 4 células estudiadas. Las células fueron cargadas con Fluo-4 AM. Barra de calibración: 10µm.

Los mecanismos que subyacen a los efectos producidos por el ATP sobre las células precursoras durante el desarrollo dependen de la activación de los receptores metabotrópicos P2Y1 (Berridge, 1995; Neary y col, 1996; Weissman, 2004). Por lo tanto, para confirmar que los aumentos de Ca²⁺ observados eran debidos a la activación de un receptor purinérgico, estudiamos los efectos de un antagonista no selectivo para los receptores P2 (suramina, 100 μ M). Los aumentos de Ca²⁺ en respuesta a la aplicación local de ATP fueron abolidas en presencia de suramina (no se muestra).

IIB.7. El bloqueo de las uniones de tipo "gap" y/o hemicanales de conexinas cambia las respuestas de los precursores al ATP

En el desarrollo, el ATP liberado a través de hemicanales de conexinas en la membrana de las células en fase S actúa en las células vecinas acopladas o no acopladas (Weissman y col., 2004; Dale, 2008). El hecho de que los aumentos de Ca²⁺ producidos por la aplicación exógena de ATP al medio extracelular parezcan presentar un sitio de generación hace pensar que no todas las células tienen la capacidad de responder al ATP aplicado en el medio extracelular. Por lo tanto, aplicamos Cbx al baño para estudiar la contribución de los hemicanales y/o uniones "gap" a los aumentos de Ca²⁺



Figura 28. Participación de hemicanales y/o uniones de tipo "gap junction" en las respuestas al ATP. **A y B**, aumentos de Ca²⁺ en respuesta al ATP en un grupo de células marcadas con Fluo-4 AM en condiciones control (A) y en presencia de Cbx (100 μ M) (B). Obsérvese el cambio en la concentración basal de Ca²⁺ en presencia de Cbx. **C**, transitorios de Ca²⁺ como trazos Δ F/F de las células a, b y c que se muestran en A y B. Barra de calibración: B, 10 μ m.
observados (n= 4). Como se muestra en la figura 28 las respuestas de Ca²⁺ al ATP en un grupo de células marcadas con Fluo-4 AM (Fig. 28A) se hacen mucho más pequeñas y lentas en presencia de Cbx (100µM, Fig. 28B y C). Dado que en algunos casos (3 de 5) se observó un aumento en la concentración de Ca²⁺ basal y que eso puede atribuirse a que las células estén en malas condiciones, usamos la técnica de registro de "patch" en modo "whole-cell" para observar electrofisiológicamente el posible daño celular en presencia de Cbx (las células al deteriorarse disminuyen su resistencia de entrada y potencial de membrana). En la figura 29 se observa como un aumento de Ca²⁺ transitorio que comienza en el pie que contacta el CC y se propaga hacia el cuerpo celular en condiciones control (Fig. 29A) se transforma en un aumento lento y sincrónico del Ca²⁺ intracelular en presencia de Cbx (Fig. 29B y D). En esta misma célula la corriente entrante en respuesta al ATP fue abolida en presencia de Cbx mientras que la corriente saliente inicial no se modificó (ver inserto a la izquierda). El aumento de la R_{IN} en presencia de Cbx (Fig. 29C, inserto a la derecha) así como el PM hiperpolarizado (datos no ilustrados) demuestran el buen estado de la célula.



Figura 29. El bloqueo de hemicanales de conexinas y/o uniones "gap" cambia las respuestas de los precursores al ATP. **A y B**, respuesta de una célula precursora al ATP (100 μ M) en condiciones control (A) y en presencia de Cbx (100 μ M) (B). **C**, en la misma célula, la lenta corriente entrante en respuesta al ATP fue bloqueada en presencia de Cbx mientras que la corriente saliente inicial no se modificó (ver inserto a la izquierda). El inserto a la derecha ilustra el aumento de la R_{IN} en presencia de Cbx. **D**, comparación del curso temporal de la respuesta al ATP en condiciones control y en presencia de Cbx. **E**, la célula registrada pertenece a un "cluster" de células acopladas por colorante. Todos los registros pertenecen a la misma célula. Barras de calibración: 10 μ m.

IIC. Discusión

La neurogénesis en circuitos ya operantes debe de ser homeostáticamente regulada para preservar las funciones a ser ejecutadas. Múltiples líneas de evidencia sugieren que la actividad neuronal y en particular los neurotransmisores, regulan varios pasos de la neurogénesis adulta a través de mecanismos sinápticos o extra sinápticos (Ge y col., 2007). En el cerebro, el GABA es un componente clave de este tipo de regulación (Ben-Ari, 2002) modulando todos los pasos implicados en la neurogénesis. En el trabajo realizado en el marco de esta tesis, encontramos que la señalización GABAérgica en los progenitores espinales BLBP⁺/Pax6⁺ y en las neuronas inmaduras en contacto con el CC es similar al de otros nichos neurogénicos (Bordey, 2007). Los efectos del GABA en las neuronas inmaduras alrededor del CC dependieron del balance entre NKCC1 y KCC2 sugiriendo diversas etapas de maduración neuronal. La activación de los receptores GABA_A llevó a un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular, lo cual podría proporcionar un vínculo entre la actividad y la transcripción de genes (Ben-Ari y Spitzer, 2010). Finalmente, una molécula de señalización que parece jugar un rol importante en la regulación de la proliferación es el ATP (Weissman y col., 2004; Zimmermann, 2006; Dale, 2008). El ATP produjo aumentos de Ca²⁺ intracelulares en los progenitores ubicados en los cuadrantes laterales del CC, que dependieron de la activación de receptores para el ATP y de las uniones de tipo "gap" y/o posibles hemicanales presentes en estas células. El hecho de que esta señalización purinérgica posea características similares a las descritas en el desarrollo (Weissman, 2004; Dale, 2008), sugiere que el ATP también podría modular la proliferación de los progenitores $BLBP^{+}/Pax6^{+}$ en el epéndimo.

IIC.1. El origen de GABA alrededor del CC

Existen dos fuentes potenciales de GABA alrededor del CC: (a) un plexo de terminales GAD⁺ y (b) una población de neuronas GABAérgicas. La gran cantidad de terminales GAD⁺ alrededor del CC hacen pensar en una señalización GABAérgica sináptica de tipo fásico (Bordey, 2007). De hecho, una señalización GABAérgica fásica en las neuronas inmaduras que contactan el CC es apoyada por nuestros estudios anteriores que muestran potenciales sinápticos GABAérgicos espontáneos (Russo y col., 2004). Sin embargo, a diferencia de los precursores del hipocampo (Tozuka y col., 2005), la

69

activación fásica del receptor GABA parece poco probable en los precursores espinales dado que nunca observamos eventos sinápticos espontáneos en las células BLBP⁺ ni tampoco estructuras de tipo sináptico con microscopía electrónica de transmisión (no se muestra). А diferencia de la abundante cantidad de terminales GAD⁺. la inmunorreactividad para el GAD en las células que contactan el CC fue débil y se limitó a unas pocas células. Sin embargo, como en la SVZ adulta (Wang y col., 2003) las neuronas inmaduras que contactan el CC contienen GABA. Queda por determinar si las células GABAérgicas que contactan el CC pueden liberar GABA localmente como sus contrapartes en la ZSV (Liu y col., 2005). La activación tónica de los receptores GABA descrita en nuestro estudio apoya esta posibilidad. Por otra parte, el GABA liberado sinápticamente podría difundir fuera de la hendidura sináptica ("spillover") y contribuir a la corriente tónica GABA_A.

La discordancia entre la naturaleza GABAérgica y la inmunoreactividad para el GAD en las neuronas que contactan el CC sugiere que el GABA puede ser sintetizado por una vía diferente de la convencional (la conversión del glutamato por la enzima GAD) (Martin y Rimvall, 1993). Algunos estudios han reportado que los neuroblastos GABAérgicos de la ZSV expresan GAD (Wang y col., 2003), mientras que otros describen niveles bajos de GAD en los neuroblastos de la ZSV hasta que estas células llegan al bulbo olfatorio (De Marchis y col., 2004). Se propuso entonces que el GABA puede ser sintetizado a partir de la putrescina (Sequerra y col., 2007). En la retina en desarrollo, la síntesis de GABA es primeramente hecha por la ornitina decarboxilasa y luego por GAD, como sugiere la baja expresión de GAD que luego aumenta a medida que el desarrollo de la misma avanza (Yamasaki y col., 1999). Un escenario similar podría darse en los neuroblastos que contactan el CC. El hecho de que el GAD sea expresado por un subconjunto de células en contacto con el CC puede indicar que se encuentran en etapas más avanzadas de diferenciación, como lo hacen pensar algunas características funcionales de mayor madurez tales como la inhibición por GABA y la descarga repetitiva de potenciales de acción (Spitzer y col., 2000).

IIC.2. Señalización GABAérgica en los precursores espinales

En la mayoría de los "clusters", las corrientes inducidas por GABA tuvieron componentes mediados por receptores GABA_A y GAT, mientras que unos pocos fueron dominados por el componente GABA_A o GAT. Los registros obtenidos en presencia de

70

Cbx sugieren que dentro de un "cluster" de precursores existen células que responden de maneras diferentes al GABA. La heterogeneidad de las respuestas al GABA se asemeja a la expresión variable de las corrientes rectificadoras retardadas de K⁺ entre los precursores BLBP/Pax6⁺ (ver capítulo anterior y Russo y col., 2008), y podrían reflejar distintos roles funcionales o etapas de diferenciación del mismo tipo de progenitor.

En la ZSV, la captación de GABA por parte de los precursores a través de GAT3/4 juega un papel importante en la depuración del GABA liberado por los neuroblastos, regulando así su migración (Bolteus y Bordey, 2004) y la proliferación de los respectivos precursores (Liu y col., 2005). Los precursores que contactan el CC expresan GAT3 funcional, mientras que el GAT1 neuronal está ausente alrededor del CC, lo que indica que la remoción de GABA en el epéndimo se basa exclusivamente en la captación a través GAT3 por los progenitores. La red tridimensional de progenitores BLBP/Pax6+ que envuelven a las células HuC/D⁺ (ver Fig. 7 en capítulo 1) es un arreglo geométrico similar al de la ZSV que parece adecuado para el control espacial de los niveles extracelulares de GABA (Bolteus y Bordey, 2004; Platel y col., 2008).

Al igual que en el cerebro de los mamíferos (Owens y Kriegstein, 2002), muchos progenitores BLBP⁺ poseen receptores GABA_A funcionales. La inconsistencia entre el E_{GABA} registrado en muchos "clusters" de progenitores y el potencial de equilibrio teórico para el Cl⁻ impuesto por la solución de la pipeta, puede ser explicado por la falta de fijación espacial del potencial de membrana de las células eléctricamente acopladas y ubicadas remotamente en relación a la célula registrada. El cambio de E_{GABA} hacia potenciales más hiperpolarizados producido por el agregado de Cbx al baño apoya esta interpretación. Sin embargo, el E_{GABA} en las células desacopladas con Cbx fue aún más despolarizado que lo previsto por la concentración de Cl⁻ intracelular, lo que sugiere un eficiente mecanismo de acumulación de Cl⁻ en estas células. Esta posibilidad es apoyada por la expresión de NKCC1 en los procesos apicales de las células BLBP⁺.

La despolarización inducida por GABA en los progenitores que contactan el CC se asemeja a las acciones del GABA sobre los progenitores durante el desarrollo del cerebro (Lo Turco y col., 1995) y en los nichos neurogénicos adultos (Bolteus y Bordey, 2004; Liu y col., 2005). En la ZSV, el GABA liberado por los neuroblastos disminuye la proliferación de los precursores (Lo Turco y col., 1995; Haydar y col., 2000, Liu y col., 2005). Es tentador especular que el GABA liberado por las neuronas que contactan el CC regule la proliferación de los precursores BLBP⁺. Además, la íntima relación entre las terminales GABAérgicas y las células BLBP⁺ plantea la posibilidad de que el "spillover" del GABA liberado sinápticamente pueda influir en los precursores a través de los receptores GABA_A.

Las terminales GAD⁺ que se encuentran alrededor del CC es probable que se originen de interneuronas GABAérgicas vecinas, dado que las neuronas que contactan el CC carecen de colaterales axónicas locales (Russo y col., 2004; Trujillo-Cenóz y col., 2007). De esta forma, el GABA liberado de interneuronas vecinas podría ayudar a regular el comportamiento de los precursores de acuerdo con la actividad de los circuitos de la médula espinal. Es necesario la aplicación de un encare experimental *in vivo* para poner a prueba estas posibilidades.

IIC.3. GABA: ¿una señal para la maduración?

Las neuronas inmaduras que contactan el CC poseen receptores GABAA funcionales como lo indica el bloqueo completo de las corrientes inducidas por GABA con gabazina. En registros de "patch" perforado con gramicidina, la activación del receptor GABA_A generó respuestas que van desde despolarizaciones que producen descargas de potenciales de acción a hiperpolarizaciones desde el potencial de reposo. Teniendo en cuenta el potencial de membrana de reposo estimado a partir de los registros en "cellattached", el GABA despolarizaría desde el reposo a la mayoría de las neuronas inmaduras que contactan el CC al igual que lo descrito en los progenitores neurales migrantes en la ZSV y la corriente migratoria rostral (Wang y col., 2003). Los EGABA despolarizados implican una mayor concentración de Cl⁻ intracelular que en las neuronas maduras y está de acuerdo con la expresión de NKCC1 en las células HuC/D⁺. Aunque el KCC2 es expresado en neuronas espinales fuera del epéndimo, sólo se expresó débilmente en algunas células HuC/D⁺ alrededor del CC. Por lo tanto, nuestros hallazgos electrofisiológicos e inmunohistoquímicos sugieren un predominio de NKCC1 sobre KCC2 dando lugar a un E_{GABA} despolarizado en la mayoría de las neuronas inmaduras que contactan el CC. Esta interpretación es apoyada por el cambio de E_{GABA} a potenciales más hiperpolarizados en presencia del antagonista para NKCC1 bumetanida mientras que la furosemida, un bloqueador de NKCC1 y KCC2 (Payne y col., 2003), produjo un efecto contrario sobre las células con E_{GABA} relativamente hiperpolarizado. El experimento que utiliza una carga de Cl⁻ para evaluar la actividad de KCC2 (ver Fig. 22F) implica que los E_{GABA} más hiperpolarizados de algunas neuronas resultan de la aparición de cierto grado de actividad de KCC2 que reduce el Cl⁻ intracelular.

Tanto en la ZSV como en el giro dentado, el GABA representa una influencia excitadora para las nuevas neuronas debido a los altos niveles de actividad de NKCC1

(Bordey, 2007). A medida que las neuronas maduran, la acción del GABA cambia de excitación a inhibición debido a una reducción en la actividad de NKCC1 y/o a un aumento de la actividad de KCC2 (Rivera y col., 1999; Ganguly y col., 2001). Nuestros datos sugieren que las células HuC/D⁺ en el epéndimo son neuronas en diferentes etapas de maduración con proporciones diferentes de NKCC1/KCC2 que determinan las acciones del GABA desde excitaciones hasta inhibiciones. De acuerdo con esta interpretación, las células HuC/D⁺ que se hiperpolarizaron en respuesta al GABA, generalmente descargaron en forma repetitiva -una característica electrofisiológica de neuronas más diferenciadas (Russo y Hounsgaard, 1999; Spitzer y col., 2000)- y presentaron una actividad de KCC2 medible (ver Fig. 23).

IIC.4. GABA y Ca²⁺: un tándem para la neurogénesis

La mayoría de las acciones del GABA sobre los procesos implicados en la neurogénesis están mediados por un aumento de la [Ca²⁺]_i inducido por despolarización de la membrana (Ge y col., 2006; Bordey, 2007). En este sentido, en muchos progenitores y neuronas alrededor del CC, el GABA produjo un aumento del Ca²⁺ intracelular prolongado que requirió Ca²⁺ extracelular y la activación del receptor GABA_A. El curso temporal de las señales de Ca²⁺ fue similar al de las ondas lentas de Ca²⁺ que ocurren espontáneamente en la médula espinal en desarrollo de Xenopus (Gu y col., 1994) y al de las señales de Ca²⁺ inducidas por GABA en los progenitores corticales (LoTurco y col., 1995). El aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular inducido por GABA se atribuye comúnmente a la apertura de canales de Ca²⁺ voltaje dependientes (Ben-Ari, 2002). Mientras que este podría ser un mecanismo plausible para las neuronas que contactan el CC, es poco probable que la pequeña despolarización observada en muchas células sea suficiente para abrir canales de Ca²⁺ operados por voltaje. Además, los progenitores BLBP⁺ no poseen corrientes entrantes activadas por voltaje (Russo y col., 2008). Mecanismos alternativos, tales como la activación de canales tipo "transient receptor potential" permeables al Ca²⁺ y sensibles a cambios osmóticos podrían participar en el aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular inducido por GABA que se describe aquí (Chavas y col., 2004). Los mecanismos íntimos y la relevancia funcional del aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular en las células que contactan el CC queda como uno de los puntos a aclarar en el futuro.

IIC.5. Señalización purinérgica sobre los precursores espinales: corrientes complejas y aumentos de Ca²⁺

En los precursores de la corteza y la retina embrionaria, la liberación de ATP a través de hemicanales así como la comunicación vía uniones de tipo "gap", son parte central de los mecanismos de generación de las ondas de Ca²⁺ que regulan la proliferación (Bittman, y col., 1997; Weissman, 2004; Pearson y col.; 2005). Sin embargo, no existen datos concernientes a las respuestas eléctricas generadas por el ATP en los progenitores neurogénicos. En los dominios de precursores localizados en los cuadrantes laterales del CC, la aplicación local de ATP generó respuestas bifásicas compuestas por una corriente saliente seguida de una corriente entrante. El hecho de que la primera parte de la respuesta no fue afectada por la Cbx sugiere que la corriente saliente no depende de la actividad de hemicanales de conexina en la membrana y/o el acople a través de uniones de tipo "gap". Una posibilidad es que la corriente saliente inicial sea generada por activación de receptores purinérgicos de tipo ionotrópico (P2X). Sin embargo, la activación de receptores ionotrópicos para el ATP produce corrientes entrantes (North, 2002), haciendo difícil explicar nuestros resultados mediante la activación de los mismos. Por otra parte, los mecanismos que subyacen a los efectos producidos por el ATP sobre las células precursoras durante el desarrollo depende de la activación de los receptores metabotrópicos P2Y1 que activa la vía de señalización del IP3, la cual da lugar a un aumento de Ca²⁺ intracelular (Berridge, 1995; Neary y col, 1996; Weissman, 2004). En megacariocitos de rata la activación de los receptores purinérgicos P2Y aumenta la concentración de Ca²⁺ citosólica que genera una corriente saliente por la activación de receptores de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (Young y col., 2010). Algo similar fue descrito en las células del músculo liso del ratón, en donde la activación de receptores P2Y también genera la apertura de canales de K^+ dependientes del Ca²⁺ (Vogalis y Goyal, 1997). Finalmente, en miocitos disociados de la aorta torácica del ratón el ATP activa una corriente de K⁺ mediada por un canal de poros gemelos de la subfamilia TASK (Hayoz y col., 2009). Por lo tanto, es posible que la primera parte de la respuesta encontrada en nuestro estudio sea debida, o bien a la activación de canales de K⁺ a través de receptores metabotrópicos, o a canales de K⁺ operados por Ca⁺. El gran aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular producido por el ATP en los precursores espinales favorecería la aceptación de este último mecanismo. Con respecto a la lenta corriente entrante que sigue a la respuesta inicial, el hecho de que la Cbx produce su bloqueo y a la vez una distorsión de las respuestas de Ca²⁺, sugiere que las uniones de tipo "gap" y/o los hemicanales en la membrana son parte de los mecanismos que median la lenta corriente entrante. El potencial de reversión de hemicanales de Cx43 se estima cercano a 0 mV (Contreras y col., 2003), por lo cual la apertura de estos hemicanales produciría una corriente entrante. Un escenario posible, entonces, es que la apertura de hemicanales de Cx43 en la membrana producida por el aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular o por modulación a través receptores P2Y genere la lenta corriente entrante que es sensible a la Cbx. Para testar estas posibilidades y disecar los mecanismos íntimos de las complejas corrientes generadas por ATP en las células progenitoras de la médula espinal es necesario combinar los registros electrofisiológicos con una rigurosa aproximación farmacológica.

Un hecho interesante es el mecanismo de origen de las respuestas de Ca²⁺ disparadas por ATP. Los aumentos de Ca²⁺ generados por ATP son en efecto disparados por activación de receptores purinérgicos ya que fueron abolidos por la suramina. Durante el desarrollo, los aumentos de Ca²⁺ parecen ser iniciados por las GRs que están en fase S (Weissman y col., 2004): cuando la célula se acerca a la fase S, migra hacia el epéndimo y los hemicanales se abren de una manera espontánea o regulada generando la liberación de ATP que actúa en las células vecinas activando receptores P2Y y movilizando los reservorios intracelulares de Ca²⁺. Las células en G₁ que se están acercando a la fase S requieren de un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular antes de iniciar la síntesis de ADN (Berridge, 1995). Se cree que el aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular contribuye a iniciar la fase S en vez de salir del ciclo celular (Go). Por lo tanto, las GRs en fase S usarían la liberación de ATP para reclutar células vecinas que estén en G₁ para que entren en la fase S, conduciendo así a la sincronización del ciclo celular de grupos de GRs (Weissman y col., 2004). En forma similar, las células cercanas al CC fueron las primeras en aumentar la concentración de Ca²⁺ intracelular en respuesta al ATP. Por lo tanto, podríamos postular que las células precursoras que se encuentran cercanas al CC sean las que estén entrando en la fase S y que, mediante la liberación de ATP, promuevan la sincronización de las vecinas. Por otra parte, el hecho de que una célula aumente la concentración de Ca intracelular primero en las prolongaciones que contactan al CC nos lleva a pensar que los receptores para el ATP se concentran cerca del canal. Sin embargo, esta diferencia podría ser debida también a diferentes mecanismos de liberación de Ca²⁺ desde los reservorios intracelulares. Estudios inmunohistoquímicos que permitan localizar los receptores para el ATP, así como el estudio de los mecanismos de los aumentos de Ca²⁺, son necesarios para evaluar estas hipótesis. Concluyendo, nuestros datos apoyan la posibilidad de que los aumentos de Ca²⁺ encontrados en este estudio puedan funcionar para sincronizar la entrada al ciclo celular de precursores en dominios funcionales bien definidos del CC.

IIC.6. Importancia de la regulación vía neurotransmisores en el epéndimo

Nuestros resultados representan la primera evidencia de que el epéndimo en la médula espinal tiene varios componentes de la señalización GABAérgica y purinérgica característicos de los nichos neurogénicos. Estos hallazgos hacen atractiva la hipótesis de que los mecanismos de regulación de la neurogénesis han sido conservados a través de la evolución. Algunos elementos de la señalización GABAérgica y purinérgica descritos aquí también podrían estar operativos en el epéndimo de la rata. Aunque la médula espinal de mamíferos parecen haber perdido la capacidad neurogénica (Horner y col., 2000), hay células en el epéndimo de ratas que muestran características moleculares y electrofisiológicas de neuronas inmaduras que, como se describe aquí, responden de una manera heterogénea al GABA (Marichal y col., 2009). Curiosamente, un estudio reciente en la médula espinal de ratones adultos mostró un aumento en la neurogénesis por estimulación sensorial, pero las nuevas neuronas no maduran y tampoco pueden integrarse en los circuitos espinales existentes (Shecther y col., 2010). Una posibilidad podría ser que la progresión de estas neuronas inmaduras a neuronas maduras no se consume debido a la falta de componentes claves en la señalización GABAérgica. Así mismo, la ausencia de neurogénesis post-natal en la médula espinal en el resto de los mamíferos adultos estudiados podría deberse a una falta de los componentes en la señalización GABAérgica así como purinérgica en los precursores. La comprensión de la modulación vía neurotransmisores de los precursores y las neuronas inmaduras en diferentes modelos animales puede dar pistas útiles sobre los principales mecanismos necesarios para la neurogénesis funcional en la médula espinal.

Los datos de la primera parte de este capítulo dieron lugar a la última publicación que se adjunta al final de esta Tesis.

Conclusiones y perspectivas

En esta tesis hemos aportado variadas evidencias que apoyan la idea de que el epéndimo en la médula espinal de tortugas juveniles es un nicho neurogénico con distintos tipos de células precursoras y neuronas en diversos grados de diferenciación (Fig. 30). Nuestro estudio mostró que las células que proliferan activamente son GRs acopladas a través de uniones de tipo "gap" en los cuadrantes laterales del CC con características similares a las descritas en células consideradas actualmente como progenitores neuronales (Russo y col., 2008). Sin embargo, tanto estas GRs como las encontradas en los cuadrantes mediales del CC, son heterogéneas desde el punto de vista de sus propiedades eléctricas así como en el grado de acople por difusión de colorante que presentan (Russo y col., 2008), el fenotipo morfológico y molecular que expresan (ver Trujillo-Cenóz y col., 2007) y las respuestas al GABA (Reali y col., 2011) y al ATP. Esta heterogeneidad puede reflejar distintos estados funcionales relacionados con las diferentes fases del ciclo celular, la dinámica de maduración de las células o la potencialidad de linaje de estos precursores. Asimismo, presentamos evidencias que sugieren que las neuronas inmaduras en el epéndimo se encuentran en diferentes grados de maduración y describimos fenotipos celulares que sugieren formas transicionales entre los progenitores y las neuronas inmaduras. Finalmente, nuestro estudio de la señalización GABAérgica y purinérgica apoya la idea de que algunos mecanismos de regulación de la neurogénesis estarían conservados a lo largo de la evolución en distintos grupos zoológicos.

A. ¿Células madre y células amplificadoras en el epéndimo?

En nichos neurogénicos bien reconocidos del cerebro adulto de los mamíferos coexisten dos poblaciones de progenitores: las células madre GFAP⁺ que se dividen lentamente originando a las células precursoras "amplificadoras", las cuales se dividen más rápido y generan a los neuroblastos (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Nuestros resultados sugieren la posibilidad de que las GRs desacopladas o que forman grupos pauci-celulares en los cuadrantes mediales del epéndimo, sean las células tipo troncales que se dividen lentamente y que mantienen la población de progenitores neuronales. Apoyando esta idea, muchas imágenes de GRs GFAP⁺ se concentran en los cuadrantes mediales del CC (Trujillo-Cenóz y col., 2007). La hipótesis que vertebra esta tesis está representada esquemáticamente en la figura 30 con un signo de interrogación sobre la flecha que va desde la GR medial (en amarillo) hasta las GRs acopladas en los cuadrantes laterales (en verde). Las posibles diferencias en el ciclo celular de los progenitores en los cuadrantes mediales y laterales se podrían analizar en el futuro utilizando la técnica de doble marcado con distintos análogos nucleotídicos (e.g., CldU e ldu) aplicados a diferentes tiempos y/o usando un tratamiento con la citosina "beta-D-arabinofuraniside" (Ara-C) (ver Maslov y col, 2004).



Figura 30. Esquema que muestra al epéndimo como un nicho de proliferación y diferenciación neuronal.

B. Heterogeneidad funcional de las GRs y su probable significado funcional

Uno de los aportes más interesantes es el hallazgo de dominios espaciales de precursores acoplados a través de Cx43 que expresan proteínas típicas de GRs con potencialidad de generar linaje neuronal (Pinto y Götz, 2007). Las células que componen

estas unidades funcionales son heterogéneas en sus propiedades, ya que algunas expresan una I_{KD} , en tanto otras presentaron respuestas totalmente pasivas. A pesar de que las corrientes de K⁺ y el acople a través de Cx43 son dos atributos funcionales comunes de los progenitores neurales, se conoce poco sobre cómo afectan la biología de estas células. En otros nichos neurogénicos, la división celular es precedida por el desacople eléctrico y la migración del núcleo hacia la luz del ventrículo. Para lograr esto, la célula necesita generar cambios de volumen, lo cual podría ser ayudado por los canales de K⁺ dependientes del voltaje en la membrana (Pardo, 2004). Es posible que algunas de las formas celulares de transición en contacto con el CC que presentan estas corrientes (generalmente desacopladas y que expresan la proteína S100), sean células que estén entrando o saliendo de una división celular. Por otra parte, algunos estudios sugieren que tanto los canales de K⁺ (Hendriks y col., 1999; Pardo, 2004) así como las conexinas (Bruzzone y Dermietzel, 2006) pueden regular fenómenos como la proliferación y la migración celular, y eventualmente el potencial de linaje de los precursores. Si bien el modelo *in vitro* que hemos utilizado ha sido útil para revelar la complejidad funcional y la diversidad de las células progenitoras, para develar el rol que cumplen los canales de K⁺ y las conexinas son necesarias otro tipo de aproximaciones experimentales. El uso de un modelo in vivo en el cual se pueda interferir con estos canales nos permitiría evaluar si hay cambios en los fenotipos de los precursores (e.g., cambios morfológicos o en la expresión de BLBP o Pax6), la potencialidad de linaje o la actividad proliferativa cuando se bloquean la I_{KD} o el acople a través de uniones de tipo "gap". Para realizar esto, una posible estrategia es la utilización de bombas osmóticas que permitan la aplicación en la médula espinal de fármacos (e.g., Cbx para bloquear el acople eléctrico). Esta estrategia relativamente simple puede plantear dificultades ya que pocos fármacos tienen una alta y además la aplicación local afecta múltiples selectividad tipos celulares. Consecuentemente, la interpretación de los datos se vería dificultada por efectos espurios. Una aproximación más elegante sería la interferencia selectiva de los canales de K⁺ o la Cx43 utilizando vectores lentivirales para suprimir la expresión de una determinada proteína (interferencia de ARN). En este sentido, en colaboración con el Dr. Maskos del Instituto Pasteur estamos desarrollado una serie de vectores lentivirales para interferir con la Cx43 de tortuga (G. García, datos inéditos). A través del uso del promotor adecuado sería posible interferir específicamente con la expresión de Cx43 en un tipo celular definido (e.g., células BLBP⁺). Una estrategia similar se podría utilizar para interferir con la expresión de canales de K⁺. Esta técnica combinada con la electrofisiología y la inmunohistoquímica nos permitirá evaluar los posibles cambios en la biología de los

progenitores revelando el papel de la I_{KD} y la Cx43. Otro punto interesante a estudiar es la posible función de las rectificaciones de salida y su modulación por la actividad encontradas en el grupo de GRs concentradas en el cuadrante dorsal del epéndimo. Para esto primero será necesario estudiar *in vitro* los mecanismos subyacentes a esas respuestas. Dado que se trata de corrientes muy lábiles se hace imprescindible el uso de la técnica de "patch" perforado ya que si se usara la configuración "whole-cell" convencional estas corrientes pueden disminuir a los pocos minutos.

C. Nuevas neuronas en el epéndimo: ¿elementos de remplazo para los circuitos espinales?

En esta Tesis hemos descrito la existencia de un grupo de células que presentaron características ambiguas en cuanto a su naturaleza glial o neuronal, hecho que sugiere una clase de transición entre ambos. En el caso de seguir al linaje neuronal, las nuevas células dejarían de expresar marcadores gliales (ver Fig. 14B, GR en la zona lateral BLBP⁻) y empezarían a insertar canales de Na⁺ en su membrana como sugiere la presencia de pequeñas corrientes entrantes en algunos casos (ver Fig. 15). Finalmente, la maduración de la excitabilidad desde la descarga única a la descarga repetitiva requeriría no sólo el aumento en la densidad de canales de Na⁺ sino una regulación en menos de canales de K⁺ operados por voltaje y la aparición de nuevos tipos de conductancias de K⁺. En su conjunto, nuestros resultados sugieren la existencia de células en diferentes grados de maduración hacia el linaje neuronal que contactan el CC. Esta hipótesis se ilustra en la figura 30. En el esquema también se muestra el registro de una neurona madura desconectada del CC en el cual se observan potenciales de acción de gran amplitud y una aceleración de la descarga, propiedades consideradas intrínsecas de algunas de las neuronas maduras. Esto último junto con el hecho de que las neuronas inmaduras conectadas al CC poseen fenotipos morfológicos de neuroblastos y que son HuC/D⁺ pero NeuN⁻, sugieren que todas las células del linaje neuronal en el epéndimo estarían en proceso de maduración.

Nuestro trabajo plantea una serie de interrogantes que intentaremos abordar en el futuro. Por un lado queda por resolver el destino final de las neuronas generadas alrededor del CC. Una posibilidad es que las neuronas en contacto con el CC sean elementos sensoriales que monitorean la composición del líquido céfalo-raquídeo o que

detecten perturbaciones mecánicas (Vigh y Vigh-Teichmann, 1998; Bruni, 1998; Huang y col., 2006). En este escenario, las nuevas neuronas estarían destinadas a ocupar el espacio generado durante el crecimiento de la médula espinal y/o a remplazar neuronas que se mueren. Dado que en ratones se ha demostrado que algunas neuronas en contacto con el CC expresan el receptor P2X2 para el ATP (Stoeckel y col., 2003) y el canal iónico de tipo "polycystic-kidney-disease" (PKD2L1) (Huang y col., 2006), se piensa podrían ser células que detecten cambios en el pH del medio extracelular. Alternativamente, las nuevas neuronas podrían desconectarse del CC y migrar incorporándose a los circuitos espinales ya operativos. En apoyo de esta posibilidad, estudios preliminares de nuestro grupo han revelado que una sub-población de neuronas que contactan el CC expresan proteínas que participan en la migración celular como la doblecortina y el PSA-NCAM (G. Fabbiani, datos inéditos). El uso de vectores retrovirales para el trazado de linaje combinado con la electrofisiología (van Praag y col., 2002; Carleton y col., 2003), sería la estrategia experimental de elección para evaluar la secuencia de diferenciación desde célula progenitora a neurona sugerida por nuestro estudio y la posible migración neuronal a partir del CC.

D. Regulación de la neurogénesis por neurotransmisores

La señalización por GABA y ATP en las células que contactan el CC tiene características similares a la de los nichos neurogénicos del embrión y el cerebro adulto. La variedad de efectos del GABA sobre las neuronas inmaduras en contacto con el CC apoyan nuestra hipótesis que éstas representan una población heterogénea en distintos estados de maduración funcional. Es posible que al igual que en la ZSV, las neuronas inmaduras -a través de la liberación de GABA- influyan sobre los progenitores regulando su capacidad proliferativa. De la misma manera nuestros resultados electrofisiológicos y de imagenología de Ca²⁺ son altamente sugestivos de que el GABA podría ser una señal clave para la maduración de las neuronas en contacto con el CC. Una aproximación sencilla para evaluar estas posibilidades es interferir con los mecanismos de señalización GABAérgica. Esto sería posible por ejemplo bloqueando el co-transportador NKCC1 con inyecciones de bumetanida *in vivo* (Wang y Kriegstein, 2011). Según nuestros resultados, los afectos se verían tanto a las células progenitoras como en los neuroblastos, disminuyendo la influencia excitadora aportada por el GABA. Nuestra predicción es que en estas condiciones, la actividad proliferativa de los progenitores estaría aumentada y la

81

maduración neuronal retrasada, encontrando por ejemplo, un menor número de células que descargan en forma repetitiva. Como se mencionó anteriormente, las técnicas de iARN utilizando vectores virales sería una estrategia más poderosa para evaluar el rol de la señalización GABAérgica en la biología de este nicho neurogénico ya que posibilita el bloqueo de mecanismos en forma selectiva.

Recientemente se han acumulado evidencias que apuntan a la señalización purinérgica como otro pilar en la regulación de la actividad de los progenitores neurales (Dale, 2008). Si bien nuestros resultados muestran que el ATP podría ser un regulador importante sobre las propiedades del dominio de progenitores neurogénicos en los aspectos laterales del CC, quedan por resolver los detalles sobre los mecanismos que generan las corrientes de membrana y las señales de Ca²⁺ inducidas por ATP. Una línea de trabajo futura será entender estos mecanismos y su relevancia funcional para la función global del nicho.

Finalmente, en otros nichos neurogénicos el glutamato (Lo Turco y col., 1995; ver Platel y col., 2008) y la serotonina (Mazer y col., 1997; Gould, 1999; Djavadian, 2004) también están involucrados en la regulación de los procesos neurogénicos. En este sentido, nuestros estudios previos muestran que el glutamato genera respuestas en las neuronas que contactan al CC (Russo y col., 2004). Además, sabemos que existe tanto un plexo glutamatérgico como otro serotoninérgico rodeando el epéndimo (Trujillo-Cenóz y col., 2007). Más aún, estudios preliminares indican que la serotonina genera diferentes tipos de respuestas electrofisiológicas en las células que contactan el CC. Por lo tanto, sería interesante estudiar las propiedades de señalización a través de estas moléculas así como sus posibles funciones. Además, como se ha discutido recientemente para la ZSV (Young y col, 2011), es necesario tener en cuenta la superposición de funciones de los múltiples sistemas de neurotransmisores en la neurogénesis para poder desarrollar terapias celulares o tratamientos farmacológicos en enfermedades o traumas.

Aunque la médula espinal adulta de los mamíferos contiene células progenitoras, la generación de nuevas neuronas parece estar solo "latente", hecho que contrasta con los vertebrados inferiores que parecen ser capaces de generar nuevas neuronas (Tanaka y Ferreti, 2009). Los resultados presentados en esta Tesis establecen a la médula espinal de la tortuga como un modelo valioso en el cual es posible estudiar los mecanismos por los cuales se generan nuevas neuronas en un nicho neurogénico espinal inmerso en circuitos capaces de integrar información sensorio-motriz. Los estudios que planteamos realizar en el futuro podrían ayudar a entender aspectos clave de los mecanismos

neurogénicos que están ausentes o permanecen latentes en la médula espinal de mamíferos adultos, y que podrían en un futuro, ser manipulados para promover la reparación de la médula espinal dañada.

Referencias

Akaike N. Gramicidin perforated patch recording and intracellular chloride activity in excitable cells. Prog Biophys Mol Biol. 1996. 65:251-64.

Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? Science. 1962. 135:1127-8.

Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Anat Rec. 1963. 145:573-91.

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol. 1965. 124:319-35.

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. Nat Rev Neurosci. 2001. 2:287–93.

Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron. 2004. 41:683-6.

Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. Brain Res Bull. 2002. 57:751-8.

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. Annu Rev Physiol. 2001. 63:795-813.

Bahrey HL, Moody WJ. Voltage-gated currents, dye and electrical coupling in the embryonic mouse neocortex. Cereb Cortex. 2003. 13:239 –51.

Barry PH, Diamond JM. Junction potentials, electrode standard potentials, and other problems in interpreting electrical properties in membranes. J Membr Biol. 1970. 3:93–122.

Battista AG, Ricatti MJ, Pafundo DE, Gautier MA, Faillace MP. Extracellular ADP regulates lesion-induced in vivo cell proliferation and death in the zebrafish retina. J Neurochem. 2009. 111:600-13.

Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. Nat Rev Neurosci. 2002. 3: 728-39.

Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. Physiol Rev. 2007. 87:1215-84.

Ben-Ari Y, Spitzer NC. Phenotypic checkpoints regulate neuronal development. Trends Neurosci. 2010. 33:485-92.

Ben-Ari Y, Tyzio R, Nehlig A. Excitatory action of GABA on immature neurons is not due to absence of ketone bodies metabolites or other energy substrates. Epilepsia. 2011. 52:1544-58.

Berridge MJ. Capacitative calcium entry. Biochem J. 1995. 15:312:1-11.

Birse SC, Leonard RB, Coggeshall RE. Neuronal increase in various areas of the nervous system of the guppy, Lebistes. J Comp Neurol. 1980. 194: 291-301.

Bittman KS, LoTurco JJ. Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. Cereb Cortex. 1999. 9:188 -95.

Bittman K, Owens DF, Kriegstein AR, Lo Turco JJ. Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. J Neurosci. 1997. 17:7037-44.

Blair LA. The timing of protein synthesis required for the development of the sodium action potential in embryonic spinal neurons. J Neurosci. 1983. 3:1430-6.

Blair LA, Dionne VE. Developmental acquisition of Ca2+-sensitivity by K+ channels in spinal neurones. Nature. 1985. 315:329-31.

Bolteus AJ, Bordey A. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. J Neurosci. 2004. 24:7623.31.

Bordey A. Enigmatic GABAergic networks in adult neurogenic zones. Brain Res Brain Res Rev. 2007. 53:124-34.

Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. Cell. 2000. 101:435-45.

Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. Eur J Neurosci. 2003. 17:2042-6.

Bruzzone R, Dermietzel R. Structure and function of gap junctions in the developing brain. Cell Tissue Res. 2006. 326:239 -48.

Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. J Comp Neurol. 2001. 435:406-17.

Campbell K. Signaling to and from radial glia. Glia. 2003. 43:44–6.

Campbell K, Götz M. Radial glia: multipurpose cells for vertebrate brain development. Trends Neurosci. 2002. 25:235-38.

Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. Nat Neurosci. 2003. 6:507-18.

Cayre M, Strambi C, Charpin P, Augier R, Meyer MR, Edwards JS, Strambi A. Neurogenesis in adult insect mushroom bodies. J Comp Neurol. 1996. 371:300-10.

Chanas-Sacre G, Rogister B, Moonen G, Leprince P. Radial glia phenotype: origin, regulation, and transdifferentiation. J Neurosci Res. 2000. 61:357-63.

Chavas J, Forero ME, Collin T, Llano I, Marty A. Osmotic tension as a possible link between GABAA receptor activation and intracellular calcium elevation. Neuron. 2004.

44:701-13.

Cheng A, Tang H, Cai J, Zhu M, Zhang X, Rao M, Mattson MP. Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. Dev Biol. 2004. 272:203–16.

Chenn A, Zhang YA, Chang BT, McConnell SK . Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. Mol Cell Neurosci. 1998. 11:183–93.

Cherubini E, GriguoliM, Safiulina V & Lagostena L. The depolarizing action of GABA controls early network activity in the developing hippocampus. Mol Neurobiol. 2010. 43:97-106.

Chittajallu R, Chen Y, Wang H, Yuan X, Ghiani CA, Heckman T, McBain CJ, Gallo V. Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. Proc Natl Acad Sci USA. 2002. 99:2350 –55.

Clorfene JB, Pollack ED. Late-generated cells in the lateral motor columns of developing frog spinal cord. Brain Res Dev Brain Res. 1994. 79:93-100.

Connor JA, Stevens CF. Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. J Physiol. 1971. 213:1-19.

Connors BW, Ransom BR. Electrophysiological properties of ependymal cells (radial glia) in dorsal cortex of the turtle, Pseudemys scripta. J Physiol. 1987. Apr;385:287-306.

Contreras JE, Sáez JC, Bukauskas FF, Bennett MV. Functioning of cx43 hemichannels demonstrated by single channel properties. Cell Commun Adhes. 2003. 10:245-9.

Dale N. Dynamic ATP signalling and neural development. J Physiol. 2008. 586:2429-36.

Danilov AI, Covacu R, Moe MC, Langmoen IA, Johansson CB, Olsson T, Brundin L. Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis. Eur J Neurosci. 2006. 23:394–400.

DeMarchis S, Temoney S, Erdelyi F, Bovetti S, Bovolin P, Szabo G, Puche AC. GABAergic phenotypic differentiation of a subpopulation of subventricular derived migrating progenitors. Eur J Neurosci. 2004. 20:1307-17.

Deng XL, Lau CP, Lai K, Cheung KF, Lau GK, Li GR. Cell cycle dependent expression of potassium channels and cell proliferation in rat mesenchymal stem cells from bone marrow. Cell Prolif. 2007. 40:656–70.

Dervan AG, Roberts BL. Reaction of spinal cord central canal cells to cord transection and their contribution to cord regeneration. J Comp Neurol. 2003. 458:293-306.

Desarmenien MG, Clendening B, Spitzer NC. In vivo development of voltage-dependent ionic currents in embryonic Xenopus spinal neurons. J Neurosci. 1993. 13:2575-81.

Djavadian RL. Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2004. 64:189-200.

Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and threedimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci. 1997. 17:5046-61.

Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999. 96:11619-24.

Doetsch F, Scharff C. Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. Brain Behav Evol. 2001. 58:306-22.

Duval N, Gomes D, Calaora V, Calabrese A, Meda P, Bruzzone R. Cell coupling and Cx43 expression in embryonic mouse neural progenitor cells. J Cell Sci. 2002. 115:3241-51.

Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. Nature. 2007. 448:901-7.

Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. J Neurosci. 2005. 25:10074-86.

Feng L, Hatten ME, Heintz N. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. Neuron. 1994. 12:895-908.

Feng L, Heintz N. Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. Development. 1995. 121:1719 -30.

Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenoz O. Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. J Comp Neurol. 2002. 458:293–306.

Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. Mol Cell Neurosci. 2003. 23:373–382.

Fricker D, Verheugen JA, Miles R. Cell-attached measurements of the firing threshold of rat hippocampal neurones. J Physiol. 1999. 517:791–804.

Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Hu X, Liu Z, Jensen J, Qiu M. Molecular mapping of the origin of postnatal spinal cord ependymal cells: evidence that adult ependymal cells are derived from Nkx6.1_ ventral progenitor cells. J Comp Neurol. 2003. 456:237–44.

Gage FH. Neurogenesis in the adult brain. J Neurosci. 2002. 22:612-3.

Gage FH, Kempermann G, Song H. Adult Neurogénesis. Cold Spring Harbor, New York. 2008.

Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. Cell. 2001. 105:521-32.

Gao BX, Ziskind-Conhaim L. Development of ionic currents underlying changes in action potential waveforms in rat spinal motoneurons. J Neurophysiol. 1998. 80:3047-61.

Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. Nat Neurosci. 2004. 7:1233-41.

Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. Nature. 2006. 439:589-93.

Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. Trends Neurosci. 2007. 30:1-8.

Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005. 6:777-88.

Gould E. Serotonin and hippocampal neurogenesis. Neuropsychopharmacol. 1999. 21:46S-51.

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998. 95:3168-71.

Graziadei PP, Graziadei GA. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. J Neurocytol. 1979. 8:1-18.

Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. Nat Rev Neurosci. 2000. 1:67-73.

Gu X, Olson EC & Spitzer NC. Spontaneous neuronal calcium spikes and waves during early differentiation. J Neurosci. 1994. 14:6325-35.

Hack MA, Saghatelyan A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Gotz M. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. Nat Neurosci. 2005. 8:865–72.

Hartfuss E, Galli R, Heins N, Götz M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. Dev Biol. 2001. 229:15-30.

Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. J Neurosci. 2000. 20:5764-74.

Hayoz S, Bychkov R, Serir K, Docquier M, Bény JL. Purinergic activation of a leak potassium current in freshly dissociated myocytes from mouse thoracic aorta. Acta Physiol (Oxf). 2009. 195:247-58.

Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Gotz M. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. Nat Neurosci. 2002. 5:308 -15.

Hendriks R, Morest DK, Kaczmarek LK. Role in neuronal cell migration for high-threshold potassium currents in the chicken hindbrain. J Neurosci Res. 1999. 58:805-14.

Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA. 2001. pp.1–20.

Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. J Neurosci. 2000. 20:2218 -28.

Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Tränkner D, Ryba NJ, Zuker CS. The cells and logic for mammalian sour taste detection. Nature. 2006. 442:934-8.

Hughes SM, Easton CR, Bosma MM. Properties and mechanisms of spontaneous activity in the embryonic chick hindbrain. Dev Neurobiol. 2009. 69:477-90.

Jackson DC. Hibernating without oxygen: physiological adaptations of the painted turtle. J Physiol. 2002. 43:731-7.

Jacobs BL, van Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. Mol Psychiatry. 2000. 5:262-9.

Jia C, Doherty JP, Crudgington S, Hegg CC. Activation of purinergic receptors induces proliferation and neuronal differentiation in Swiss Webster mouse olfactory epithelium. Neuroscience. 2009. 163:120-8.

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell. 1999. 96:25-34.

Kardami E, Dang X, Lacobas DA, Nickel BE, Jeyaraman M, Srisakuldee W, Makazan J, Tanguy S, Spray DC. The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. Prog Biophys Mol Biol. 2007. 94:245-64.

Kaplan MS. Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electronmicroscopic and morphometric analysis. Ann N Y Acad Sci. 1985. 457:173-92.

Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. Science. 1977. 197:1092-4.

Kehl LJ, Fairbanks CA, Laughlin TM, Wilcox GL. Neurogenesis in postnatal rat spinal cord: a study in primary culture. Science. 1997. 276:586-9.

Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. J Neurosci. 2005. 25:6997–7003.

Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu Rev Neurosci. 2009. 32:149-84.

Kuhn HG, Peterson DA. Detection and phenotypic characterization of adult neurogenesis. In: Adult Neurogenesis (Gage FH, Kempermann G, Song H ed), pp 25-47. Cold Spring Harbor, New York. 2008.

Kunze A, Congreso MR, Hartmann C, Wallraff-Beck A, Hüttmann K, Bedner P, Requardt

R, Seifert G, Redecker C, Willecke K, Hofmann A, Pfeifer A, Theis M, Steinhäuser C. Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 106:11336-41.

Langer D, Ikehara Y, Takebayashi H, Hawkes R, Zimmermann H. The ectonucleotidases alkaline phosphatase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 are associated with subsets of progenitor cell populations in the mouse embryonic, postnatal and adult neurogenic zones. Neuroscience. 2007. 150:863-79.

Lazarini F, Lledo PM. Is adult neurogenesis essential for olfaction? Trends Neurosci. 2011. 34:20-30.

Lee SK, Pfaff SL. Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. Nat Neurosci. 2001. 4:1183–91.

Lenhossék MV. Feinere bau des nervesystems. Fisher's medicin. Buchhandlung H Kornfeld, Berlín, NW. 1895.

Lima-de-Faria A, Jaworska H. Late DNA synthesis in heterochromatin. Nature. 1968. 217:138-42.

Liu X, Bolteus AJ, Balkin DM, Henschel O, Bordey A. GFAPexpressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. Glia. 2006. 54:394–410.

Liu X, Hashimoto-Torii K, Torii M, Haydar TF, Rakic P. The role of ATP signaling in the migration of intermediate neuronal progenitors to the neocortical subventricular zone. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008. 105:11802-7.

Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. Nat Neurosci. 2005. 8:1179-87.

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. Nat Rev Neurosci. 2006. 7:179 -93.

Lo Turco JJ, Kriegstein AR. Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. Science. 1991. 252:563-5.

Lo Turco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. Neuron. 1995. 15:1287-98.

Ma DK, Kim WR, Ming GL, Song H. Activity dependent extrinsic regulation of adult olfactory bulb and hippocampal neurogenesis. Ann N Y Acad Sci. 2009. 1170: 664-73.

Majumder P, Trujillo CA, Lopes CG, Resende RR, Gomes KN, Yuahasi KK, Britto LR, Ulrich H. New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. Purinergic Signal. 2007. 3:317-31.

Marichal N, García G, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O & Russo RE. Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in "standby mode"? J Neurosci. 2009. 29:10010-24.

Marín-Burgin A, Schinder AF. Requirement of adult-born neurons for hippocampusdependent learning. Behav Brain Res. 2011. Jul 7.

Martin DL, Rimvall K. Regulation of gammaaminobutyric acid synthesis in the brain. J Neurochem. 1993. 60: 395–407.

Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. J Neurosci. 2004. 24:1726-33.

Masse K, Bhamra S, Eason R, Dale N, Jones EA. Purine-mediated signalling triggers eye development. Nature. 2007. 449:1058-62.

Mazer C, Muneyyirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. Brain Res. 1997. 760:68-73.

Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisén J. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. PLoS Biol. 2008. 6:e182.

Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. Science. 2007. 317:38-4.

Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci. 2005. 28:223-50.

Misson JP, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS Jr. Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. Brain Res Dev Brain Res. 1988. 44:95-108.

Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. Development. 2004. 131:3133-45.

Morshead CM, van der Kooy D. A new 'spin' on neural stem cells? Curr Opin Neurobiol. 2001. 11:59-65.

Myers VB, Haydon DA. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. II. The ion selectivity. Biochim Biophys Acta. 1972. 274:313-22.

Nacher J, Varea E, Blasco-Ibanez JM, Castillo-Gomez E, Crespo C, Martinez- Guijarro FJ, McEwen BS. Expression of the transcription factor Pax 6 in the adult rat dentate gyrus. J Neurosci Res. 2005 81:753-61.

Nadarajah B, Jones AM, Evans WH, Parnavelas JG. Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. J Neurosci. 1997. 17:3096-111.

Nagy JI, Dudek FE, Rash JE. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. Brain Res Brain Res Rev. 2004. 47:191-215.

Nardou R, Yamamoto S, Chazal G, Bhar A, Ferrand N, Dulac O, Ben-Ari Y, Khalilov I. Neuronal chloride accumulation and excitatory GABA underlie aggravation of neonatal epileptiform activities by phenobarbital. Brain. 2011. 134:987-1002.

Neary JT, Zhu Q, Kang Y, Dash PK. Extracellular ATP induces formation of AP-1 complexes in astrocytes via P2 purinoceptors. Neuroreport. 1996. 7:2893-6.

Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P & Moonen G. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. Cell Tissue Res. 2001. 305:187–202.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature. 2001. 409:714-20.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J Neurosci. 2002. 22:3161-73.

North RA. Molecular physiology of P2X receptors. Physiol Rev. 2002. 82:1013-67.

Nottebohm F, Nottebohm ME, Crane LA, Wingfield JC. Seasonal changes in gonadal hormone levels of adult male canaries and their relation to song. Behav Neural Biol. 1987. 47:197-211.

Nottebohm F, O'Loughlin B, Gould K, Yohay K, Alvarez-Buylla A. The life span of new neurons in a song control nucleus of the adult canary brain depends on time of year when these cells are born. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994. 91:7849-53.

Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. J Neurocytol. 1989. 18:311-18.

O'Dowd DK. RNA synthesis dependence of action potential development in spinal cord neurones. Nature. 1983. 303:619-21.

Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? Nat Rev Neurosci. 2002. 3:715-27.

Pardo LA. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. Physiology. 2004. 19:285-92.

Payne JA, Rivera C, Voipio J & Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. Trends Neurosci. 2003. 26:199–206.

Pearson RA, Dale N, Llaudet E, Mobbs P. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. Neuron. 2005. 46:731-44.

Pinto L, Götz M. Radial glial cell heterogeneity—the source of diverse progeny in the CNS. Prog Neurobiol. 2007. 83:2–23.

Platel JC, Dave KA, Bordey A. Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain. J Physiol. 2008. 586:3739-43.

Radmilovich M, Fernández A, Trujillo-Cenóz O. Environment temperature affects cell proliferation in the spinal cord and brain of juvenile turtles. J Exp Biol. 2003. 206:3085-93.

Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J Comp Neurol. 1972. 145:61-83.

Rakic P. a- Adult Neurogenesis in Mammals: An Identity Crisis. 2002. 136:265-80. J Neurosci. 2002. 22:614–18.

Rakic P. b- Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. Nat Rev Neurosci. 2002. 3:65-71.

Rakic P. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. Cereb Cortex. 2003. 13:541-9.

Rakic P. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. Glia. 2003. 43:19-32.

Ramón y Cajal S. Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres. 1909 (Vol. 1) Madrid : Consejo Superior de Investigaciones científicas, Instituo Ramón y Cajal (reimpreso 1952).

Ramón y Cajal, S. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Imprenta de hijos de Moya, Madrid. 1914.

Reali C, Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O, Russo RE. GABAergic signalling in a neurogenic niche of the turtle spinal cord. J Physiol. 2011. 589:5633-47.

Reali C, Fossat P, Landry M, Russo RE, Nagy F. Intrinsic membrane properties of spinal dorsal horn neurones modulate nociceptive information processing in vivo. J Physiol. 2011. 589:2733-43.

Reali C, Russo RE. An integrated spinal cord-hindlimbs preparation for studying the role of intrinsic properties in somatosensory information processing. J Neurosci Methods. 2005. 142:317-26.

Rehermann MI, Marichal N, Russo RE, Trujillo-Cenóz O. Neural reconnection in the transected spinal cord of the freshwater turtle Trachemys dorbignyi. J Comp Neurol. 2009. 515:197-214.

Rehermann MI, Santiñaque FF, López-Carro B, Russo RE, Trujillo-Cenóz O. Cell proliferation and cytoarchitectural remodeling during spinal cord reconnection in the freshwater turtle Trachemys dorbignyi. Cell Tissue Res. 2011. 344:415-33.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M & Kaila K. The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. Nature. 1999. 397:251-5.

Root CM, Velázquez-Ulloa NA, Monsalve GC, Minakova E & Spitzer NC. Embryonically expressed GABA and glutamate drive electrical activity regulating neurotransmitter specification. J Neurosci. 2008. 28:4777-84.

Russo RE, Fernández A, Reali C, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O. Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurons in the turtle spinal cord. J Physiol. 2004. 560:831-8.

Russo RE, Hounsgaard J. a- Plateau-generating neurones in the dorsal horn in an in vitro preparation of the turtle spinal cord. J Physiol. 1996. 493:39-54.

Russo RE, Hounsgaard J. b- Burst-generating neurones in the dorsal horn in an in vitro preparation of the turtle spinal cord. J Physiol. 1996. 493:55-66.

Russo RE, Hounsgaard J. Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones. Prog Biophys Mol Biol. 1999. 72:329-65.

Russo RE, Reali C, Radmilovich M, Fernández A, Trujillo-Cenóz O. Connexin 43 delimits functional domains of neurogenic precursors in the spinal cord. J Neurosci. 2008. 28:3298-309.

Sáez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MV. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. Biochim Biophys Acta. 2005. 1711:215-24.

Sala C.L. La neuroglia de los vertebrados. Medical degree thesis, Madrid. 1894.

Sauer FC. Mitosis in the neural tube. J Comp Neurol. 1935. 62:377-405.

Schnitzer J, Franke WW, Schachner M. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. J Cell Biol. 1981. 90:435-47.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells. 1978. 4:7-25.

Sequerra EB, Gardino P, Hedin-Pereira C & de Mello FG. Putrescine as an important source of GABA in the postnatal rat subventricular zone. Neuroscience. 2007. 146:489-93.

Shechter R, Baruch K, Schwartz M, Rolls A. Touch gives new life: mechanosensation modulates spinal cord adult neurogenesis. Mol Psychiatry. 2010. 16:342–52.

Shechter R, Ziv Y, Schwartz M. New GABAergic interneurons supported by myelin-specific T cells are formed in intact adult spinal cord. Stem Cells. 2007. 25:2277-82.

Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. J Neurosci. 2000. 20:8727-35.

Spitzer NC. Electrical activity in early neuronal development. Nature. 2006. 444:707-12.

Spitzer NC. How GABA generates depolarization. J Physiol. 2010. 588:757-8.

Spitzer NC, Lamborghini JE. The development of the action potential mechanism of

amphibian neurons isolated in culture. Proc Natl Acad Sci U S A. 1976. 73:1641-5.

Spitzer NC, Ribera AB. Development of electrical excitability in embryonic neurons: mechanisms and roles. J Neurobiol. 1998. 37:190-7.

Spitzer NC, Vincent A, Lautermilch NJ. Differentiation of electrical excitability in motoneurons. Brain Res Bull. 2000. 53:547-52.

Stoeckel ME, Uhl-Bronner S, Hugel S, Veinante P, Klein MJ, Mutterer J, Freund-Mercier MJ, Schlichter R. Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gammaaminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of 40 purinergic receptors, PSA-NCAM, GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. J Comp Neurol. 2003. 457:159-74.

Tanaka EM, Ferretti P. Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. Nat Rev Neurosci. 2009. 10:713-23.

Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. J Comp Neurol. 2001. 437:496-504.

Taupin P. Adult neural stem cells: The promise of the future. Neuropsychiatr Dis Treat. 2007. 3:753-60.

Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. Cereb Cortex. 2003. 13:580-7.

Tritsch NX, Yi E, Gale JE, Glowatzki E, Bergles DE. The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. Nature. 2007. 450:50-5.

Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. Neuron. 2005. 47: 803-15.

Trujillo-Cenóz O, Fernández A, Radmilovich M, Reali C, Russo RE. Cytological organization of the central gelatinosa in the turtle spinal cord. J Comp Neurol. 2007. 502:291-308.

Tyzio R, Ivanov A, Bernard C, Holmes GL & Ben-Ari Y, Khazipov R. Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. J Neurophysiol. 2003. 90:2964–72.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat Neurosci. 1999. 2:266-70.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. Nat Rev Neurosci. 2000. 1:191-8.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature. 2002. 415:1030-4.

Verheugen JA, Fricker D, Miles R. Noninvasive measurements of the membrane potential

and GABAergic action in hippocampal interneurones. J Neurosci. 1999. 19:2546-55.

Vigh B, Vigh-Teichmann I. Actual problems of the cerebrospinal fluidcontacting neurons. Microsc Res Tech. 1998. 41:57-83.

Vogalis F, Goyal RK. Activation of small conductance Ca2+-dependent K+ channels by purinergic agonists in smooth muscle cells of the mouse ileum. J Physiol. 1997. 502:497-508.

Wang DD, Kriegstein AR. Defining the role of GABA in cortical development. J Physiol. 2009. 587:1873-9.

Wang DD, Kriegstein AR. Blocking early GABA depolarization with bumetanide results in permanent alterations in cortical circuits and sensorimotor gating deficits. Cereb Cortex. 2011. 21:574-87.

Wang DD, Krueger DD, Bordey A. GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. J Physiol. 2003. 550:785–800.

Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC, Kriegstein AR. Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex. Neuron. 2004. 43: 647-61.

Woodin MA, Ganguly K & Poo MM. Coincident preand postsynaptic activity modifies GABAergic synapses by postsynaptic changes in CI- transporter activity. Neuron. 2003. 39:807-20.

Wurmser AE, Palmer TD, Gage FH. Cellular interactions in the stem cell niche. Science. 2004. 304:1253-55.

Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, Takebayashi H, Nabeshima Y, Kitamura T, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M. Transcription factor expression and Notchdependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. J Neurosci. 2001. 21:9814-23.

Yamasaki EN, Barbosa VD, De Mello FG & Hokoc JN. GABAergic system in the developing mammalian retina: dual sources of GABA at early stages of postnatal development. Int J Dev Neurosci. 1999. 17:201-13.

Young JP, Beckerman J, Vicini S, Myers A. Acetylsalicylic acid enhances purinergic receptor-mediated outward currents in rat megakaryocytes. Am J Physiol Cell Physiol. 2010. 298:C602-10.

Young SZ, Taylor MM, Bordey A. Neurotransmitters couple brain activity to subventricular zone neurogenesis. Eur J Neurosci. 2011. 33:1123-32.

Zardoya R, Meyer A. Complete mitochondrial genome suggests diapsid affinities of turtles. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998. 95:14226-31.

Zimmermann H. Nucleotide signaling in nervous system development. Eur J Physiol. 2006. 452:573-88.

Zupanc GK, Clint SC. Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. Glia. 2003. 43:77-86.

Cytological Organization of the Central Gelatinosa in the Turtle Spinal Cord

OMAR TRUJILLO-CENÓZ,¹ ANABEL FERNÁNDEZ,^{1,2} MILKA RADMILOVICH,³ CECILIA REALI,⁴ AND RAÚL E. RUSSO⁴

¹Neuroanatomía Comparada, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, CP11600 Uruguay

²Facultad de Ciencias, CP11600 Universidad de la República, Montevideo, Uruguay³Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, CP11800 Uruguay

⁴Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, CP1160 Uruguay

ABSTRACT

This paper deals with the cytological organization of the central gelatinosa (CG) in the spinal cord of juvenile (2-12 months) turtles. We found two main cell classes in the CG: one with characteristics of immature neurons, the other identified as radial glia (RG). The cells surrounding the central canal formed radial conglomerates in such a way that the RG lamellae covered the immature neurons. We found three major subpopulations of RG that expressed S-100, glial fibrillary acidic protein, or both proteins. Electron microscopic images showed gap junctions interconnecting RG. As with the mammalian neuroepithelial cells, most CG cells displayed intrinsic polarity expressed by structural and molecular differences between the most apical and basal cell compartments. The apical zone was characterized by the occurrence of a single cilium associated with a conspicuous centrosomal complex. We found a prominent expression of the PCM-1 centrosomal protein concentrated close to the central canal lumen. In the particular case of RG, the peripheral end feet contacted the subpial basement membrane. We also found "transitional cell forms" difficult to classify by the usual imaging approaches. Functional clues obtained by patch-clamp recordings of CG cells defined some of them as already committed to follow the neuronal lineage, whereas others had properties of less mature or migrating cells. The CG appeared as a richly innervated region receiving terminal branches from nerve plexuses expressing γ -aminobutyric acid, serotonin, and glutamate. The results presented here support our previous studies indicating that the CG is an extended neurogenic niche along the spinal cord of turtles. J. Comp. Neurol. 502:291-308, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Indexing terms: turtle; spinal cord; neuroblast; radial glia; cilium; centrosome

The central region of the spinal cord, including the central canal (CC), was termed *central gelatinosa* (CG) by Stilling and Wallach (1824, cited by Lenhossék, 1895) because of its transparency, resulting from the absence of myelinated axons. By using the Golgi procedure, Ramón y Cajal (1909) described in the CG of adult mammals an "extremely dense neuroglial felt" with disordered glial processes surrounding the CC. However, when dealing with the development of the avian cord, he stressed the orderly arrangement of radial fibers stemming out from the "epithelial cells" lining the CC (Ramón y Cajal, 1890a). In nonmammalian species, some of these embryonic features—particularly the occurrence of both immature neurons ("bipolar neuroblasts"; Ramón y Cajal, 1890b,

1909) and radial glia (Sala 1984; Radkie, 2003) (RG)—persist during adulthood (Sala, 1894; Rakic, 2003).

Grant sponsor: National Institutes of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health; Grant number: NS048255; Grant sponsor: PDT-Dinacyt; Grant number: PDT 29/10.

^{*}Correspondence to: Dr. O. Trujillo-Cenóz, Neuroanatomía Comparada, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avda. Italia 3318, Montevideo, CP11600 Uruguay. E-mail: omar@iibce.edu.uy

Received 27 September 2006; Revised 29 November 2006; Accepted 26 December 2006

DOI 10.1002/cne.21306

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

The cells lining the CC in the adult cord derive from the ventral part of the neural tube (Fu et al., 2003) and may retain some of the properties of the embryonic neuroephitelium. In fact, the impressive ability of some anamniotes to repair the spinal cord after severe injury is due to the active proliferation of cells surrounding the CC (Dervan and Roberts, 2003). Even in mammals, there is proliferation of CG cells after spinal cord contusion (Beattie et al., 1997; Horky et al., 2006). Moreover, both molecular and functional evidence suggests that in an experimental model of multiple sclerosis the proliferation of ependymal cells can generate new neurons (Danilov et al., 2006). Therefore, understanding the biology of CG cells is critical to determining the mechanisms involved in the limited repair that takes place in the spinal cord of adult mammals, including man (Ramón y Cajal, 1913).

We have previously reported (Fernández et al., 2002; Radmilovich et al., 2003; Russo et al., 2004) that the CG of young turtles is more complex than could be anticipated from classical histological descriptions. It is indeed, a region populated by proliferating and differentiating cells, with diverse morphological and functional phenotypes. In addition, we have previously shown that cells colocalizing bromodeoxyuridine (BrdU), specific neuronal markers such as the nuclear protein (NeuN) and TOAD/ulip/CRMP (TUC-4), and neurotransmitters such as γ -aminobutyric acid (GABA) and serotonin (5-HT) appeared in the spinal cord 20-50 days after BrdU injection (Fernández et al., 2002). In the present study, we establish morphological, fine structural, molecular, and functional criteria for identification of cell types in the CG of juvenile specimens (2-12 months old) of Emydinae Chelonia (Trachemys dor*bigni odorbignyi*). Two main cell classes were identified: 1) neural cells resembling the "bipolar neuroblasts" of Ramon v Caial (1909) and 2) elongated cells extending from the CC lumen to the spinal cord surface, thus fulfilling the general criteria to be defined as RG (Götz and Barde, 2005). Nevertheless, as suggested by the Golgi and electron microscopic studies, immunocytochemistry confirmed that the RG population is not homogeneous but includes no fewer than two subpopulations of cells. We also found other cells that challenged the usual identification criteria based on morphological clues. In such cases, functional data resulting from patch-clamp recordings in living spinal cord slices shed light on the nature of these "transitional cell forms." Our findings provide additional support for the view that this peculiar spinal cord region shares some of the cytological characteristics of the forebrain sites that maintain neurogenic capabilities after birth (Doetsch et al., 1997; Alvarez-Buylla et al., 2002).

MATERIALS AND METHODS General

Juvenile turtles (*Trachemys dorbigni*, Duméril & Bribon; Achaval and Olmos, 2003; 5–7 cm carapace length) were used following the guidelines of our local Committee for Animal Care and Research (CHEA, UDELAR). The term *juvenile* applies here to animals that ranged in age between 2 months and 1 year. Studies made in close European genera indicate that these chelonians attain sexual maturity 5–10 years after hatching (Guibé, 1970). It has been reported that specimens of the genus *Trachemys* have a span of life ranging from 50–75 years (Dundee and Rossman, 1989). It is important to emphasize that, from the sensory-motor point of view, these juvenile turtles are behaviorally mature animals, indistinguishable from adult specimens. Moreover, previous electrophysiological studies (Reali and Russo, 2005) indicated that the electrophysiological phenotypes found in neurons of juvenile animals are identical to those found in adult turtles (Russo and Hounsgaard, 1996a,b).

The spinal cords of anesthetized turtles (5 mg/kg sodium methohexitone, i.p.; Brietal; Lilly) were fixed by perfusion. For immunocytochemistry (n = 40), we used 10% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) and for transmission electron microscopy (TEM; n = 20) 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M PB (pH 7.4). Most light microscopic studies were performed on vibrating microtome sections (40–60 μ m thick). Golgi-stained cords were processed as described in a previous paper (Fernández et al., 1993). Four properly stained Golgi preparations were reembedded in epoxy resin, thin sectioned (1 μ m thick), and stained with boraxic methylene blue (BMB; see below).

BMB staining and TEM procedures

BMB staining and the TEM studies were performed in postfixed tissues (1% OsO₄ in 0.1 M PB, pH 7.4) that were epoxy resin embedded. For light microscopy, 1-µm-thick sections were cut and dry mounted on slides. The sections were stained with 1% BMB at 80°C for 1 minute and coversliped with epoxy resin as mounting medium. The number and staining characteristics of the cells were assessed as follows: 1) color photomicrographs of the CG were obtained with a high-resolution digital camera (Olympus DP 70) and a $\times 60$ dry objective; 2) two concentric ellipses were overlapped on the image of each photomicrograph marking the limits of two concentric fringes separated 15 μ m and 40 μ m from the CC border; 3) cells lying within each of these fringes were classified according to their staining densities into three categories: light, dark, and medium (for this purpose the Dropper tool of Corel Draw 11 was used); and 4) counts of cells pertaining to each class and fringe were made and stored for further statistical analysis. Counts were made on seven randomly selected sections from three different spinal cords (10 sections from each cord), and density of each cell class within each fringe was calculated (D = number of cells/fringearea).

For TEM studies, serial ultrathin sections were mounted on Formvar-coated slot grids $(2 \times 1 \text{ mm})$ and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Several series of sections (20-200 sections) were examined at different magnifications with a Jeol 100CX electron microscope. Four low-magnification (×3,600) photomontages covering the CC and the surrounding cells were made to facilitate reliable comparisons between light microscopic and TEM images.

Immunocytochemistry

We assayed the following primary antibodies. 1) Mouse monoclonal HuC/D antibody was prepared against a RNAbinding protein originally isolated from humans. The antibody was produced by Dr. MF Marusich (University of Oregon, Eugene, OR) and marketed by Molecular Probes (Eugene, OR; catalog No. A 21271, lot 71C1-1). As reported by Marusich et al. (1994), the antibody binds an epitope present in gene products of all known Hu genes,

CENTRAL GELATINOSA IN THE TURTLE SPINAL CORD

including HuC and HuD. The expression of these products "is restricted to neurons" (Deschênes-Furry et al., 2006), and the specificity of the antibody was tested by immunoblotting, showing that it binds specifically to HuC and HuD proteins extracted from human cortical neurons (bands between 30 and 46 kD; Marusich et al., 1994). We tested the neuronal specificity of the antibody by using indisputable neuronal assemblies like the motoneuron pools of the ventral horns and sensory cells of the dorsal ganglia (test animals: rats, turtles, and fish). Staining appeared uniformly distributed throughout the cell bodies and main dendritic branches, whereas glial cells never appeared stained. The antibody was used at a 1/30 dilution. 2) Rabbit polyclonal glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody was prepared against purified bovine fibrillary acidic protein by Chemicon International (Temecula, CA; catalog No. AB 5804, lot 22010356). Specificity tested by Western blot (WB; Talos et al., 2006) indicated that this antibody largely colocalizes with monoclonal GFAP, whose specificity was, in turn, demonstrated by radioimmunoassay and WB (McLendon et al., 1986). It was tested by us in mammalian and quelonian nervous systems, where it produced a staining pattern comparable to that described by Talos et al. (2006). It was used at a 1/200 dilution. 3) Rabbit anti-S100 polyclonal antibody was prepared against Ca²⁺ binding bovine brain purified S100 protein (gene ID 81778). It was marketed by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; catalog No. S2644, lot 111K4819) and is reported to recognize the brain glial and ependymal cells as well as Schawn cells of the peripheral nervous system. Our preparations reproduced cell patterns similar to those described by Romero-Alemán et al. (2003) in the lizard Gallotia galloti. The antibody was used at a 1/300 dilution. 4) Rabbit anti-GABA polyclonal antibody was prepared against GABA conjugated to bovine serum albumin (BSA) with glutaraldehyde. The product was provided by Immunostar (Hudson, WI; catalog No. 20095, lot 123012). Specificity was evaluated by a competitive inhibition ELISA. A 1,000-fold excess of the following conjugates could not inhibit the antiserum ability to bind GABA: glutamate, aspartate, β -alanine, tyrosine, taurine, glycine, and alanine (technical information provided by the manufacturer). The antibody was tested in the GABAergic marginal nuclei of the spinal cord of turtles (Fernández et al., 1998). It was used at a 1/500 dilution. 5) Rabbit anti-5-HT polyclonal antibody was prepared against 5-HT coupled to BSA with paraformaldehyde. The product was provided by DiaSorin (Immunostar, Stillwater, MN; catalog No. 20080, lot 909605). Crossreactivity was examined with 5 μ g, 10 μ g, and 25 μ g 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindole-3-acetic acid, and dopamine. Negative results were obtained with antisera diluted 1/20,000 (Bn-SA/HRP labeling method; manufacturer's technical information). Specificity was tested preincubating the diluted antiserum with 1.5 mM serotonin. Immunostaining was almost abolished by preincubation with serotonin (Thompson et al., 1994). The antibody was also tested by us in well-known serotoninergic neuronal systems such as the raphe nuclei of turtles and the nerve cord of isopods. The stained neuronal and axons patterns were identical to those described for turtles (Kiehn et al., 1992) and isopods (Thompson et al., 1994). The antibody was used at a 1/500 dilution. 6) Rabbit antiglutamate polyclonal antibody was prepared against a complex formed by glutamate-glutaraldehyde-thyroglobulin by

Chemicon International (catalog No. AB133, lot 19030102). Cross-reactivities were determined in an ELISA test by competition experiments with the following glutamate-G-BSA 1, aspartate-G-BSA compounds: 1/100,000, GABA-G-BSA 1/100,000, glutamate 1/100,000 (manufacturer's technical information). In addition, the antiserum was tested by dot immunoassav against a panel of antigens to establish specificity and potency (Marc et al., 1990). The antibody was used at a 1/200 dilution. 7) Rabbit anti-PCM 1 polyclonal antibody was kindly donated by Dr. A. Merdes (CNRS, Pierre Fabre, France). It was raised against a hexahistidine-tagged fusion protein containing amino acids 1,665-2,024 of human PCM-1. "The antibody specifically recognized a 230-kD band in Hela cell extract, characteristic of full length PCM-1" (Dammermann and Merdes, 2002). It was tested by us in the spinal cords of both mammals and quelonians and also in other ciliated epithelia. Immunoreactivity was coincident with the region in which centrioles and pericentriolar materials were expected to occur. In addition, the distribution pattern of the immunoreactive granules was coincident with that shown by Dammermans and Merdes (2002; Fig. 5). 8) Mouse monoclonal antineuronal nuclei (NeuN; MAB 377) antibody was produced against purified cell nuclei from mouse brain by Chemicon International (Catalog No. MAB377, lot 23040880). Tested via WB of mouse brain, it recognizes two bands corresponding to the 46- and 48-kDa NeuN isoforms (Lind et al., 2005). When tested by us in different tissues, the staining pattern was identical to that first reported by Mullen et al. (1992). It was used at a dilution of 1/200.

Nonspecific reactive sites were blocked with 0.5% BSA in PB (1 hour), followed by overnight incubation with the primary antibody (in PB and 0.3% Triton X-100). After blocking and washing, the tissues were incubated in secondary antibodies conjugated either with horseradish peroxidase (HRP; 1/200; 1 hour in the dark) or different kinds of fluorophores. HRP was visualized by using 3',3'diaminobenzidine or other chromogens. Fluorescent signals were detected by either fluorescence epiillumination microscopy or confocal microscopy (Olympus VF300). The images were imported into Fluoview 5 (Olympus) to generate z-stacks as well as 3-D and orthogonal views and then exported to Photoshop or Corel Draw for cropping and creation of figure montages. Brightness and/or contrast of some photomicrographs were adjusted. Control experiments replacing antibodies with preimmune serum were routinely performed. To quantify the apical-distal distribution of PCM-1 granules, we used the following procedure: 1) 10 confocal optical sections (with an oil immersion $\times 100$ objective, NA 1.3) were obtained from 10 spinal cord sections; 2) three circles $(3 \ \mu m \text{ in diameter})$ were aligned along six evenly spaced radial lines starting at the center of the CC; 3) the PCM-1-positive particles included in each circle were automatically counted with the aid of Image Pro 5.1 software and stored for further statistical analysis (see below and Fig. 8). We also explored the distribution of HuC/D cells and NeuN-reactive cells in different levels of the cord from cervical to lumbar segments. The particularly long cervical segment was divided in two portions (C1-C2), each of which was processed independently. The tissues were reacted with the corresponding antibodies, and 10 photomicrograhs were taken from serial vibratome sections. The profiles of the reactive cells contacting the CC were transferred to transparent plastic sheets and superimposed to gain information about cell distribution along the Z axis. The same procedure was used to explore the distribution of the NeuN-reactive cells, adding the profile of the CC as a landmark.

Slice preparation and electrophysiological procedures

Anesthetized turtles were decapitated, and the blood was removed by intraventricular perfusion with Ringer solution (6°C). The cervical enlargement was dissected out, and transverse 300-µm-thick slices were cut, placed in a chamber (1 ml volume), and superfused (1 ml minute⁻¹) with Ringer solution of the following composition (in mM): NaCl, 96.5; KCl, 2.6; NaHCO₃, 31.5; CaCl₂, 4; MgCl₂, 2; and glucose 10. The solution was saturated with 5% CO₂ and 95% O₂ (pH 7.6). All experiments were performed at room temperature. Cells were visualized with differential interference contrast (DIC) optics (Leica DM LFS). Patch-clamp whole-cell recordings were obtained with electrodes filled with (in mM): K-gluconate, 122; Na₂-ATP, 5; MgCl₂, 2.5; CaCl₂, 0.0003 EGTA, 1; Mg-gluconate, 5.6; K-HEPES, 5; H-HEPES, 5; and biocytin, 10; pH 7.4; 5–10 M Ω . Current-clamp recordings were performed with an Axoclamp 2B (Axon Instruments, Burlingame, CA) driven by a programmable stimulator (Master-8; AMPI). Liquid junction potentials were determined and corrected (Barry and Diamond, 1970).

Statistical analysis

Samples were chosen at random to avoid subjective bias. For example, sections were numbered and further selected for counting by a program that generates digits stochastically. Results were analyzed by using the nonparametric Wilcoxon matched-pairs test. Differences were considered statistically significant at P < 0.05.

RESULTS

Bipolar neuroblast-like cells and RG coexist in the CG

The CG of young turtles is a region with a complex cytological organization, including the CC and a compact mantle of small cells. To facilitate identification of the various cell types in differently processed preparations, the CG was partitioned into concentric reference fringes as described above.

The use of BMB allowed us to distinguish light (L), medium (M), and dark (D) stained cells in the CG (Fig. 1A). Quantitative studies revealed statistically significant differences in densities between L and M cells lying within fringe 1 when compared with the same kinds of cells lying within fringe 2. Densities of both cell types were higher close to the CC. However, nonsignificant differences were observed when comparing the distribution of D cells. We considered, based on other technical approaches (see below), that the population of L cells lying close to the CC consisted of differentiating neurons, whereas those found in the mantle might correspond to more mature nerve cells. Most M and D cells were tentatively recognized as RG. We have also found some extremely dense cells that might be in final apoptotic stages.

Golgi-stained tissues provided information for a basic classification of cell phenotypes. We found that radiating

O. TRUJILLO-CENÓZ ET AL.

bipolar cells of various sizes and shapes predominated around the CC. Figure 1B shows camera lucida drawings of distinctive cell phenotypes collected from more than 100 properly stained sections. These cells resemble those described by classical authors in the spinal cord of vertebrate embryos (Ramón y Cajal, 1890a,b; Lenhossék, 1895). It is worth noting that cell bodies with apical projections contacting the cerebrospinal fluid occurred at variable distances from the canal lumen. Cells resembling immature neurons or putative neuroblasts (Nb) predominated within fringe 1 (Fig. 1B,C, arrow), whereas unipolar cells lacking extended prolongations were less abundant. The cell bodies of another cell class that can be grouped under the general term RG (e.g., bipolar cell bodies and processes extending from the CC lumen to the subpial surface) occurred within and beyond the reference fringes (Fig. 1B-E). Close inspection of well-impregnated sections revealed that RG do not constitute a homogeneous cell class. There is a distinct cell group located along the dorsomedial portion of the CG, with their cell bodies lying within fringe 2, that extended their tightly packed and poorly branched processes into the medial septum. They differed from a second RG subpopulation lying in the lateral portions of the mantle and giving rise to conspicuous bilateral bundles of processes projecting to the ventral-lateral zones of the cord. This latter group of cells was difficult to impregnate with the silver salts but appeared clearly stained when using appropriate immunocytochemical techniques (S-100 antibody; see Fig. 6D). Finally, there is a third, less compact group of RG occupying the most ventral regions of the CG that projected their arched processes to the medial sulcus (Fig. 1E, right inset). Independently of their location, all kinds of RG terminated by means of conical end-feet on the basal lamina covering the cord (Fig. 1E, left inset). In addition to the collateral branches and lamellae usually stemming from the peripheral prolongations, we also found cells with processes arising from the apical segments contacting the CC (Fig. 1D). It should be stressed that the CG also contained cells that were difficult to identify based on morphological grounds. These "transitional cell forms," sharing morphological features of both immature neurons and RG, were present at various distances from the CC (Fig. 1B,C, arrowheads). As a first approach to characterizing further the cells lying around the CC, we selected four Golgi-impregnated sections containing isolated, easily recognizable cells. These sections were reembedded, thin sectioned (1 μ m thick), and BMB stained (Fig. 1F and inset). Cells that in the Golgi preparations exhibited the phenotype of Nbs after BMB staining revealed light, homogeneously stained nuclei surrounded by a dark precipitate of silver salts. We found that, when similar procedures were applied to cells with RG morphology, they showed darker nuclei, with coarse chromatin masses (not shown).

Fine structure of CG cells

To analyze the cytoarchitechture of the region around the CC, low-power contiguous electron micrographs were assembled into photomontages to cover extended areas of the CG. Bottle-like cells with rounded nuclei and a light cytoplasm commonly occurred close to the CC (Fig. 2A). These cells were connected to the CC lumen by a singleciliated apical prolongation. Uneven cisternae of endoplasmic reticulum occurred in the cytoplasm intermingled

The Journal of Comparative Neurology. DOI 10.1002/cne

CENTRAL GELATINOSA IN THE TURTLE SPINAL CORD



295

O. TRUJILLO-CENÓZ ET AL.

with mitochondria and free ribosomes, but typical Nissl bodies were absent. However, the TEM images revealed that these cells received synaptic contacts (Fig. 2A, main panel and upper inset; see also Fernández et al., 2002; Russo et al., 2004). Taking into account their location, general morphology, and fine structure organization and the presence of synaptic contacts, they were identified with the L cells shown in BMB-stained sections and the putative Nbs revealed by the Golgi procedure.

The electron micrographs also showed other cells with a denser cytoplasmic matrix and elongated nuclei containing coarse chromatin masses (Fig. 2B). Serial section studies indicated that they were bipolar cells giving rise to lateral appendages and varicose long processes. Lateral lamellae originating from these cells enveloped the cell bodies and the apical segments of putative Nbs. As with the latter, they also bore short microvilli and a single cilium. In properly perfused specimens, glycogen granules were found forming distinct masses scattered in the cytoplasm (Fig. 2B, inset) intermixed with bundles of 10-nmdiameter microfilaments (see inset in Fig. 5B2). The presence of glycogen granules in astrocytes and RG is considered a distinctive feature separating both cell types from embryonic neuroepithelial cells (Götz and Barde, 2005). However, both embryonic neuroepithelial cells and RG are highly polarized along their apical-basal axis, a feature considered to be involved in determining the fate of daughter cells after division (Chenn et al., 1998; Götz and Huttner, 2005). The polarity was explored in detail, and our study revealed that the apical portions of the cells contacting the CC were characterized by the following distinctive features: 1) the presence of a single cilium, 2) the association of cilia with large centrosome complexes, and 3) membrane specializations with the characteristics of zonula adherens and gap junctions.

Because the occurrence of astroglia or RG projecting a single cilium into the cerebrospinal fluid has been proposed as one of the cytological features characterizing neural precursor cells in the central nervous system (CNS; Alvarez-Buylla et al., 2001, 2002), we investigated whether single-ciliated RG occurred in the CG. For this purpose, several cilia were followed serially (20-40 ultrathin cross-sections) from their free shafts in the CC lumen to their insertion sites in the parent cells. Our results indicated that most cells bore a single cilium with a typical 9 + 2 microtubule organization (Fig. 2C–E). Notice, however, that, if the section plane intersected the proximal portion of the cilium (lacking the two central microtubules), a 9 + 0 organization became apparent (Fig. 2C, lower inset). The majority of cells lining the CC bore a single cilium, and only 20% of the population was multiciliated. The latter were tentatively classified as ependymocytes (Fig. 2F).

The second organelle typical of the apical segments of the cells lining the CC is the cilium-associated centrosome complex. In both Nbs and RG, a centrosomal complex consisting of a pair of centrioles embedded in a matrix of filaments and electron-dense granules was observed at the base of each cilium (for review see Doxsey, 2001). The spatial arrangement of these components in RG was studied by using serial sectioning techniques (Fig. 3A–F). The study revealed differences between RG and Nbs difficult to detect when exploring random sections. Centrosomal complexes of RG lacked the striated rootlets that commonly occur in Nbs (Fig. 2A, lower inset). Similar structures were also described in neurons contacting the cerebrospinal fluid in the fish (Roberts et al., 1995).

Based on the study of sequential electron micrographs, we attempted the 3-D reconstruction of one Nb and two neighboring RG (Fig. 4A). The resulting representation illustrates the richness and distribution of gap junctions. The included electron micrographs show how the RG lamellae enveloped the apical portions of the Nbs (Fig. 4B). Light microscopic studies also indicated that neuroblasts were surrounded by RG (Fig. 4B, inset). The region near the CC lumen is particularly rich in membrane specializations showing the pentalaminar organization typical of the gap junctions (Fig. 4C).

Another anatomical feature proposed to be related to the maintenance and differentiation of the neural precursors is their proximity to basal laminae and blood vessels (Alvarez-Buylla and Lim, 2004). To investigate the relationships between RG and the basal lamina covering the cord surface, we performed a discontinuous, four-level, serial sectioning study covering the whole extension of several RG whose processes were contained in the dorsal medial septum (see cartoon illustrating the explored levels, Fig. 5A). Our findings confirmed that the conical feet of RG terminate apposed to the inner face of the basal lamina covering the cord surface. Concomitantly, the outer face of the basal lamina was partially covered by a discontinuous layer of flattened fibroblasts, endothelial cells, and macrophages. Occasionally, the plasma membrane of an end-foot was indented, with the cytoplasmic side of the microinfold covered with electron-dense material (Fig. 5B1, inset). The TEM images were similar to those usually associated with the endocytotic uptake of extracellular substances in various kinds of cells (Alberts et al., 1994). Cross-sections through deeper levels of the dorsal septum showed two types of RG processes with dissimilar subcellular organization. The majority contained numerous microfilaments (10 nm diameter), vacuolae of uneven sizes and shapes, glycogen granules, and mitochondria. Mixed with them there were less numerous

Fig. 1. A: Boraxic methylene blue (BMB)-stained section passing through the central gelatinosa (CG). A compact mass of light-, medium-, and dark-stained cells surrounds the central canal (CC). The light cell (an immature neuron or neuroblast; Nb) indicated by an asterisk in the main panel is shown enlarged in the inset. B: Cameralucida drawings of different cell phenotypes surrounding the CC (Golgi procedure). Some of the bipolar cells close to the CC lumen have the aspect of Nbs, whereas others, laying peripherally, exhibit the aspect of radial glia (RG). The arrowhead points a cell with ambiguous morphology. C: Photomicrograph of a bipolar Nb (arrow) with a thick process contacting the CC lumen and a thinner peripheral prolongation extending into the CG. Note the presence of another cell (arrowhead) difficult to classify on purely morphological grounds. D: Golgistained bipolar cell within the outer fringe. Note the lateral process arising from the apical segment (arrow). E: RG (arrow) belonging to the ventral-medial group. The inset on the left shows a typical RG foot (arrow) ending at the subpial surface (dotted line). The right inset shows, at a higher magnification, an RG of the ventral medial group (arrow). VF, ventral funiculus. F: Golgi-impregnated cell (inset) that was thin sectioned and stained with BMB. It can be identified in the main panel by the dark granules of silver chromate. The asterisk indicates its lightly stained nucleus that contrasts with the smaller, darkly stained nuclei of other nonimpregnated cells indicated by the paired arrows; 1 and 2 indicate inner and outer fringes respectively. Scale bars = $15 \mu m$ in A,C,D, right inset in E; $7 \mu m$ in inset in A; 30 μ m in B; 40 μ m in E; 5 μ m in left inset in E; 10 μ m in F.


Fig. 2. A: Electron micrograph of a neuroblast (Nb) contacting the central canal (CC) lumen. Note the presence of a cilium projecting toward the CC (arrow) and a synaptic knob contacting the rounded pole of the cell (encircled). This synapse is shown at a higher magnification in the left **inset**. The cilium originates from a centrosomal complex that, in the case of immature neurons, gives rise to one or two striated rootlets traveling along the apical process (arrow, right **inset**). C1-C2 perpendicularly oriented centrioles. **B**: Bipolar cells with a dense cytoplasmic matrix and elongated nuclei with chromatin masses (1-3). Electron-dense glycogen granules can be seen scattered in the cytoplasm or forming large conglomerates (arrows in the **inset**). Their general morphology and fine structure support their identification as members of the radial glia (RG) family. **C,D**: The free shafts of

seven cilia were serially sectioned and followed to their insertions in the parent cells (see D). The high-magnification picture shown in the right **inset** in C shows that the cilia have the typical 9 + 2 organization. Note however that, if the plane of section passes at the level indicated by the dotted line in the left **inset**, a 9 + 0 configuration might become apparent. **E:** Superposition of seven profiles from a series of 30 sections passing through cells 2 and 5. The corresponding cilia appear in black. **F:** Electron micrograph showing a section passing through a multiciliated cell (20% of the total). Scale bars = 3 µm in A; 0.5 µm in left inset in A; 0.2 µm in right inset in A, insets in C; 4 µm in B; 1 µm in C–E; 0.4 µm in F. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

O. TRUJILLO-CENÓZ ET AL.



Fig. 3. **A-F:** Six serial electron micrographs covering the full extension of the centrosome complex. The complex consists of two perpendicularly oriented centrioles (C1-C2, in A–F), tubule aggregates (asterisks, A–E) and electron-dense granules of variable size (arrows,

C–F). Note that, despite the series covering the whole extent of the centrosome complex, rootlets are not present. ZA, zonula adherens. Scale bar = 0.2 $\mu m.$

processes with few microfilaments but also exhibiting numerous vacuolae (Fig. 5B2). At still deeper levels, the layer of the parent cell bodies with their nuclei containing

coarse chromatin masses was found, but cell differences were not apparent at this level (Fig. 5B3). Sections passing through the apical segments near the CC revealed the

CENTRAL GELATINOSA IN THE TURTLE SPINAL CORD



Fig. 4. A: Schematic three-dimensional representation of the spatial arrangement of neuroblasts (Nb) and radial glia (RG) surrounding the central canal (CC). The dotted line indicates, approximately, the level of the cross-section shown in B. The oval profiles indicate gap junctions connecting neighboring RG, and the arrow points to a nerve terminal contacting the Nb. B: Cross-section passing through the apical segment of an Nb surrounded by RG appendages. One of the centroles of the centrosomal complex appears surrounded (arrow) by three dense centrosomal granules (asterisks). The arrowheads indi-

cate gap junctions that are abundant at this level. The **inset** shows a photomicrograph of a cross-section passing through the cell body of a neuroblast (dotted line) surrounded by numerous dark nuclei of RG. C: High-magnification electron micrograph of a gap junction connecting adjacent RG lamellae. The characteristic pentalaminar organization of this kind of junction is particularly evident in the zone indicated by the opposed arrows. Scale bars = 0.5 μ m in B; 7 μ m in inset; 30 nm in C. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

presence of zonulae adherens and, as already described, the insertion of a single cilium in each cell (Fig. 5B4). These findings were confirmed by the study of sections oriented parallel to the main axis of the processes (Fig. 5C). The typical pentalaminar structure characterizing gap junctions was also observed connecting adjacent RG processes within the dorsal septum (Fig. 5C, inset).

Finally, it should be mentioned that, when working with TEM images, it is usual to find cell profiles difficult to classify either as RG or Nbs. This can be due to the disadvantages resulting from viewing an extremely thin sample of the whole cell or because one is exploring a "transitional cell form." The obvious option of attempting 3D reconstructions, confront the dilemma of "the size of n" (discussed by Berman and Martin, 1990).

Molecular markers confirm cell diversity

We assayed antibodies for detecting different cellspecific proteins and various neuroactive substances. Five types of proteins were found expressed in cells surrounding the CC: 1) the RNA-binding Hu proteins of the Elav gene family that are early expressed in cells committed to become neurons (Kim et al., 1996); 2) the S-100 subfamily of calcium-binding proteins mainly expressed in ependymal or glial cells (Schäfer and Heizmann, 1996; Romero-Alemán et al., 2003); 3) the NeuN expressed in fully dif-





Fig. 5. A: Schematic representation of the dorsal-medial septum and its constituent radial glia (RG) cells. This zone was cut at four levels (1-4) to study the fine structure of the cells from the peripheral subpial feet to the apical segments contacting the cerebrospinal fluid. B1: The conical end feet terminate on a thin basement membrane covering the cord. The external surface of the basement membrane is in turn covered by a discontinuous layer of fibroblasts (F), endothelial cells, and macrophages. The **inset** shows one of the minute membrane folds (arrow) occasionally found in RG feet. Note the layer of electrondense material covering the cytoplasmic side of the membrane fold. B2: Cross-section showing two kinds of RG processes: a majority containing abundant fibrils and a minority in which fibrils are rare or absent (asterisk). Note the presence of uneven vacuolae (arrow) and mitochondria. The inset shows a bundle of RG fibrils at a higher magnification. **B3:** Electron micrograph showing the nuclei of RG projecting their processes to the dorsal-medial septum. Cell differences are not evident at this level. **B4:** Each RG contributing to the formation of the dorsal-medial septum bears a single cilium (arrow). **C:** Longitudinal section confirmed the existence of two kinds of RG processes: one containing abundant fibrils the other lacking them. The **inset** shows that gap junctions (arrows) are also present in this region. The asterisks indicate vacuoles. Scale bars = 0.5 µm in B1,B2,B4,C; 0.25 µm in in B1; 100 nm in inset in B2; 2 µm in B3; 20 nm in inset in C. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

CENTRAL GELATINOSA IN THE TURTLE SPINAL CORD

ferentiated neurons (Mullen et al., 1992); 4) the GFAP found in glial cells, including some kinds of RG (for review see Rakic, 2003); and 5) the PCM-1 protein that localizes to cytoplasmic granules known as *centriolar satellites* (Balczon et al., 1994; Kubo et al., 1999).

 HuC/D^+ cells formed a crown around the CC, leaving unstained spaces occupied by other cells that do not express the Hu protein (Fig. 6A). Since HuC/D is a ribosomeassociated protein expressed only in neurons, it is reasonable to assume that the positive cells correspond to Nbs. On the other hand, the expression of the S-100 protein was useful to identify a second population of cells (Fig. 6B). As confirmed by our double-labeling experiments the HuC/D⁺ and S-100⁺ cells were intimately associated, representing the bulk of the cell assembly concentrated around the CC (Fig. 6A-C). Taking into account their general morphology, the long processes reaching the subpial surface (Fig. 6D) and their close association with the HuC/D^+ cells, S-100⁺ cells were identified with members of the RG family. It is worth noting that the distribution of HuC/D^+ cells was not the same along the spinal cord. There was a higher density of cells in the particularly long cervical portion of the cord termed C2 (Fig. 6E). Contrasting with the numerous HuC/D⁺ cells, more mature NeuNreactive cells were scarce around the CC. As with HuC/D⁺ cells, their number and distribution showed variations along the cord (Fig. 6E,F).

As expected from the electron micrographs in which glial microfilaments were frequently found, immunocytochemistry revealed the existence of cells expressing GFAP. They predominated in the roof of the CC, and their processes projected to the dorsal medial septum (Fig. 7A). Double-labeling experiments also indicated the occurrence of few cells expressing both S-100 and GFAP (Fig. 7B–D). After the exploration of 18 sections (60 μ m thick), each of which was sampled at three levels along the z axis, in total 14 double-labeled cells were found. Two kinds of RG processes were found in the dorsal-medial septum. As shown in Figure 7E, there are numerous RG processes reacting positively with GFAP and fewer processes reacting against S-100.

Transitional cell types: morphology and electrophysiology

As already mentioned, in Golgi preparations, we have frequently found cells that were difficult to group as Nbs, RG, or mature neurons. They were termed here "transitional cell forms" because there was an apparent mismatch between their morphology and their functional properties (i.e., a cell with the location and morphology of a Nb, without the ability to generate spikes). Figure 8 shows a recorded and biocytin-injected cell with a long apical segment and the perikaryum distant from the CC lumen (Fig. 8A1). The ability to generate repetitive action potentials (Fig. 8A2) provided conclusive evidence of its neuronal identity despite its peripheral location in the cell assembly and the persisting connection with the CC. Note the conspicuous excitatory postsynaptic potentials (EP-SPs; Fig. 8A3, upper trace) observed in this cell. Other "transitional cell forms" with the ability to generate spikes also displayed inhibitory synaptic potentials (IPSPs; Fig. 8A3, arrows in lower trace). A different situation is illustrated in Figure 8B. In this case, the cell body was located near the CC bearing two well-developed processes, as could be expected from a more mature "multipolar neuroblast" (Fig. 8B1). Nevertheless, the cell was unable to generate action potentials, suggesting a nonneuronal nature. Instead, this cell showed a high input resistance and delayed outward rectification (Fig. 8B2,B3). The recorded "transitional cell forms" had membrane potentials $(-64.1 \pm 4.05 \text{ mV}; n = 17)$ that were less negative and input resistances $(3.9 \pm 0.77 \text{ G}\Omega; n = 19)$ much higher than those usually found in typical glial cells (about -86 mV and 300 M Ω respectively; see Russo et al., 2004).

Distribution of the centrosomal protein PCM-1 in cells surrounding the CC

Taking into account that the CG is a proliferation zone (Fernández et al., 2002; Radmilovich et al., 2003), we explored whether proteins involved in the organization of the mitotic apparatus were present in this region. Indeed, immunostaining techniques revealed the outstanding expression of the pericentrosomal protein PCM-1 in the apical pole of CG cells (Fig. 9A-C). This protein is reported to localize to small granules in the cytoplasm of interphase cells (Balczon et al., 1994; Kubo et al., 1999). Doublelabeling experiments involving detection of PCM-1 and S-100 (Fig. 9A) or PCM-1 and HuC/D (Fig. 9B) revealed that PCM-1 was present in both cell types. As expected from the TEM studies, the concentration of PCM-1 granules was higher in the apical cell segments close to the CC (Fig. 9C). Interestingly, PCM-1 was undetected in neurons of the dorsal or ventral horns.

Three nerve plexuses expressing 5-HT, GABA, and glutamate innervate the CG

Several neurotransmitters have been postulated as members of signaling systems regulating cell proliferation and fate (Cameron et al., 1998; Nguyen et al., 2001), so we explored the expression of some of these molecules in the CG. As reported for fish (Roberts et al., 1995) and turtles (Fernández et al., 2002), there are dopaminergic and GABAergic nerve cells contacting the cerebrospinal fluid along the CC of the spinal cord. We are reporting now the presence of three independent but overlapping nerve plexuses innervating the CG cells. The 5-HT antibody stained numerous preterminal and terminal axon branches invading the CG. Double-labeling experiments revealed that some of these axon branches formed "en passant boutons" contacting HuC/D⁺ cells (Fig. 10A). Together with and resembling the 5HT terminals, there were also GABAergic (Fig. 10B) and glutamatergic (Fig. 10C) axonal branches and synaptic knobs. Electrophysiological recordings showed that at least some of these synaptic terminals were functional, generating typical EPSPs and IPSPs (Fig. 8A; see also Russo et al., 2004).

DISCUSSION

Our results show that the CG contains a variety of cellular phenotypes, including different types of RG and neuroblasts. Some of the findings presented here are coincident with cytological details described for neurogenic niches of birds and mammals (Doetsch et al., 1997, Alvarez-Buylla et al., 2002; Alvarez-Buylla and Lim, 2004). These cytological similarities support our hypothesis that the CG in the turtle is an extended niche of proliferating cells giving rise to both neurons and glia after birth (Fernández et al., 2002; Russo et al., 2004). 302

O. TRUJILLO-CENÓZ ET AL.



Fig. 6. Double-labeling experiments with HuC/D and S-100 antibodies revealed the occurrence of two main cell classes around the central canal (CC). A-C: HuC/D⁺ cells surround the CC together with more abundant S-100⁺ cells. Single confocal optical sections. **D**: Low-magnification photomicrograph that shows the peripheral processes of a subpopulation of radial glia reactive to S-100 projecting to the lateral-ventral surface of the spinal cord (arrows). **E**: Distribution of HuC/D⁺ cells (left column) and NeuN⁺ cells (right column) at cervical (C1-C2), thoracic (T), and lumbar (L) segments. Superposition of 10







sections at each level. Note that NeuN⁺ cells occurred only in the peripheral zones of the CG. The arrows at right indicate the profiles of the CC. **F:** Photomicrograph of two nuclei expressing the NeuN protein in the most outer zone of the cell mantle (arrows). Combination of DIC and epifluorescence illumination. Scale bars = 10 μ m in C (applies to A–C); 100 μ m in D; 50 μ m in E; 15 μ m in F. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www. interscience.wiley.com.]

CENTRAL GELATINOSA IN THE TURTLE SPINAL CORD



Fig. 7. A: Double-labeling experiment (S-100 + GFAP) showing abundant GFAP⁺ processes intermixed with the S-100⁺ cells. The dark spaces (asterisks) are occupied by cells that do not react with the antibodies (most probably HuC/D⁺ cells). **B–D:** Confocal images showing cells contacting the central canal (CC) that expressed both S-100 and GFAP. This is confirmed by the orthogonal projections generated across the x and y axes. **E:** Ten stacked confocal optical sections showing the presence of S-100- and GFAP-reactive processes in the dorsal septum (encompassed by a circle). Conventional view along the z axis (main panel) and additional orthogonal views (x and y axes, small panels).Scale bars = 10 μ m in A; 5 μ m in D (applies to B–D); 5 μ m in E. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www. interscience.wiley.com.]

The main findings to be discussed here are that 1) two main cell classes coexisted in the CG, one exhibiting characteristics of immature neurons whereas the other could be ascribed to the RG cell family; 2) both kinds of cells were arranged forming conglomerates in such a way that RG appendages envelope the neuroblasts; 3) intermixed with well-defined cell classes were "transitional cell forms" difficult to classify by morphological approaches; 4) the RG population was not homogeneous, comprising no fewer than three major cell subpopulations expressing S-100, GFAP, or both proteins; 5) adjoining RG were interconnected by gap junctions, which predominated close to the CC but were also present in the peripheral processes; 6) RG were single-ciliated cells with end-feet contacting the subpial basal lamina; 7) the centrosomecomplex protein PCM-1 had an outstanding expression in the apical portions of the cells lining the CC; and 8) the cell assembly surrounding the CC was richly innervated by serotonergic, GABAergic, and glutamatergic axon terminals.

Cell diversity in the CG: Nbs and RG

There is little doubt that the Golgi method is a reliable tool for depicting fine morphological details of different kinds of neural cells. Nevertheless, this technique stains cells randomly, and the resulting opaque precipitate of silver salts hinders further application of common cytological stains. Therefore, cell identification has to be supported exclusively on morphological and topological clues. Such limitations become critical when dealing with dividing, migrating, and differentiating cells in which transitional forms are expected to occur. However, when results from various technical approaches are compared and analyzed together, doubts about the neuronal nature of the cells identified as Nbs tend to vanish. Four main lines of evidence confirmed that we dealt with cells already committed to follow a neuronal differentiation pathway: 1) TEM images conclusively demonstrated the existence of synaptic knobs impinging on both the cell bodies and the processes of the Nbs; 2) Nbs expressed the HuC/D protein considered an early molecular marker of neuronal differentiation (Marusich and Weston, 1992; Yao et al., 1993; Good, 1995); 3) conversely, Nbs do not express the NeuN protein, whose high expression might correlate not only with withdrawal from the cell cycle but with the acquisition of new functional properties (Mullen et al., 1992); and 4) Nbs are able to generate Na⁺-mediated action potentials (Russo et al., 2004).

The identification problems posed by the cells described under the general term radial glia are more difficult and not yet completely solved. As stated by Rakic (2003) in his studies on early developmental stages of the cerebral cortex, the Golgi method could not provide distinction between RG and postmitotic neurons. The same uncertainties apply to the CG. Moreover, as recognized by Ramón y Cajal (1890a), the population of "epithelial cells" extending from the canal lumen to the subpial surface is not homogeneous. He recognized two dorsal and ventral distinct groups of cells with tightly packed peripheral processes, and lateral cells giving origin to loosely arranged processes spaced evenly through the nervous parenchyma. According to Morest and Silver (2003), the RG in the dorsal region of the CG are specialized cells tagging the midline of the roof of the primitive neural tube. Further distinction between cells of the RG family was supported



Fig. 8. Transitional cell forms. A: Biocytin-filled cell with a thin process entering the parenchyma (arrow) and a long apical prolongation stemming from the cell perikaryum located in the outer fringe (1). This cell generated action potentials in response to a depolarizing current pulse (2) and had spontaneous excitatory synaptic potentials (3, upper trace). The lower trace in 3 shows the spontaneous activity of another transitional cell that received both excitatory and inhibitory postsynaptic potentials (arrows). **B:** Cell with its body within the

outer fringe having a long apical segment and two dendrite-like processes projecting to the gray matter (1). The cell had a single cilium protruding into the central canal lumen (**inset**). This cell had an outward rectification in response to depolarizing current pulses (2). The current-voltage relationship is shown in 3. Scale bars = 5 μ m in A,B; 2 μ m in inset. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

by both TEM and immunocytochemical assays. We found two subclasses of RG: 1) RG with their radial processes containing numerous microfilaments and 2) RG with few or no microfilaments. Similarly, the immunocytochemical approach also indicated the existence of two main kinds of RG: one kind expressing S-100 protein and the other expressing GFAP. Classification problems are still more complicated, because there were RG that expressed both S-100 and GFAP. This suggests that the term RG encompasses a dynamic cell population that may change their morphological and molecular phenotypes in response to intrinsic or environmental cues.

Our results show that Nbs and RG are intimately associated, with RG lamellae surrounding individual Nbs. This cytoarchitectural organization could be the anatomical substrate subserving the complex signaling proposed between differentiating neurons and RG (Campbell, 2003).

Cell diversity in the CG: "transitional cell forms"

If the CG is a region where gliogenesis and neurogenesis take place, the presence of transitional forms of cells is to be expected. Indeed, our studies showed that there are circumstances in which microscopic images were unable to provide conclusive information about the neuronal or glial nature of some CG cells. Functional clues were thus fundamental to clarify the nature or maturation stage of such transitional cell types. Some transitional cell forms belonged undisputedly to the neuronal lineage, in that they were able to fire action potentials and received functional synaptic contacts. Another group of transitional cells had functional properties that were more difficult to attribute to a defined cell type. The fact that they were unable to generate spikes suggests that they were not neuroblasts, even though they had high input resistances and an outward rectification when depolarized from rest. We have previously shown that the delayed rectification is blocked by tetraethyl-ammonium and is thus mediated by voltagegated K^+ channels (Russo et al., 2004). Since these K^+ channels are thought to be important for mediating changes in cell volume during migration through the nervous parenchyma (Hendriks et al., 1999), this functional phenotype may correspond to migrating cells. Another possibility is that some nonspiking CG cells could be very early neuroblasts that have not yet developed the ability to sustain spike firing but do express some K⁺ channels. It is important in future studies to combine electrophysiological recordings and single-cell labeling with analysis of the expression of various cell-specific molecules to further our knowledge on the transitional cell forms.

Polarity of CG cells

As the embryonic neuroepithelial cells of mammals (Chenn et al., 1998; Götz and Huttner, 2005), RG and Nbs in the spinal cord of the turtle are structurally and molec-

The Journal of Comparative Neurology. DOI 10.1002/cne

CENTRAL GELATINOSA IN THE TURTLE SPINAL CORD



Fig. 9. A: Double-labeling experiment (S-100 + PCM-1) shows PCM-1 granules on the apical segments of S-100⁺ cells (stack of 10 confocal optical sections). The asterisks indicate cells nonreactive to S-100 antibody (presumably HuC/D⁺ cells). The **inset** is a confocal optical section. **B:** Double-labeling experiment (HuC/D + PCM-1) showing the PCM-1-reactive granules in HuC/D⁺ cells. **C:** Plot showing the apical-distal distribution of the PCM-1 reactive granules in the cells surrounding the central canal (10 μ m from the lumen). The granules were automatically counted in 10 confocal optical sections from 10 spinal cord sections. The results are shown as mean ± SE. Scale bars = 10 μ m in A; 5 μ m in B; 1 μ m in inset. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www. interscience.wiley.com.]

ularly polarized along their apical-basal axis. One of the prominent features of this polarity is the presence of a single cilium protruding into the CC lumen. Polarity is also apparent when considering the location of the centrosomal complexes and the distribution of the pericentriolar protein PCM-1. The occurrences of zonnula adherens and gap junctions (which are particularly numerous in the apical segment of CG cells) are also evidence of this intrinsic polarity. Another aspect that has to be taken into account is the environmental difference between the apical and the distal cell poles. In the case of RG, their peripheral poles establish a close association with the basement membrane and the apposed mesoblastic tissues covering the spinal cord. This is an important issue, because it has been proposed that, during development and regeneration, maintenance of progenitor cells seems to be contingent on their proximity to a basal lamina (Mercier et al., 2002) and endothelial cells (Wurmser et al., 2004; see below). Intrinsic polarity and, particularly, the potential inheritance of proteins selectively localized in the apical portions of the cells seem to be important to determine the fate of the dividing cells as it occurs in the embryonic neuroepithelium (Götz and Huttner, 2005).



Fig. 10. A: Double-labeling experiment in which the 5-HT⁺ terminals can be seen contacting HuC/D⁺ cells (arrowhead) around the central canal. Confocal optical section. B: Photomicrograph of a section triple-labeled with HuC/D, anti-GABA, and DAPI. Note the presence of GABA-reactive terminals (arrows) impinging on HuC/D⁺ cells. Epifluorescence microscopy. C: Abundant axon terminals expressing glutamate are also present within the central gelatinosa. Scale bars = 10 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

Nbs also had highly specialized apical ends, as suggested by the complexity of centrosomes with associated striated rootlets. In postmitotic cells such as immature neurons, several lines of evidence place this organelle and its associated proteins at different steps in the process of neuronal migration and axonal targeting (Hatten, 2002; Tsai

O. TRUJILLO-CENÓZ ET AL.

and Gleeson, 2005). Another remarkable feature of the apical end of Nbs is that they also bear a single cilium. It has been proposed that the signal mechanisms associated with the cilium are preserved for postmitotic needs and may influence differentiation and maturation of cells (Fuchs and Schwark, 2004).

Another novel aspect of the axial polarity is the existence of a high concentration of PCM-1 protein close to the CC in both RG and Nbs. In this report, we provided the first evidence of the existence of this 228-kD protein (Dammermann and Merdes, 2002) in the CNS of turtles. Dammermann and Merdes (2002) proposed that PCM-1 facilitates transport of other centrosomal proteins and its presence might be particularly important for the duplication of centrosomes during the cell cycle.

RG as putative progenitor cells in the spinal cord

We have shown here that RG have several fine structural and molecular characteristics that make them reasonable candidates to be progenitor cells. First, our serial sectioning studies showed that RG bear a single cilium, a feature that is regarded as a hallmark of cells with the ability to proliferate in brain neurogenic regions, both during development (Sotelo and Trujillo-Cenóz, 1958) and after birth (Alvarez-Buylla et al., 2001). It has been speculated that this cilium could be a sensory organ detecting signals that regulate proliferation (Fuchs and Schwark, 2004). Second, as precursor cells in the embryonic cortex (Bittman et al., 1997; Noctor et al., 2001), RG in the CG are interconnected by gap junctions forming clusters of electrically and metabolically coupled cells (Russo et al., 2004). Gap junction coupling is thought to be very important for regulating cell proliferation and differentiation during neurogenesis in the embryo (Lo Turco and Kriegstein, 1991; Bittman et al., 1997; Montoro and Yuste, 2004). We provided evidence that gap junctions are abundant close to the apical end of RG. This particular location of gap junctions could favor coupling among many RG converging to the CC lumen. This is in line with our previous studies showing clusters of dye-coupled RG covering a substantial portion of the CC (Russo et al., 2004). It should be kept in mind that electrical and metabolic communication via gap junctions may define units in the CG in which key events (e.g., Ca²⁺ waves; Weissman et al., 2004) regulating cell proliferation are transmitted among a population of functionally related RG.

Another peculiar feature of progenitor cells is the contact with basal membranes, where they may receive signals important to maintain their phenotype (Alvarez-Buylla and Lim, 2004). The images of endocytotic vesicles arising from the membrane of RG contacting the basal lamina suggest that the distal pole of RG may participate in trafficking signals from the extracellular space.

Finally, some RG expressed the glial protein GFAP (for review see Campbell and Götz, 2002). In the adult forebrain, GFAP-expressing progenitors have been shown to be the main source for neurogenesis (Garcia et al., 2004). It is interesting to note that RG expressing GFAP have been reported to occur in primates (Choi, 1981; Levitt and Rakic, 1985) but not in rodents and chicken (Bignami and Dahl, 1974; Pixley and De Vellis, 1984). Demonstration of the occurrence of RG expressing GFAP in turtles reinforces the hypothesis proposed by Campbell and Götz (2002) that "radial glial cells are not a uniform cell type" and that cells with the overall morphology of RG "differ with brain regions and vertebrate species."

Neurotransmitter signaling in the CG

In addition to the intrinsic cell factors that regulate differentiation, the microenvironment in which the cells are immersed plays an important role. It is now well established that specific neurotransmitter receptors are present on neuroepithelial cells as well as on neuroblasts and glioblasts during early developmental stages of the mammalian CNS (for review see Nguyen et al., 2001). Our immunocytochemical studies revealed that the CG is richly innervated by axon terminals expressing different neurotransmitters (GABA, 5-HT, and glutamate), and there is no doubt that Nbs receive functional synaptic contacts eliciting both EPSPs and IPSPs (Fig. 8A3; see also Russo et al., 2004). GABA is particularly abundant during mammalian brain development (Miranda-Contreras et al., 2000), and it has been proposed as a depolarizing agent modulating neuronal differentiation and migration (Owens and Kriegstein, 2002). GABA receptors have been found in rat neuroepithelial cells as well as in neuroblasts and glioblasts during development of the CNS (Lo Turco et al., 1995; Ma and Barker, 1995; Verkhratsky and Steinhauser, 2000). On the other hand, some investigations indicate that 5-HT plays an important role in brain circuit formation. Indeed, 5-HT depletion during circuitry maturation leads to a decrease in synaptic density and impairs cognitive capabilities of adult rats (Chubakov et al., 1986; Mazer et al., 1997). Finally, it has been hypothesized that glutamate could regulate the proliferation of periventricular progenitor cells in rat embryos via AMPA/kainate receptor activation (Lo Turco et al., 1995). Therefore, our findings suggest that, in the particular case of the turtle spinal cord, nervous activity mediated by diverse neurotransmitter systems may modulate processes ranging from proliferation and migration to differentiation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. A. Merdes for providing the PCM-1 antibody and M.I. Rehermann and Dr. J.C. Rosillo for technical assistance.

LITERATURE CITED

- Achaval F, Olmos A. 2003. Anfibios y reptiles del Uruguay. Montevideo: Graphis.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff, Roberts K, Watson JD. 1994. Molecular biology of the cell, 3rd ed. New York: Garland.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron 41:683-686.
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. Nat Rev Neurosci 2:287-293.
- Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. Brain Res Bull 57:751–758.
- Balczon R, Bao L, Zimmer WE. 1994. PCM-1, a 228-kD centrosome autoantigen with a distinct cell cycle distribution. J Cell Biol 124:783– 793.
- Barry PH, Diamond JM. 1970. Junction potentials, electrode standard potentials, and other problems in interpreting electrical properties in membranes. J Membr Biol 3:93–122.
- Beattie MS, Bresnahan JC, Komon J, Tovar CA, Van Meter M, Anderson DK, Faden AI, Hsu CY, Noble LJ, Salzman S, Young W. 1997. Endog-

CENTRAL GELATINOSA IN THE TURTLE SPINAL CORD

enous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. Exp Neurol $148{:}453{-}463.$

- Berman NJ, Martin KAC. 1990. Cortical circuits reviewed. Trends Neurosci 13:445–446.
- Bignami A, Dahl D. 1974. Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat. Nature 252:55-66.
- Bittman K, Owens DF, Kriegstein AR, Lo Turco JJ. 1997. Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. J Neurosci 17:7037–7044.
- Cameron HA, Hazel TG, McKay RD. 1998. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. J Neurobiol 36:287–306.
- Campbell K. 2003. Signaling to and from radial glia. Glia 43:44-46.
- Campbell K, Götz M. 2002. Radial glia: multipurpose cells for vertebrate brain development. Trends Neurosci 25:235–238.
- Chenn A, Zhang YA, Chang BT, McConnell SK. 1998. Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. Mol Cell Neurosci 11:183–193.
- Choi BH. 1981. Radial glia of developing human fetal spinal cord: Golgi, Immunohistochemical and electron microscopic study. Brain Res 227: 249-227.
- Chubakov AR, Gromova EA, Konovalov GV, Chumasov EI, Sarkisova EF. 1986. Effect of serotonin on the development of a rat cerebral cortex tissue culture. Neurosci Behav Physiol 16:490–497.
- Dammermann A, Merdes A. 2002. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. J Cell Biol 159:255–266.
- Danilov AI, Covacu R, Moe MC, Langmoen IA, Johansson CB, Olsson T, Brundin L. 2006. Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis. Eur J Neurosci 23:394–400.
- Dervan AG, Roberts BL. 2003. Reaction of spinal cord central canal cells to cord transection and their contribution to cord regeneration. J Comp Neurol 458:293–306.
- Deschenes-Furry J, Perrone-Bizzozero N, Jasmin BJ. 2006. The RNAbinding protein HuD: a regulator of neuronal differentiation, maintenance and plasticity. Bioessays 28:822–833.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subgerminal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci 17:5046–5061.
- Doxsey S. 2001. Re-evaluating centrosome function. Nat Rev Mol Biol 2:688-698.
- Dundee HA, Rossman DA. 1989. Amphibians and reptiles of Louisiana. Baton Rouge: State University Press.
- Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenoz O. 1993. Neuronal types in the spinal dorsal gray cord of the turtle *Chrysemys dorbigny*. Cell Tissue Res 272:355–368.
- Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenoz O. 1998. The marginal nuclei of the spinal cord in turtles: neuron assemblies in which gammaaminobutyric acid and nitric oxide synthase are colocalized. Exp Brain Res 122:128–130.
- Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenoz O. 2002. Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. J Comp Neurol 458:293–306.
- Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Hu X, Liu Z, Jensen J, Qiu M. 2003. Molecular mapping of the origin of postnatal spinal cord ependymal cells: evidence that adult ependymal cells are derived from Nkx6.1⁺ ventral progenitopr cells. J Comp Neurol 456:237–244.
- Fuchs JL, Schwark HD. 2004. Neuronal primary cilia: a review. Cell Biol Int 28:111–118.
- Garcia ADR, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. 2004. GFAPexpressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. Nat Neurosci 7:1233–1241.
- Good PJ. 1995. A conserved family of elav-like genes in vertebrates. Proc Natl Acad Sci U S A 92:4557–4561.
- Götz M, Barde Y-A. 2005. Radial glial cells: defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. Neuron 45:369– 372.
- Götz M, Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. Nat Rev Mol Biol 6:777–788.
- Guibé J. 1970. La reproduction. In: Traité de zoologie. Tome XIV, reptiles (fascicule III). Paris: Masson.
- Hatten ME. 2002. New directions in neuronal migration. Science 297: 1660-1663.
- Hendriks R, Morest DK, Kaczmarek LK. 1999. Role in neuronal cell migration for high-threshold potassium currents in the chicken hindbrain. J Neurosci Res 58:805–814.
- Horky LL, Galimi F, Gage FH, Horner PJ. 2006. Fate of endogenous

Stem/Progenitor cells following spinal cord injury. J Comp Neurol 498:525-538.

- Kiehn O, Rostrup E, Moller M. 1992. Monoaminergic systems in the brainstem and spinal cord of the turtle *Pseudemys scripta elegans* as revealed by antibodies against serotonin and tyrosine hydroxylase. J Comp Neurol 325:527-547.
- Kim CH, Ueshima E, Muraoka O, Tanaka H, Yeo SY, Huh TL, Miki N. 1996. Zebrafish elav/HuC homologue as a very early neuronal marker. Neurosci Lett 216:109–112.
- Kubo A, Sasaki H, Yuba-Kubo A, Tsukita S, Shiina N. 1999. Centriolar satellites: molecular characterization, ATP-dependent movement toward centrioles and possible involvement in ciliogenesis. J Cell Biol 147:969-980.
- Lenhossék M. 1895. Der feinere Bau des Nervensystems. Berlin: Fischer's Medicin.
- Levitt P, Rakic P. 1980. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. J Comp Neurol 193:815–840.
- Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. 2005. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. J Neurosci Res 79:295– 302.
- Lo Turco JJ, Kriegstein AR. 1991. Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. Science 252:563–565.
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR. 1995. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. Neuron 15:1287–1298.
- Ma W, Barker JL. 1995. Complementary expressions of transcripts encoding GAD67 and GABA_A receptor alpha 4, beta 1, and gamma 1 subunits in the proliferative zone of the embryonic rat central nervous system. J Neurosci 15:2547–2560.
- Marc RE, Liu WL, Kalloniatis M, Raiguel SF, van Haesendonck E. 1990. Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina. J Neurosci 10:4006–4034.
- Marusich MF, Weston JA. 1992. Identification of early neurogenic cells in the neural crest lineage. Dev Biol 149:295–306.
- Marusich MF, Furneaux HM, Henion PD, Weston JA. 1994. Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. J Neurobiol 25:143-155.
- Mazer C, Muneyyirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P. 1997. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. Brain Res 760:68–73.
- McLendon RE, Burger PC, Pegram CN, Eng LF, Bigner DD. 1986. The immunohistochemical application of three anti-GFAP monoclonal antibodies to formalin-fixed, paraffin-embedded, normal and neoplastic brain tissues. J Neuropathol Exp Neurol 45:692–703.
- Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. J Comp Neurol 451:170-188.
- Miranda-Contreras L, Ramirez-Martens LM, Benitez-Diaz PR, Pena-Contreras ZC, Mendoza-Briceno RV, Palacios-Pru EL. 2000. Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures. Int J Dev Neurosci 18:83–91.
- Montoro RJ, Yuste R. 2004. Gap junctions in developing neocortex: a review. Brain Res Rev 47:216-226.
- Morest DK, Silver J. 2003. Precursors of neurons, neuroglia and ependymal cells in the CNS: What are they? Where are they from? How do they get where they are going? Glia 43:6–18.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. Development 116:201–211.
- Noctor SC, Flint Ac, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 409:714–720.
- Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G. 2001. Neurotrnasmitters as early signals for central nervous system development. Cell Tissue Res 305:187–202.
- Owens DF, Kriegstein AR. 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition?. Nat Rev Neurosci 3:715–727.
- Pixley SKR, De Vellis J. 1984. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. Brain Res Dev Brain Res 15:201–209.
- Radmilovich M, Fernández A, Trujillo-Cenóz O. 2003. Environment tem-

O. TRUJILLO-CENÓZ ET AL.

perature affects cell proliferation in the spinal cord and brain of juve-nile turtles. J Exp Biol 206:3085-3093.

- Rakic P. 2003. Elusive radial glia: historical and evolutionary perspective. Glia 48:19–22.
- Ramón y Cajal S. 1890a. Sur l'origine et les ramifications des fibres nerveuses de la moelle embryonnaire. Anat Anz 5:111-119.
- Ramón y Cajal S. 1890b. A quelle époque apparaiseent les expansions des cellules nerveuses de la moëlle épinière de poulet? Anat Anz 32:631-639.
- Ramón y Cajal S. 1909 (reprinted 1952). Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto Ramón y Cajal.
- Ramón y Cajal S. 1913. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Madrid: Nicolás Moya.
- Reali C, Russo R. 2005. An integrated spinal cord-hindlimbs for studying the role of intrinsic properties in somatosensory information. J Neurosci Methods 142:317–326.
- Roberts BL, Maslam S, Scholten G, Smit W. 1995. Dopaminergic and GABAergic cerebrospinal fluid-contacting neurons along the central canal of the eel and trout. J Comp Neurol 354:423-437.
- Romero-Aleman MM, Monzon-Mayor M, Yanes C, Arbelo-Galvan JF, Lang D, Renau-Piqueras J, Negrin-Martinez C. 2003. S-100 immunoreactive glial cells in the forebrain and midbrain of the lizard *Gallotia galloti* during ontogeny. J Neurobiol 57:54–66.
- Russo RE, Hounsgaard J. 1996a. Plateau-generating neurones in the dorsal horn in an in vitro preparation of the turtle spinal cord. J Physiol 493:39–54.
- Russo RE, Hounsgaard J. 1996b. Burst-generating neurones in the dorsal horn studied in an in vitro preparation of the turtle spinal cord. J Physiol 493:55-66.

- Russo RE, Fernández A, Reali C, Radmilovich M, Trujillo-Cenoz O. 2004. Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurons in the turtle spinal cord. J Physiol 560:831–838.
- Sala CL. 1894. La neuroglia de los vertebrados. Medical degree thesis, Madrid
- Schäfer BW, Heizmann CW. 1996. The S-100 family of EF-hand calciumbinding proteins: functions and pathology. TIBS 21:134–140.
- Sotelo JR, Trujillo-Cenóz O. 1958. Electron microscope study on the development of ciliary components of the neural epithelium of the chick embryo. Z Zellforsch 49:1–12.
- Talos DM, Fishman RE, Park H, Folkerth RD, Follett PL, Volpe JJ, Jensen FE. 2006. Developmental regulation of α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4isoxazole-propionic acid receptor subunit expression in forebrain and relationship to regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury. I. Rodent cerebral white matter and cortex. J Comp Neurol 497:42–60.
- Thompson KS, Zeidler MP, Bacon JP. 1994. Comparative anatomy of serotonin-like immunoreactive neurons in isopods: putative homologues in several species. J Comp Neurol 347:553–569.
- Tsai L-H, Gleeson JG. 2005. Nucleokinesis in neuronal migration. Neuron 46:383–388.
- Verkhratsky A, Steinhauser C. 2000. Ion channels in glial cells. Brain Res Rev 32:380–412.
- Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC, Kriegstein AR. 2004. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. Neuron. 43:647–661.
- Wurmser AE, Palmer TD, Gage FH. 2004. Cellular interactions in the stem cell niche. Science 304:1253–1255.
- Yao KM, Samson ML, Reeves R, White K. 1993. Gene *elav* of *Drosophila melanogaster*: a prototype for neuronal-specific RNA binding protein gene family that is conserved in flies and humans. J Neurobiol 24:723– 739.

308

Development/Plasticity/Repair

Connexin 43 Delimits Functional Domains of Neurogenic Precursors in the Spinal Cord

Raúl E. Russo,¹ Cecilia Reali,¹ Milka Radmilovich,³ Anabel Fernández,^{2,4} and Omar Trujillo-Cenóz²

¹Neurofisiología Celular y Molecular and ²Neuroanatomía Comparada, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, CP 11600 Montevideo, Uruguay, ³Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, CP 11800 Montevideo, Uruguay, and ⁴Unidad Asociada Neuroanatomía, Facultad de Ciencias, CP 11400 Montevideo, Uruguay

The cells lining the central canal (CC) of the spinal cord derive from the ventral part of the neural tube and, in some vertebrates, are responsible for the functional recovery after spinal cord injury. The region that surrounds the CC in the turtle contains proliferating cells that seem to generate both glia and neurons. Understanding the biology of spinal progenitors with the potential to generate new neurons "*in situ*" is important for cell replacement therapies. Here, we aimed to identify and characterize precursor cells in the spinal cord of *Trachemys dorbignyi*. To evaluate the population of proliferating cells, 5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU) was injected every 4 h (50 μ g/g, i.p.) during 24 h. We found BrdU⁺ nuclei around the CC with a higher density in the lateral quadrants, in which whole-cell patch-clamp recordings showed extensive dye coupling of cells. Carbenoxolone (100 μ M) increased the input resistance, suggesting strong gap junction coupling among precursors. The expression of brain lipid binding protein (a marker of a subtype of radial glia) and Pax6 matched the location of clusters, suggesting these cells belonged to a domain of neurogenic precursors. These domains were delimited by a high density of connexin 43 (Cx43) located on the endfeet of CC contacting cells. Our findings indicate that spinal precursors share basic properties with those in the embryo and neurogenic niches of the adult brain, and support a key role of functional clustering via Cx43 in spinal cord neurogenesis.

Key words: radial glia; neurogenic precursors; brain lipid binding protein; Pax6; connexin 43; spinal cord

Introduction

The cells lining the central canal (CC) of the spinal cord derive from the ventral part of the neural tube (Fu et al., 2003) and thus may have retained some of the properties of embryonic precursors. Indeed, CC contacting cells proliferate in the adult rat (Horner et al., 2000), a process boosted by spinal cord injury (Mothe and Tator, 2005), but the differentiation from these spinal precursors toward the neuronal lineage appears forbidden (Horner et al., 2000). Recent reports, however, suggest that new neurons can be generated from CC contacting cells as a response to some forms of injury (Danilov et al., 2006). Understanding the biology of spinal progenitors with the potential to generate new neurons "*in situ*" is fundamental for the design of cell replacement therapies.

During the development of the cerebral cortex, radial glia (RGs) behave as precursors dividing vigorously to generate neurons that migrate along RG processes (Noctor et al., 2001). These precursors have a characteristic molecular and functional phenotype, expressing cell specific proteins and lacking active mem-

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5736-07.2008

Copyright © 2008 Society for Neuroscience 0270-6474/08/283298-12\$15.00/0

brane properties (Hartfuss et al., 2001; Noctor et al., 2002). Another feature of precursors is their functional clustering via gap junction coupling (Lo Turco and Kriegstein, 1991; Bittman et al., 1997; Noctor et al., 2001, 2002), which appears critical for maintenance of their phenotype and capacity to proliferate (Bruzzone and Dermietzel, 2006). The progenitors in neurogenic niches of the adult brain derive from their counterpart in the embryo and share many of their fundamental properties (Ming and Song, 2005; Lledo et al., 2006). However, the properties of potential precursors in the mature spinal cord remain elusive.

Progenitor cells and neuroblasts persist in the postnatal spinal cord of the turtle (Fernández et al., 2002; Russo et al., 2004), which thus represents a unique model to study the biology of spinal neurogenic precursors. We hypothesize that spinal precursors share basic mechanisms with those in well characterized neurogenic niches of the adult brain. Here, we take advantage of this unique model to study the nature of precursor cells in the spinal cord. We combined a 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) saturation protocol to identify the population of proliferating cells, with patch recording of cells around the CC and molecular phenotyping. We found that the higher rate of proliferation occurred in the lateral CC in which extensive clusters of gap junction coupled cells existed. The expression of brain lipid binding protein (BLBP) [a marker of RGs (Feng et al., 1994)] and Pax6 [a marker of neurogenic precursors (Pinto and Götz, 2007)] matched the location of clusters, indicating that these cells belonged to a domain of neurogenic progenitors. These domains of precursor

Received Dec. 28, 2007; revised Feb. 14, 2008; accepted Feb. 16, 2008.

This work was supported by National Institutes of Neurological Disorders and Stroke–National Institutes of Health Grant NS048255 (R.E.R.). We thank Dr. J. C. Sáez for kindly providing the antibody against connexin 43 and Dr. Alberto Pereda for critical reading of this manuscript. We thank M. I. Rehermann for technical assistance.

Correspondence should be addressed to Dr. Raúl E. Russo, Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas, Clemente Estable, Avenida Italia 3318, CP 11600 Montevideo, Uruguay. E-mail: rrusso@iibce.edu.uy.

cells were spatially delimited by connexin 43 (Cx43) expression on the apical segments of CC contacting cells. Our findings represent the first evidence showing that precursor cells in the spinal cord share fundamental properties with those in the embryo and canonical neurogenic niches of the adult mammalian and avian brains, and support a key role of functional coupling via gap junctions as a basic, phylogenetically preserved mechanism in neurogenic precursors.

Materials and Methods

General. Juvenile turtles (*Trachemys dorbignyi*; 5–7 cm carapace length) were used following the guidelines of our local Committee for Animal Care and Research (Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay). The animals were kept in temperate aquaria at 26–30°C under natural illumination conditions.

BrdU labeling. To reveal the population of proliferating cells, we used a cumulative BrdU protocol (Nowakowski et al., 1989). Turtles (n = 5) received seven intraperitoneal injections of BrdU (50 µg/g body weight; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolved in 0.9% NaCl, which was 0.007N for NaOH, in a time lapse of 24 h. According to Cameron and McKay (2001), the dose used here supplies most DNA-synthesizing cells with enough BrdU to appear unambiguously labeled (Taupin, 2007). Because cycling cells in the spinal cord have a long cell cycle (Horner et al., 2000), we assumed a 4 h interval between injections was enough to label the whole population of proliferating cells during 24 h. Animals were killed 4 h after the last injection and spinal cord living slices were obtained as described below. Quantification studies were made in another series of experiments (n = 4) using the same injection protocols but the turtles were fixed by perfusion, and sections (50–80 µm thick) from the spinal cord cut with a vibrating microtome.

Slice preparation and electrophysiology. Turtles anesthetized by hypothermia were decapitated and the blood was removed by intraventricular perfusion with Ringer's solution (6°C). The cervical enlargement was dissected out and transverse 300-µm-thick slices were cut, placed in a chamber (1 ml volume), and superfused (1 ml min⁻¹) with Ringer's solution of the following composition (in mM): 96.5 NaCl, 2.6 KCl, 31.5 NaHCO₃, 3 CaCl₂, 2 MgCl₂, and 10 glucose. The solution was saturated with 5% CO₂ and 95% O₂, pH 7.6. All experiments were performed at room temperature. Cells were visualized with differential interference contrast (DIC) optics (DM LFS; Leica, Wetzlar, Germany) with a $40 \times$ (0.8 numerical aperture) objective. Patch-clamp whole-cell recordings were obtained with electrodes filled with the following (in mM): 122 K-gluconate, 5 Na₂-ATP, 2.5 MgCl₂, 0.003 CaCl₂, 1 EGTA, 5.6 Mggluconate, 5 K-HEPES, 5 H-HEPES, and 10 biocytin, pH 7.4, 5-10 MΩ. In some cases, Lucifer yellow (0.1%; Sigma-Aldrich), Alexa 488 hydrazide (500 μM), or Alexa 488 dextran (500 μM; molecular weight 10,000; Invitrogen, Eugene OR) were added to the pipette solution. Current- and voltage-clamp recordings were performed with an Axoclamp 2B or a Multiclamp 700B (Molecular Devices, Palo Alto, CA). Current and voltage steps were generated with the pClamp10 package (Molecular Devices), which was also used for additional analysis. Series resistance and whole-cell capacitance were not compensated. In voltage-clamp mode, cells were held at -70 mV and the resting membrane potential was estimated from the current–voltage relationship (at I = 0). To subtract leak currents, we used a P4 protocol provided by Clampex10 software that allowed simultaneous storage of raw and leak subtracted data. Liquid junction potentials were determined and corrected (Barry and Diamond, 1970). Values are expressed as the mean \pm SEM.

Carbenoxolone (Cbx) (100 μ M) or meclofenamic acid (MFA) (100 μ M) were added to normal Ringer's to block gap junctions, whereas tetraethylammonium (TEA) (10 mM) was added to block K⁺ channels. All drugs were purchased from Sigma-Aldrich.

Morphological identification of recorded cells. During whole-cell patchclamp recordings, 109 cells were filled with biocytin. Cells were filled for at least 10 min and the slices were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 12–24 h. In some cases, cells were visualized in living slices by injecting Lucifer yellow or Alexa 488



Figure 1. The CG as a proliferative niche. **A**, Scheme of the BrdU protocol used. **B**, BrdU ⁺ cells (green) concentrated on the lateral aspects of the region surrounding the CC. Syto 64 (red) was used to stain nuclei. **C**, BrdU ⁺ cell in telophase (confocal section and DIC illumination) close to the CC. The inset shows the plane of cleavage (arrows). **D**, Densities of BrdU-labeled nuclei in the lateral (L) and medial (M) aspects of the region surrounding the CC (mean \pm SEM). The drawing shows schematically the limits of the regions (shaded area) in which BrdU ⁺ nuclei were counted. Scale bars: **B**, 10 μ m; **C**, 20 μ m; inset, 10 μ m.

Russo et al. • Neurogenic Precursors in the Spinal Cord



Figure 2. Functional properties of cells in the lateral CG. *A*, Responses of a cell in the lateral CG to a series of voltage steps (*1*) that displayed a linear current–voltage relationship (*2*). After injection with Lucifer yellow (LY), the cell appeared dye coupled with neighboring cells (*3*; LY). Notice the ghosts of uncoupled cells (asterisks). *B*, Cbx (100 μm) increased the input resistance of cells in the lateral CG (*n* = 33 cells). *C*, Histograms showing the distribution of the input resistance in control and after uncoupling with Cbx. *D*, After 15 min of preincubation with MFA (100 μm), patch recordings in the lateral CG revealed single cells (*n* = 10). Notice the small rounded cell body connected by a thin process to a wide endfoot that ended on the CC lumen. *E*, Histograms showing the effect of uncoupling with Cbx (100 μm) on the resting membrane potential (RMP). Scale bars: *A3*, *D*, 15 μm.

and the resulting images were acquired with an FG7 frame grabber (Scion Instruments, Frederick, MD) using NIH Image. Although leakage from the pipette was usually sufficient to get good stainings, in most cases we applied current or voltage pulses (500 ms at 1 Hz) after the electrophysiological characterization to iontophorize either biocytin or fluorophores. After overnight PB rinsing, the slices were blocked with 0.5% BSA in PB (1 h) and then incubated in a solution containing 0.3% Triton X-100 with either the avidin-fluorophore complex (avidin-Alexa 488 or 633; 2 h) or the biotin-avidin-HRP complex (overnight). Slices incubated with fluorophores were mounted in glycerol and examined with a confocal microscope (FV 300; Olympus, Tokyo, Japan). Slices incubated with the HRP-conjugated complex were reacted with diaminobenzidine in the presence of H₂O₂ to produce a brown precipitate. The outlines of stained cells were manually set to generate a mask from which the area of staining was calculated using Image Pro Plus (version 5.1; Media Cybernetics, Bethesda, MD). The maximum extension of staining in the rostrocaudal axis was measured with the aid of Olympus Fluoview software.

These two values were used to calculate the volume index (area \times extent of staining in the *z*-axis).

Quantification procedures. Sections were serially cut, sequentially collected in numbered vials, and chosen using a generator of random numbers. The selected sections were further processed for revealing the presence of cells that have incorporated BrdU (see below). The region surrounding the CC was divided into four triangular quadrants (two laterals, one dorsal, and one ventral) covering a total area of $300 \times 100 \ \mu m$ (a rectangle centered on the CC with the longest side perpendicular to the dorsal raphe) (see Fig. 1*D*, inset). The corresponding areas were calculated and the number of BrdU-labeled nuclei was counted in each quadrant. The resulting numbers were pooled in two groups: lateral (right and left) and medial (dorsal and ventral). Densities (number of nuclei/area in square micrometers) were calculated in randomly selected sections obtained from different turtles (n = 4). Statistical significance was estimated with a paired *t* test at p < 0.05.

To estimate the number of BLBP+ cells that expressed Pax6, we



Figure 3. Clustered cells display voltage-gated outward currents. *A*, Leak-subtracted and raw currents (top and middle traces, respectively) in response to voltage steps (bottom traces). An outward current with a slow time course is observed in leak-subtracted currents (top traces; 1). Cbx (100 μ M) blocked a substantial component of the total current (middle traces; 2) but did little to the outward current (top traces; 2). TEA (10 mM) blocked the outward current (3). *B*, Cell with a voltage-gated outward current (top traces) blocked by Cbx (middle traces). *C*, A few clusters lacked voltage-gated outward currents as shown in the leak subtracted traces (top).

counted cells from 20 confocal sections (1 μ m thick) separated 7 μ m from each other, obtained from the spinal cords of different turtles (n = 4). To avoid cross talk, two images were recorded from each section, one scanned with the far-red light beam to excite Alexa 633, and the other with the blue light beam to excite Alexa 488. Digital images were further processed with Photoshop 7, and cells expressing both proteins (BLBP and Pax6) or only one of them counted.

Immunohistochemistry. To reveal the presence of BrdU-labeled cells, fixed $300-\mu$ m-thick slices or thinner microtome sections ($60-80\ \mu$ m thick) were rinsed in PB and incubated in 2N HCl with proteinase K at 0.2 mg/ml for 10 min. After several rinses, sections were blocked with 5% goat serum in PBS with 0.3% Triton X-100 and placed overnight in mouse anti-BrdU (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) diluted 1:500 in PB and 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). After washing, the tissues were incubated with a secondary serum conjugated with a fluorophore (Alexa 488, Alexa 546, or Alexa 633; Invitrogen).

To identify the molecular phenotype of cells in the central gelatinosa (CG), we used the following primary antibodies: (1) anti-BLBP (rabbit polyclonal, 1:1000; Chemicon International, Temecula, CA), (2) anti-HuC/D (mouse monoclonal, 1:50; Invitrogen), (3) anti-Cx26 (rabbit polyclonal, 1:25; Zymed, San Francisco, CA), (4) anti-Cx43 (rabbit polyclonal, 1:3000; kindly provided by Dr. J. C. Sáez, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile), (5) anti-vimentin [mouse, 40E-C raised against canary brain, 1:10; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA], (6) anti-3CB2 (mouse, 1:10; DSHB), (7) anti-Pax6 (mouse, 1:10; DSHB), and (8) anti-GFAP (rabbit polyclonal, 1:500; Sigma-Aldrich).

Tissues were placed in PB with 0.3% Triton X-100 for 30 min and then incubated with the primary antibody diluted in the blocking solution. Incubation times were optimized for each antibody. In the particular case of Cx26, the sections were previously immersed in citrate buffer (10 mM) at 80°C for 30 min to retrieve the epitope. After washing in PBS, tissues were incubated in secondary antibodies conjugated with different fluorophores. When performing colabeling experiments, Alexa 488 and 633 were used to avoid cross talk. We made control experiments suppressing primary antibodies during tissue processing.

Complementary histological procedures. Cell clusters were usually examined in transverse spinal cord slices. However, in some cases (n = 5), slices containing well stained clusters were embedded in a mixture of agar and albumin hardened with 1% glutaraldehyde dissolved in PB. The resulting blocks were oriented in a vibrating microtome to obtain sections parallel to the longitudinal axis of the CC and perpendicular to the transverse plane.

To reveal the characteristics of nuclei in animals that have not received BrdU, sections were stained with the nuclear stain Syto 64 (Invitrogen).

Results

The central gelatinosa is a niche of proliferating cells

The CG is a complex region surrounding the CC that contains cells with the ability to proliferate and immature neurons, suggesting the persistence of neurogenesis after birth (Fernández et al., 2002; Russo et al., 2004; Trujillo-Cenóz et al., 2007). In other neurogenic niches, precursor cells cluster in spatially defined domains (Doetsch et al., 1997); therefore, we asked whether precursors in the CG are spatially

grouped or located evenly around the CC. To reveal the population of cycling cells in the CG, we used a BrdU saturation protocol (n = 4 turtles) that consisted of an injection (50 μ g/g) every 4 h during 24 h (Fig. 1A). Although we found BrdU⁺ nuclei in all quadrants of the CG, the density of BrdU-labeled nuclei was significantly higher in the lateral quadrants (lateral quadrants: $1.31 \times 10^{-4} \pm 0.18 \times 10^{-4}$ nuclei/ μ m²; medial quadrants: $0.10 \times 10^{-4} \pm 0.04 \times 10^{-4}$ nuclei/ μ m²; n = 38 sections; $p < 10^{-4}$ 0.01, paired t test) (Fig. 1B,D). Close inspection of the BrdUlabeled nuclei showed that some exhibited a punctate pattern, whereas others appeared uniformly stained (data not shown). To exclude that nuclei with chromatin granules may reflect cell injury induced by BrdU, we stained spinal cord sections from noninjected turtles with the nuclear dye Syto 64 and found that a similar chromatin distribution also occurred in nontreated animals (data not shown). As reported by Cameron and McKay (2001) in the dentate gyrus of rodents, the presence of punctate nuclei cannot be attributed to a toxic action of BrdU but merely reflects "the clumping of a large proportion of the DNA into heterochromatin" replicated at the end of S-phase (Lima-de-Faria and Jaworska, 1968). We occasionally found typical mitosis close to the CC lumen (Fig. 1C, main image and inset), suggesting that, as in the neural



Figure 4. Clusters are diverse and contain RGs. *A*, A massive group of dye-coupled cells covering a whole lateral CG region. Notice the three projections of fibers arising from the core of the cluster. *B*, Small cluster covering ~ 10 min of the CC with only a bundle of processes projecting ventrolaterally. *C*, Inverse linear relationship between the input resistance (*R*_{IN}) and volume index (area × extent of staining in the *z*-axis). *D*, Clustered cells have the typical morphology of RGs. The injection of the nonpermeable dye Alexa 488 dextran (molecular weight, 10,000) revealed a cell with bipolar morphology (*1*) bearing a central process that contacted the CC and a peripheral process that projected ventrolaterally to the pia matter (arrowhead). Injection of biocytin (revealed with streptavidin-Alexa 633) showed that the cell belonged to a cluster of dye-coupled cells (*2*, *3*). The distal process of the recorded cell ran together with other processes from coupled cells (*4*, arrows). *1–3* are confocal optical sections, whereas *4* is a stack of sections. *E*, Schematic drawing showing the proportion (percentage of total number of clusters) of the projections to the pia in the surface of the cord. *F*, A cluster with conspicuous processes running in the dorsal raphe that terminated in endfeet contacting the pia (inset). The processes had some spine-like sprouts and varicosities (arrow). *G*, Cluster with ventrolateral and ventral projections reaching the medial sulcus. The enlarged area shows the contact of the processes. *I*, A cell with RG morphology that appeared uncoupled in the lateral CG. Scale bars: *A*, 30 µm; *B*, *D1–D3*, 20 µm; *D4*, 50 µm; *F*, main image, 25 µm; inset, 5 µm; *G*, main image, 60 µm; enlarged area, 10 µm; *H*, main image, 20 µm; enlarged area, 10 µm; *I*, 10 µm.

tube, nuclei migrate toward the CC lumen to divide (Sauer, 1935).

Functional phenotype of precursor cells in the lateral CG

Both in the embryonic and adult neurogenic niches (Lledo et al., 2006), precursor cells have a characteristic electrophysiological signature. To explore the functional phenotype of putative precursors in the lateral aspects of the CG, we made patch-clamp recordings of cells surrounding the CC. Figure 2A shows the response of a representative cell to hyperpolarizing and depolarizing voltage steps (Fig. 2A1) with a linear *I*–*V* relationship (Fig. 2A2). The cells in the lateral quadrants of the CG had input resistances ranging from 7.6 to 700 M Ω (mean ± SEM, 167 ± 16 M Ω ; n = 102) and resting potentials from -50 to -104 mV (-87.4 ± 1.1 mV; n = 96). As revealed by injection of Lucifer yellow, the cell in Figure 2A had a small round cell body connected to the CC by a single thin process that terminated on a wider endfoot (Fig. 2A3). The recorded cell was dye coupled to

other neighbors forming a compact cluster of cells (Fig. 2A3) that surrounded noncoupled elements (Fig. 2A3, asterisks). The dye coupling and low input resistance of these cells may arise from extensive electrical and metabolic coupling via gap junctions. In line with this, the gap junction decoupler carbenoxolone (100 μ M) significantly increased the input resistance of cells located in the lateral CG (102.3 \pm 12.1 M Ω for control and 780.8 \pm 89.9 M Ω after 100 μ M Cbx; n = 34; p < 0.01, independent *t* test) (Fig. 2B, C). Blockade of hemichannels was unlikely to contribute to the effect of carben oxolone on the $R_{\rm IN}$ because most should be closed at the extracellular Ca²⁺ concentrations used in this study (Sáez et al., 2005). Therefore, the increase in $R_{\rm IN}$ induced by carbenoxolone can be attributed to the uncoupling of the recorded cells from their neighbors. In support of this possibility, incubation of slices in MFA (100 μ M; n = 10) or carbenoxolone (100 μ M; n = 3) before patch-clamp recordings in the lateral quadrants blocked dye coupling. Figure 2D shows a cell with a small rounded cell body connected to a wide endfoot by a thin

process, which was recorded after 15 min of preincubation with MFA. Notice that the gap junction permeable dye Alexa 488 failed to reveal dye coupling in the presence of MFA. In line with this, the $R_{\rm IN}$ of cells recorded in the presence of MFA was 1.96 \pm 0.27 G Ω . Uncoupling with carbenoxolone also depolarized the resting membrane potential of recorded cells from an average value of -88.1 ± 1.3 to -77.7 ± 1.9 (n = 30; p < 0.01, independent *t* test) (Fig. 2*E*).

Some precursors in neurogenic niches of the developing and adult brain display voltage-gated outward currents (Bahrey and Moody, 2003; Liu et al., 2006). Because small voltage-gated currents may be outweighed by leak currents, we used a leak subtraction protocol to explore the presence of active conductances in clustered cells. Figure 3 shows leak subtracted and non-leaksubtracted currents in response to depolarizing and hyperpolarizing voltage steps, from a holding potential of -70 mV. Leak subtraction revealed that most cell clusters (46 of 50) displayed an outward current (65.5 \pm 8.6 pA; peak current at +30 mV) in response to depolarizing steps (Fig. 3A1, top trace). Carbenoxolone (100 μ M) substantially reduced the currents in non-leaksubtracted traces (Fig. 3A2, middle trace) and decreased the peak current of the leak-subtracted traces by \sim 50% (34.7 \pm 5.3 pA at +30 mV; p < 0.05, Wilcoxon's matched-pairs test) (Fig. 3A2, top trace). In the presence of carbenoxolone, the time course of the outward current was faster than under control conditions, presumably because of a better space clamp when the recorded cell was uncoupled from its neighbors. TEA (10 mM) reduced the small outward current (Fig. 3A3), suggesting the involvement of a K⁺ delayed rectifier. In some clusters (6 of 21), carbenoxolone blocked the outward current (Fig. 3B) indicating a passive behavior of the recorded cell, whereas still in other clusters (4 of 50) leak subtraction did not reveal any active current (Fig. 3C).

Clusters contain RGs

Although Lucifer yellow or Alexa 488 allowed the visualization of the recorded cell and its coupled neighbors, the histochemical development of intracellularly injected biocytin permitted a more thorough analysis of the morphology of cell clusters. The size of clusters varied from a massive group of cells that covered a whole lateral CG quadrant (Fig. 4A) to rather small conglomerates of cells (Fig. 4B). The rostrocaudal extension of these clusters varied between 8.9 and 47 μ m (21.4 ± 2.1 μ m; n = 26). Because the number of cells within clusters was difficult to estimate (even with nuclear stains) due to the intimate association between dye coupled cells, we calculated a volume index (area in the transverse plane \times depth in the rostrocaudal axis) as a measure of cluster size. The volume index correlated inversely with the input resistances of recorded cells (Fig. 4C), suggesting that the low input resistance arose mainly from the number of coupled cells. There was no correlation between the duration of the recording and the size of the cluster, indicating that even the shortest recordings were enough to stain properly all coupled cells.

To better visualize the morphology of individual cells within clusters, we combined biocytin injection with Alexa 488 dextran, which does not permeate through gap junctions. This approach revealed that cells (n = 6) within clusters had the typical bipolar morphology of RGs, with a short apical process terminating on a wide endfoot that contacted the CC (Fig. 4*D1–D3*) (see also Fig. 2*D*) and a long process reaching the subpial surface (Fig. 4*D1,D4*, arrowheads). The distal processes of many cells joined to form bundles that projected ipsilaterally to three well defined places: the ventrolateral aspect of the lateral funiculus (100%; n = 72) and the dorsal (44.5%) and ventral (23.6%) raphes (Fig. 4*E*). All



Figure 5. Clusters of coupled cells express BLBP. *A*, BLBP expression matched the location of clusters of gap junction coupled cells. Notice that, similarly to clusters, there were conspicuous BLBP ⁺ fibers running in the dorsal raphe (arrow) and projecting ventrolaterally (arrowheads). In some sections, a bundle of BLBP ⁺ fibers also projected to the ventral sulcus (arrow in inset). Syto 64 was used to stain nuclei in the inset. *B*, Confocal optical sections showing a biocytin-filled cluster (1) and BLBP staining (2). The merged images show that the cells within the cluster expressed BLBP. Scale bars: *A*, 40 μ m; inset, 10 μ m; *B*, 5 μ m.



Figure 6. BLBP clustered cells and neuroblasts. *A*, A cluster of dye-coupled cells resectioned in the parasagittal planes. The inset shows a section at the level of the white line in the main image. Notice the mesh-like structure formed by gap junction coupled cells that surrounded noncoupled cells. *B*, Biocytin-filled cluster with the typical functional phenotype of precursor cells (1). The arrow points to a cell profile that did not belong to the cluster. In the same confocal section, the early neuronal marker HuC/D expressed in cells around the CC (2). The merged images show that the HuC/D + cell pointed by the arrow (2) was surrounded by the cluster (3). Also notice the lack of colocalization indicating the neuroblasts are not coupled to putative precursors (3). *C*, BLBP and HuC/D immunohistochemistry showing the intimate spatial relationship between BLBP + precursors and neuroblasts. *D*, A biocytin-filled neuroblast able to generate action potentials surrounded by BLBP + cells. Scale bars: *A*, 50 µm; inset, 10 µm; *B*, *C*, 20 µm; *D*, 10 µm.

three projection patterns could be observed in a single cluster (Fig. 4*A*) (16.7%), but most clusters showed the ventrolateral projection either alone (48.6%) (Fig. 4*B*,*D*,*H*) or together with the projection to the dorsal raphe (27.8%) (Fig. 4*F*). As described in the developing cortex (Noctor et al., 2002), the distal processes had varicosities (Fig. 4*F*, arrow in inset) and terminated on endfeet touching a limited region of the pial surface (Fig. 4*F*,*G*, insets).

Although clusters appeared as unitary cell assemblies, "detached cells" lying aside the main cellular mass were often observed in biocytin-filled clusters (Fig. 4H, arrows). In some cases, cell bodies located far away from the CC within the bundle of fibers radiating from the cluster (Fig. 4H, arrow in inset).

Occasionally, we found uncoupled cells in the lateral CG with the typical morphology of RGs (n = 13) (Fig. 41). For comparison with the lateral CG, we made some recordings in the medial quadrants. We found that in the medial CG nonspiking cells also had the morphological phenotype of RGs, with an endfoot on the CC and a distal process running in the ventral (supplemental Fig. 1*A*, available at www.jneurosci.org as supplemental material) or dorsal raphe (supplemental Fig. 1*B*,*C*, available at www. jneurosci.org as supplemental material) that reached the pia. Most cells in the medial CG appeared uncoupled (supplemental Fig. 1*A*, *B*, available at www.jneurosci.org as supplemental material) (11 of 19 cells), whereas the rest belonged to paucicellular clusters composed of only two to five cells (supplemental Fig. 1*C*, available at www.jneurosci.org as supplemental Fig. 1*C*,

Molecular phenotype of spinal precursors

Our data indicate that some of the cells in the lateral CG display functional and morphological characteristics of RGs. Thus, we explored the expression of molecules known to be expressed in these cells (Pinto and Götz, 2007). We previously reported that GFAP⁺ cells predominate in the roof of the CC, whereas S100⁺ cells express evenly around the CC alternating with HuC/D⁺ immature neurons (Trujillo-Cenóz et al., 2007). GFAP, 3CB2, and vimentin, which express in some precursor cells in the brain (Campbell and Götz, 2002), appeared mostly in fibers throughout the CG but did not colocalize with cells within clusters (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). However, BLBP expressed strongly in the lateral aspects of the CG at all levels of the spinal cord (Fig. 5A). Bundles of BLBP⁺ fibers ran within the dorsal raphe (Fig. 5A, arrow) and to the lateral aspect of the cord (Fig. 5A, arrowheads). In some sections, BLBP⁺ processes appeared projecting to the ventral sulcus (Fig. 5A, arrow in inset). This pattern of BLBP expression strongly resembled the extensive clusters of coupled cells. To test whether electrically coupled cells expressed BLBP, we combined the recording of cells in the lateral CG with immunostaining for BLBP. Indeed, Figure 5B shows that the cells of a biocytin-filled cluster (Fig. 5B1) expressed BLBP (Fig. 5B2,B3).

BLBP clustered cells and neuroblasts

In other neurogenic niches, precursor cells envelope neuroblasts in a way that suggests an active signaling between these two cell types (Doetsch et al., 1997; Campbell, 2003; Wurmser et al., 2004). Furthermore, the expression of BLBP in RGs depends critically on signaling from neighbor developing neurons (Feng and Heintz, 1995). When clusters were sectioned following parasagittal planes (Fig. 6A), it became evident that coupled cells formed a three-dimensional network with channels occupied by unstained, uncoupled cells (Fig. 6A, inset). We hypothesized that the uncoupled cells engulfed by clusters were immature neurons.



Figure 7. Molecular basis of gap junction coupling of spinal precursors. *A*, Cx26 puncta form a ring around the CC. *B*, Large aggregates of Cx43 puncta concentrate in the lateral aspects of the CG in close apposition with the CC lumen (arrows). Notice the lack of Cx43 puncta in the dorsal and ventral aspects of the CC. *C*, A longitudinal section at the level of the CC showing the discrete distribution of Cx43 puncta (brackets) along the rostrocaudal axis (double-headed arrow). *D*, Cx43 puncta localize on the apical segments of gap junction coupled cells. Notice the Cx43 puncta (arrowheads) on the symmetrical lateral aspect of the CC (confocal optical section). The inset shows a stack of sections of the same cluster. Scale bars: *A*, 20 µm; *B*, 30 µm; *C*, 20 µm; *D*, 20 µm; inset, 100 µm.

To test this idea, we combined the recording and morphological identification of clusters with immunostaining for the early neuronal marker HuC/D. Figure 6B shows a confocal optical section of a biocytin-filled cluster in which a "hole" is evident (Fig. 6B1, arrow). The same section illuminated with the 633 nm laser revealed a crown of HuC/D⁺ neuroblasts surrounding the CC (Fig. 6B2). As shown in the merged image, the HuC/D⁺ cell pointed by the arrow was surrounded by the cluster (Fig. 6B3, arrow). Similarly, BLBP + cells surrounded HuC/D + putative immature neurons (Fig. 6C). Although HuC/D is an early neuronal marker, this protein is also expressed in a subset of neuronal progenitors in the embryonic cerebral cortex (Miyata et al., 2004). Thus, to confirm that the HuC/D⁺ cells immersed within BLBP⁺ clustered cells were indeed immature neurons, we recorded from cells in the lateral CG with the characteristic morphology of neuroblasts as visualized under DIC optics (Russo et al., 2004). Figure 6D shows a cell that fired action potentials in response to a depolarizing current pulse surrounded by BLBP⁺ cells.

Molecular basis of gap junction coupling of spinal precursors The current electrophysiological data and our previous electron microscope studies (Trujillo-Cenóz et al., 2007) point to the existence of gap junctions connecting adjoining RGs in the spinal

cord. Although several connexins are expressed in the developing brain, Cx26 and Cx43 are the main subtypes in the subventricular zone of the developing forebrain (Nadarajah et al., 1997; Bittman and Lo Turco, 1999). Therefore, to address their possible involvement in gap junction coupling among spinal precursors, we performed immunocytochemistry against Cx26 and Cx43. Cx26 puncta appeared forming a ring around the CC (Fig. 7A). The high concentration of Cx26 puncta appeared at 5 μ m from the CC lumen and extended rather symmetrically $\sim 5 \ \mu m$ toward the periphery (Fig. 7A). Therefore, although we cannot rule out a contribution of Cx26 to coupling, its spatial distribution cannot explain the selective location of extensive clusters on the lateral quadrants. We also found Cx43 puncta widely distributed both in the gray and white matter of the spinal cord. Remarkably, a high density of puncta appeared close to the CC lumen on the lateral quadrants of the CC (Fig. 7B, arrows). This high density of puncta was absent in the dorsal and ventral aspects of the CC. We next examined longitudinal sections of the cord to explore the distribution of the Cx43 along the rostrocaudal axis. Interestingly, we found discrete aggregations of Cx43-labeled puncta whose lengths in the rostrocaudal dimension ranged from 6 to 42 μ m (14.7 \pm 3.3 μ m; n = 11) (Fig. 7*C*). These findings suggest that the distribution of Cx43 may account for the extension of cell clusters both in the transverse plane and the rostrocaudal axis. To test whether there was actually a topological correspondence between the high concentration of Cx43 close to the CC lu-

men and the distribution of dye-coupled cells, we combined patch recordings and biocytin staining of clusters with immunohistochemistry for Cx43. Our results evidenced a close spatial correspondence consistent with the hypothesis that cell coupling within clusters is mediated by Cx43 gap junctions concentrated on the endfeet of CC contacting cells (Fig. 7*D*). Together, our results show that, although both Cx26 and Cx43 express in the CG, the spatial distribution of these connexins suggests that Cx43 is the subtype that delimits the clusters in the lateral quadrants of the CG.

BLBP⁺ clusters contain dividing cells

Our results indicate that, in the CG, the highest rate of proliferation occurs in the lateral quadrants in which cells with the functional, morphological, and molecular features of RGs form domains of electrically coupled cells. We hypothesized that, as in the developing cortex (Bittman et al., 1997), these clusters contain mitotically active cells. To test this possibility, we combined a saturation protocol of BrdU with immunohistochemistry for BLBP and patch-clamp recordings of cell clusters. We found that clusters contained between one (one of six clusters) and two cells (five of six) that incorporated BrdU (Fig. 8*A*,*B*). As expected by the correlation between cell cluster and BLBP expression in the lateral CG, mitotically active cells that incorporated BrdU expressed BLBP (Fig. 8*C*).

Pax6 expression in cell clusters

The data shown above suggested that BLBP + RGs may be progenitors with the potential to generate cells that differentiate to the neuronal lineage. Because Pax6 has been identified as an important regulator of neurogenic RGs (Pinto and Götz, 2007), we then explored the expression of this transcription factor. Remarkably, Pax6 expressed selectively on the lateral CG, matching the location of BLBP⁺ clustered cells (Fig. 9A). To test whether clusters actually contained Pax6⁺ cells, we then combined patch-clamp recordings with Pax6 immunohistochemistry. Figure 9 shows a biocytin-filled cluster (Fig. 9B1, main image and inset) and Pax6 expression in the same optical section (Fig. 9B2). As evidenced by the merged images (Fig. 9B3), some cells within the cluster expressed Pax6. To quantify the population of BLBP⁺ cells that also expressed Pax6, we combined immunohistochemistry for these markers (Fig. 9C1-C3). We found that the vast majority of BLBP⁺ cells expressed Pax6 (486 of 493 BLBP⁺ cells). Conversely, most Pax6⁺ cells were also BLBP⁺ (486 of 548 Pax6⁺ cells). Together, these data indicate that the majority of BLBP⁺ cells in the lateral CG represent a neurogenic subtype of RGs. Our previous study (Fernández et al., 2002) showing that NeuN, a marker of mature neurons, colocalizes with BrdU after long survival times



Figure 8. BLBP ⁺ clusters contain dividing cells. *A*, Large cluster of dye-coupled cells containing a BrdU-labeled nucleus (arrow). The inset shows in another confocal plane of the same cluster a BrdU ⁺ nucleus close to the CC lumen. *B*, A small cluster of three cells (1) with two BrdU ⁺ nuclei (2). *C*, BLBP ⁺ group of cells (1) in the lateral CG. A BrdU ⁺ nucleus overlapped the BLBP ⁺ field (2). The merged images show that the BrdU ⁺ nucleus belonged to a BLBP ⁺ cell. All images are confocal optical sections. Scale bars: *A*, *B*, 5 μ m; *C*, 10 μ m.

(50-70 d), supports this possibility. Lineage analysis with retroviral vectors would help to define the potential of these precursors and to characterize their functional differentiation toward postmitotic cells.

Discussion

We show here that, in the turtle spinal cord, there is a niche in which cells proliferate actively and display properties of neural precursors. Proliferating cells concentrated on the lateral CG belonged to clusters electrically and metabolically coupled via Cx43. The bipolar morphology and expression of BLBP indicated that these cells represent a subtype of RGs (Pinto and Götz, 2007) with electrophysiological properties similar to precursors found in neurogenic zones of the forebrain (Noctor et al., 2002; Filippov et al., 2003; Wang et al., 2003; Liu et al., 2006). The expression of Pax6 supports the persistence of postnatal neurogenic domains, a property that may be related with the remarkable ability of low vertebrates to recover after spinal cord injury.

Cell proliferation and gap junction coupling

Although we found proliferating cells around all the CG, their number was significantly higher in the lateral quadrants. This may arise from different cell cycle lengths or just to a particular lateral location of proliferating cells. Although in this study we did not address possible differences in cell cycle length, our data suggest that proliferating cells in the medial and lateral quadrants of the CG are indeed different. Patch-clamp recordings revealed extensive dye coupling in the lateral CG only, suggesting electrical and metabolical coupling via gap junctions. Dye-coupled cell clusters had low $R_{\rm IN}$ and an electrophysiological phenotype dominated by leak currents, thus resembling the properties of precursor cells in the developing cortex (Noctor et al., 2001, 2002) and type-1 precursors in the adult hippocampus (Filippov et al., 2003). The low $R_{\rm IN}$ of clusters arose mainly from the number of coupled precursors because the $R_{\rm IN}$ of individual cells in the presence of carbenoxolone was about an order of magnitude higher than that of clusters, suggesting a rather high coupling coefficient among clustered cells.

Gap junction coupling seems a general feature among some precursors in the developing brain (Lo Turco and Kriegstein, 1991; Bittman et al., 1997) and the adult subventricular zone (Liu et al., 2006). Consistently, cell clusters in the spinal cord of the turtle appeared in the region with the highest density of BrdU⁺ cells, suggesting some relationship between proliferation of spinal precursors and gap junction coupling. This is supported by the fact that clusters contained mitotically active cells. Similar findings were reported in the ventricular zone of the developing cortex in which coupling is needed to allow cells entering the S-phase (Bittman et al., 1997). Our results suggest that gap junction couples and the suggest that gap junction couples are suggest that gap junction.



Figure 9. Pax6 is expressed in BLBP clustered cells. *A*, Pax6 expression matched the location of clusters of BLBP $^+$ cells. *B*, The combination of patch recording with biocytin staining (1) and immunocytochemistry for Pax6 (2) shows that clustered precursors expressed the transcription factor Pax6 (3). The inset in *B1* is a stack of sections showing the whole cluster of dye-coupled cells. The main images are confocal optical sections. *C*, BLBP (1) and Pax6 (2) expression in the CG. The merged images show that most BLBP $^+$ cells coexpressed Pax6 (3). Scale bars: *A*, 30 μ m; *B*, *C*, 20 μ m.

tion coupling may be a general mechanism related to the proliferation of precursors in different species and regions of the CNS.

Electrophysiological signature of clustered precursors

The $R_{\rm IN}$ of spinal precursor cells after uncoupling varied widely. Interestingly, the middle and high range of $R_{\rm IN}$ were similar to those reported in the postnatal subventricular zone for GFAP⁺ precursors (\approx 300 M Ω) (Liu et al., 2006) and neuronal progenitors (\approx 4 G Ω) (Wang et al., 2003), respectively. Like precursors in the subventricular zone of the adult rat (Wang et al., 2003; Liu et al., 2006) and the cortex of the mouse embryo (Bahrey and Moody, 2003), most cell clusters displayed a voltage-dependent TEA-sensitive current suggesting the presence of delayed K⁺ channels. However, some clustered cells had a passive behavior as in RGs of the ventricular zone (Noctor et al., 2002). Thus, clusters seem integrated by heterogeneous electrophysiological phenotypes, including cells displaying only leak currents coupled to others with various degrees of expression of a delayed rectifier.

The electrophysiological heterogeneity of clustered cells may reflect functional states related to different phases of the cell cycle, the dynamics of cell maturation or heterogeneity in neural precursors. For example, in mesenchymal stem cells, both the membrane potential and a delayed rectifier change during the cell cycle (Deng et al., 2007). K⁺ channels regulate cell proliferation, probably by regulating cell volume and membrane potential (Pardo, 2004). Indeed, delayed outward-rectifying K⁺ currents (Kv1.3 subunit) are essential for G_1/S transition and thus proliferation of oligodendrocyte progenitors (Chittajallu et al., 2002). It is tempting to speculate that a delayed rectifier may also play a part in the control of proliferation of spinal precursors, a possibility that remains to be experimentally tested.

Cx43 spatially delimits the domains of precursors

Connexins play an important role in the regulation of proliferation, migration, and differentiation (Bruzzone and Dermietzel, 2006), with both Cx43 and Cx26 expressing differentially during development (Nadarajah et al., 1997; Bittman and Lo Turco, 1999). Although Cx26 expressed in the CG, our results indicate that Cx43 played a major role in coupling spinal precursors. This finding is in line with the recognized role of Cx43 in maintaining neural progenitors in a proliferative state (Duval et al., 2002; Cheng et al., 2004).

Cx43 concentrated on the apical poles of RGs that contacted the lateral aspects of the CC, thus providing the molecular basis that determined the location of clusters. This adds to the molecular polarity of RGs (Chenn et al., 1998), which is thought to have critical functional consequences (Götz and Huttner, 2005). The apical segment of progenitors has been proposed to sense signals that regulate cell proliferation and differentiation (Alvarez-Buylla et al., 2001; Pinto and Götz, 2007). Thus, the

strong metabolical coupling of spinal precursors at their apical poles may allow an efficient communication of molecules regulating cell division or cellular differentiation (Bruzzone and Dermietzel, 2006). In addition, the apical pole of RGs has a set of molecules whose inheritance according to the plane of cleavage during division determines the fate of daughter cells (Götz and Huttner, 2005). We hypothesize that Cx43 in apical segments, is ideally located to be one of the key molecules whose symmetric or asymmetric inheritance may decide the fate of daughter cells. If the cleavage plane is not parallel to the RG main axis, one daughter cell may not inherit Cx43 and then will be uncoupled. This latter cell may differentiate to a postmitotic glia or neuron because uncoupling is correlated with differentiation (Duval et al., 2002; Bruzzone and Dermietzel, 2006). Connexins have been recently shown to be involved in migration of cells along RG processes in the developing cortex (Elias et al., 2007). In line with this, we observed dye-coupled cells intermingled with RG processes (Fig. 4 H, inset), suggesting that they may be cells migrating away from the CG. Cx43 and Cx26 may also affect the proliferation, migration, and differentiation of spinal precursors by nonconventional mechanisms via molecular interactions with a variety of proteins (Kardami et al., 2007). Interestingly, the role of connexins in migration during development is actually mediated

by facilitation of cell–cell adhesion and not by their functions as channels (Elias et al., 2007).

A neurogenic domain of RGs in the spinal cord

As in the postnatal brain of the mouse (Merkle et al., 2007), the distal projections of clustered RGs to spatially restricted loci may reflect some kind of positional information defining precursors with different potentialities. In a previous study, we showed that the distal endfeet of RGs have infolds suggesting some form of communication between RGs and the basal membrane (Trujillo-Cenóz et al., 2007). The apposition of the distal process with the subpial basal membrane is claimed to be important to maintain the neurogenic capabilities of precursor cells (Alvarez-Buylla and Lim, 2004). Therefore, the contact with the pia of some cells within biocytin-filled clusters fulfills another criterion of a neurogenic precursor.

RGs represent a heterogenous population showing diverse molecular signatures with different potential to proliferate and lineage differentiation (Campbell and Götz, 2002; Pinto and Götz, 2007). In the CG, BLBP expression matched the location of clusters of gap junction coupled cells, which formed a tridimensional network that enveloped immature neurons, a finding consistent with the intimate relationship needed for signaling between RGs and differentiating neurons (Feng and Heintz, 1995). It has been proposed that RGs expressing BLBP behave as bipotent or multipotent precursor cells (Hartfuss et al., 2001; Pinto and Götz, 2007), raising the possibility that clusters in the lateral quadrant of the CG represent discrete neurogenic domains. The fact that some BLBP + clustered cells also expressed Pax6, a transcription factor identified as a key regulator of the subset of neurogenic RGs (Heins et al., 2002; Pinto and Götz, 2007), supports our hypothesis of a neurogenic domain in the lateral CG. In the spinal cord, Pax6 is part of a transcriptional code defining progenitor domains from which subtypes of spinal neurons are generated (Lee and Pfaff, 2001). The expression of Pax6 in cells lining the CC decreases as development proceeds (Fu et al., 2003) and is not detected in the adult mammalian cord (Yamamoto et al., 2001). However, spinal cord injury induces the reexpression of Pax6 in ependymal cells and promotes cell division (Yamamoto et al., 2001). The fact that Pax6 expression persists in neurogenic niches of the adult mammalian brain (Kohwi et al., 2005; Nacher et al., 2005) suggests a role for this transcription factor in postnatal neurogenesis, and supports the idea that the turtle spinal cord preserves the remarkable plasticity to generate new neurons for integration to already operating spinal circuits.

References

- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron 41:683–686.
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. Nat Rev Neurosci 2:287–293.
- Bahrey HL, Moody WJ (2003) Voltage-gated currents, dye and electrical coupling in the embryonic mouse neocortex. Cereb Cortex 13:239–251.
- Barry PH, Diamond JM (1970) Junction potentials, electrode standard potentials, and other problems in interpreting electrical properties in membranes. J Membr Biol 3:93–122.
- Bittman K, Owens DF, Kriegstein AR, Lo Turco JJ (1997) Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. J Neurosci 17:7037–7044.
- Bittman KS, Lo Turco JJ (1999) Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. Cereb Cortex 9:188–195.
- Bruzzone R, Dermietzel R (2006) Structure and function of gap junctions in the developing brain. Cell Tissue Res 326:239–248.
- Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. J Comp Neurol 435:406–417.

Campbell K (2003) Signaling to and from radial glia. Glia 43:44-46.

- Campbell K, Götz M (2002) Radial glia: multipurpose cells for vertebrate brain development. Trends Neurosci 25:235–238.
- Cheng A, Tang H, Cai J, Zhu M, Zhang X, Rao M, Mattson MP (2004) Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. Dev Biol 272:203–216.
- Chenn A, Zhang YA, Chang BT, McConnell SK (1998) Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. Mol Cell Neurosci 11:183–193.
- Chittajallu R, Chen Y, Wang H, Yuan X, Ghiani CA, Heckman T, McBain CJ, Gallo V (2002) Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G₁/S phase progression of the cell cycle. Proc Natl Acad Sci USA 99:2350–2355.
- Danilov AI, Covacu R, Moe MC, Langmoen IA, Johansson CB, Olsson T, Brundin L (2006) Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis. Eur J Neurosci 23:394–400.
- Deng XL, Lau CP, Lai K, Cheung KF, Lau GK, Li GR (2007) Cell cycledependent expression of potassium channels and cell proliferation in rat mesenchymal stem cells from bone marrow. Cell Prolif 40:656–670.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subgerminal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci 17:5046–5061.
- Duval N, Gomes D, Calaora V, Calabrese A, Meda P, Bruzzone R (2002) Cell coupling and Cx43 expression in embryonic mouse neural progenitor cells. J Cell Sci 115:3241–3251.
- Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR (2007) Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. Nature 448:901–907.
- Feng L, Heintz N (1995) Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. Development 121:1719–1730.
- Feng L, Hatten ME, Heintz N (1994) Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. Neuron 12:895–908.
- Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenoz O (2002) Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. J Comp Neurol 458:293–306.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. Mol Cell Neurosci 23:373–382.
- Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Hu X, Liu Z, Jensen J, Qiu M (2003) Molecular mapping of the origin of postnatal spinal cord ependymal cells: evidence that adult ependymal cells are derived from Nkx6.1+ ventral progenitor cells. J Comp Neurol 456:237–244.
- Götz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. Nat Rev Mol Biol 6:777–788.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. Dev Biol 229:15–30.
- Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Gotz M (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. Nat Neurosci 5:308–315.
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH (2000) Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. J Neurosci 20:2218–2228.
- Kardami E, Dang X, Iacobas DA, Nickel BE, Jeyaraman M, Srisakuldee W, Makazan J, Tanguy S, Spray DC (2007) The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. Prog Biophys Mol Biol 94:245–264.
- Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A (2005) Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. J Neurosci 25:6997–7003.
- Lee SK, Pfaff SL (2001) Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. Nat Neurosci 4:1183–1191.
- Lima-de-Faria A, Jaworska H (1968) Late DNA síntesis in heterochromatin. Nature 217:138–142.
- Liu X, Bolteus AJ, Balkin DM, Henschel O, Bordey A (2006) GFAPexpressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. Glia 54:394–410.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. Nat Rev Neurosci 7:179–193.
- Lo Turco JJ, Kriegstein AR (1991) Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. Science 252:563–565.

- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A (2007) Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. Science 317:381–384.
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci 28:223–250.
- Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M (2004) Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. Development 131:3133–3145.
- Mothe AJ, Tator CH (2005) Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. Neuroscience 31:177–187.
- Nacher J, Varea E, Blasco-Ibanez JM, Castillo-Gomez E, Crespo C, Martinez-Guijarro FJ, McEwen BS (2005) Expression of the transcription factor Pax 6 in the adult rat dentate gyrus. J Neurosci Res 81:753–761.
- Nadarajah B, Jones AM, Evans WH, Parnavelas JG (1997) Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. J Neurosci 17:3096–3111.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 409:714–720.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J Neurosci 22:3161–3173.
- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. J Neurocytol 18:311–318.

- Pardo LA (2004) Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. Physiology 19:285–292.
- Pinto L, Götz M (2007) Radial glial cell heterogeneity—the source of diverse progeny in the CNS. Prog Neurobiol 83:2–23.
- Russo RE, Fernández A, Reali C, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O (2004) Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurons in the turtle spinal cord. J Physiol (Lond) 560:831–838.
- Sáez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MV (2005) Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. Biochim Biophys Acta 1711:215–224.

Sauer FC (1935) Mitosis in the neural tube. J Comp Neurol 62:377-405.

- Taupin P (2007) BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. Brain Res Rev 53:198–214.
- Trujillo-Cenóz O, Fernández A, Radmilovich M, Reali C, Russo RE. (2007) Cytological organization of the central gelatinosa in the turtle spinal cord. J Comp Neurol 502:291–308.
- Wang DD, Krueger DD, Bordey A (2003) Biophysical properties and ionic signature of neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone in situ. J Neurophysiol 90:2291–2302.
- Wurmser AE, Palmer TD, Gage FH (2004) Cellular interactions in the stem cell niche. Science 304:1253–1255.
- Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, Takebayashi H, Nabeshima Y, Kitamura T, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M (2001) Transcription factor expression and Notchdependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. J Neurosci 21:9814–9823.

GABAergic signalling in a neurogenic niche of the turtle spinal cord

Cecilia Reali¹, Anabel Fernández^{1,3}, Milka Radmilovich^{1,2}, Omar Trujillo-Cenóz¹ and Raúl E. Russo¹

¹Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, CP11600, Montevideo, Uruguay ²Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Avenida Gral. Flores 2125, CP 11800, Montevideo, Uruguay ³Unidad Asociada Neuroanatomía Comparada, Facultad de Ciencias, UdelaR, Igua 4225, CP11400, Montevideo, Uruguay

Non-technical summary Neurogenesis is tightly regulated by epigenetic factors that assure the correct assembly of neural circuits. Neurotransmitters play a fundamental role in this type of control. We show that GABA signals on progenitors and immature neurones within a neurogenic niche around the central canal (CC) of the turtle spinal cord. GABA depolarized progenitors whereas the effect on immature neurones varied from excitation to inhibition. In both cell types GABA_A receptor activation induced an increase in intracellular calcium. Our findings imply that GABAergic signalling around the CC shares fundamental properties with those in the embryo and adult neurogenic niches in the brain, suggesting that GABA is part of the mechanisms regulating the GABAergic modulation of progenitors and neuroblasts may provide useful clues about key mechanisms needed for functional neurogenesis in the spinal cord.

Abstract The region that surrounds the central canal (CC) in the turtle spinal cord is a neurogenic niche immersed within already functional circuits, where radial glia expressing brain lipid binding protein (BLBP) behave as progenitors. The behaviour of both progenitors and neuroblasts within adult neurogenic niches must be regulated to maintain the functional stability of the host circuit. In the brain, GABA plays a major role in this kind of regulation but little is known about GABAergic signalling in neurogenic niches of the postnatal spinal cord. Here we explored the action of GABA around the CC of the turtle spinal cord by combining patch-clamp recordings of CC-contacting cells, immunohistochemistry for key components of GABAergic signalling and Ca²⁺ imaging. Two potential sources of GABA appeared around the CC: GABAergic terminals and CC-contacting neurones. GABA depolarized BLBP⁺ progenitors via GABA transporter-3 (GAT3) and/or GABA_A receptors. In CC-contacting neurones, GABA_A receptor activation generated responses ranging from excitation to inhibition. This functional heterogeneity appeared to originate from different ratios of activity of the $Na^+-K^+-2Cl^-$ co-transporter (NKCC1) and the K⁺–Cl⁻ co-transporter (KCC2). In both progenitors and immature neurones, GABA induced an increase in intracellular Ca²⁺ that required extracellular Ca²⁺ and was blocked by the selective GABA_A receptor antagonist gabazine. Our study shows that GABAergic signalling around the CC shares fundamental properties with those in the embryo and adult neurogenic niches, suggesting that GABA may be part of the mechanisms regulating the production and integration of neurones within operational spinal circuits in the turtle.

(Received 17 June 2011; accepted after revision 9 September 2011; first published online 12 September 2011) **Corresponding author** R. E. Russo: Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas, Clemente Estable, Avenida Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay. Email: rrusso@iibce.edu.uy

Abbreviations BLBP, brain lipid binding protein; CC, central canal; E_{GABA} , reversal potential for GABA-induced currents; E_K , equilibrium potential for K⁺; GAT1, GABA transporter-1; GAT3, GABA transporter-3; GAD, glutamic acid decarboxylase; KCC2, K⁺–Cl⁻ co-transporter; NKCC1, Na⁺–K⁺–2Cl⁻ co-transporter; RG, radial glia; V_m , membrane potential; SVZ, subventricular zone.

Introduction

Neurogenesis involves processes such as the proliferation of neurogenic progenitors and the migration, differentiation and integration of neuroblasts into developing or mature circuits. These events are tightly regulated not only by genetic programmes but also by epigenetic factors that assure the correct assembly of circuits (Spitzer, 2006; Ben-Ari & Spitzer, 2010). A key component of this epigenetic control is the activity-dependent regulation of both progenitors and neuroblasts by signalling via neurotransmitters (Nguyen et al. 2001; Ma et al. 2009). In the developing brain, GABA plays a central role in this type of regulation by providing an excitatory drive that controls various neurogenic steps (Ben-Ari, 2002; Owens & Kriegstein, 2002; Ben-Ari et al. 2007). Although recent studies suggest that GABA seem to have similar roles in neurogenic niches of the adult brain (Ge et al. 2006; Bordey, 2007), there is no information regarding GABAergic signalling in potential neurogenic niches of the spinal cord.

During early stages of spinal cord development, dynamic transcriptional codes in the neural tube define progenitor domains from which subtypes of spinal neurones originate (Lee & Pfaff, 2001). The cells lining the central canal (CC) of the adult spinal cord derive from the ventral part of the neural tube (Fu et al. 2003) and retained some properties of the primitive progenitors (Tanaka & Ferreti, 2009). Indeed in the mammalian spinal cord, ependymal cells are able to proliferate (Johansson et al. 1999; Meletis et al. 2008), although they fail to differentiate into neurones (Horner et al. 2000). However, under some conditions progenitors around the CC of mammals can generate new neurones (Danilov et al. 2006), as normally occurs in lower vertebrates (Tanaka & Ferretti, 2009). In the turtle spinal cord, a population of radial glia (RG) expressing brain lipid binding protein (BLBP) and the transcription factor Pax6 proliferate actively (Russo et al. 2008), suggesting they belong to a domain of neurogenic precursors (Pinto & Götz, 2007). These progenitors are intermingled with immature neurones with functional traits resembling different stages of maturation (Russo et al. 2004). Thus, the spinal cord of turtles represents a unique model system to study the signalling via neurotransmitters that may homoeostatically regulate neurogenesis in a niche immersed within already functional circuits.

The presence of GABAergic terminals (Trujillo-Cenóz *et al.* 2007) around the CC and the fact that CC-contacting neurones receive functional GABAergic contacts (Russo *et al.* 2004) led us to hypothesize that GABA may signal on spinal progenitors and neuroblasts in a way similar to other neurogenic niches (Bordey, 2007). Here, we aimed at exploring GABAergic signalling around the CC by combining patch-clamp recordings of CC-contacting

cells, immunohistochemistry and Ca²⁺ imaging. We found that GABA depolarized BLBP⁺ progenitors whereas the effect on CC-contacting neurones varied from excitation to inhibition. In both cell types GABA_A receptor activation induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$. Our findings represent the first evidence that GABAergic signalling around the CC shares fundamental properties with those in the embryo and adult neurogenic niches in the brain, suggesting that GABA may be part of the epigenetic mechanisms regulating the production and integration of neurones to operational circuits in the turtle spinal cord.

Methods

Ethical approval

All experimental procedures were performed in accordance with the ethical guidelines established by our local Committee for Animal Care and Research at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Every precaution was taken to minimize animal stress and the number of animals used.

General

Data were obtained from 52 juvenile turtles (*Trachemys dorbignyi*; 5–7 cm carapace length). The animals were maintained in temperate aquaria ($24-26^{\circ}C$) under natural illumination and fed daily with small earthworms. From a sensory-motor point of view, juvenile turtles are undistinguishable from adult specimens. Previous studies (Reali & Russo, 2005) showed that the electrophysiological phenotypes of neurones in juvenile animals are identical to those found in adult turtles (Russo & Hounsgaard, 1996*a*,*b*).

Slice preparation and electrophysiology

Turtles rendered torpid by hypothermia induced by immersion in crushed ice for 1.5–2 h (Melby & Altman, 1974; Alaburda *et al.* 2005) were decapitated and the blood was removed by intraventricular perfusion with Ringer solution (6°C). The cervical enlargement of the spinal cord was dissected out and transverse 300 μ m-thick slices were cut, placed in a chamber (1 ml volume), and superfused (1 ml min⁻¹) with Ringer solution of the following composition (in mM): 96.5 NaCl, 2.6 KCl, 31.5 NaHCO₃, 3 CaCl₂, 2 MgCl₂, and 10 glucose. The solution was saturated with 5% CO₂ and 95% O₂ to attain pH 7.6. All experiments were performed at room temperature (20–22°C). Cells were visualized with differential interference contrast optics (DM LFS; Leica, Wetzlar, Germany) with a 40× (0.8 numerical aperture) objective.

Patch-clamp whole-cell recordings were made with electrodes filled with the following solution (in mM): 122 potassium gluconate, 5 Na₂-ATP, 2.5 MgCl₂, 0.003 CaCl₂,

1 EGTA, 5.6 magnesium gluconate, 5 K-Hepes, 5 H-Hepes, 10 biocytin and 0.25 Alexa 488, pH 7.4, 5–10 MΩ. To study the physiological effects of GABA, we made perforated patch recordings using the cation-selective ionophore gramicidin, which does not interfere with [Cl⁻]; (Myers & Haydon, 1972). Gramicidin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was dissolved in DMSO (Sigma-Aldrich; 5 mg ml⁻¹, stored at -20° C), diluted (5 μ g ml⁻¹) in pre-filtered intracellular solution and used within 2 h after preparation. To facilitate the gigaseal formation, the tip of the electrode was filled with gramicidin free patch solution by brief $(\sim 1-2 \text{ s})$ immersion of the back of the pipette into the solution. Stable perforated recordings ($<70 \text{ M}\Omega$ series resistances) were obtained in 15-30 min. Two methods were used to confirm that recordings were made in the perforated patch configuration: (1) using a patch solution containing Alexa 488 (250 μ M) the dye would diffuse into the cell only when the perforated patch changed into a whole-cell configuration, and (2) using a high concentration of Cl⁻ in the patch solution (122 mM KCl), rupture of the patch would be indicated by the appearance of a large inward current reversing around +6 mV, as predicted by the Nernst equation.

To estimate the cell membrane potential (V_m) without the error introduced by the shunt through the seal (Fricker *et al.* 1999; Verheugen *et al.* 1999; Wang *et al.* 2003), we measured the reversal potential of K⁺ currents in cell-attached patches. With 158 mM K⁺ in the pipette solution, which is close to the estimated $[K^+]_i$ in other cell types (Hille, 2001), the equilibrium potential for K⁺ (E_K) across the patch would be around 0 mV and thus the holding potential at which the K⁺ current reverses direction gives a non-invasive measure of V_m . To activate voltage-gated K⁺ channels we applied voltage ramps (-140 to +200 mV). E_K was measured from the intersection between the K⁺ current and the fit to the linear component.

Current and voltage clamp recordings were performed with a Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Stimulation protocols and acquisition were done with pCLAMP10 (Molecular Devices), which was also used for further analysis. Series resistance and whole-cell capacitance were not compensated. In voltage clamp mode, cells were held at -70 mV (unless otherwise stated) and the resting membrane potential was estimated from the current–voltage relationship (at I = 0). Liquid junction potentials were determined and corrected (Barry and Diamond, 1970). Values are expressed as the mean \pm SEM.

Drug applications

GABA (0.1–1 mM), baclofen (50 μ M) and muscimol (30–60 μ M) were dissolved in Ringer solution and puff

applied using a Picospritzer III (Parker Instrumentation, Fairfield, NJ, USA) with a patch pipette $(2 \mu m \text{ in }$ tip diameter) placed at $15-20 \,\mu\text{m}$ from the soma of the recorded cell. In progenitor cells, the time of GABA application varied from 400 ms to 3 s to optimize the GABA-induced response. For CC-contacting neurones, 40-50 ms puffs of GABA were enough to elicit robust responses. In some experiments, the following drugs were added to the bath: tetrodotoxin (TTX, $1 \mu M$; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) to block Na⁺ channels; gabazine (10–20 μ M, Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) and bicuculine (40 μ M, Sigma-Aldrich) to block GABA_A receptors; nipecotic acid (0.1–1 mM, Tocris) or (S)-SNAP 5114 (100 μ M, Sigma-Aldrich) to block GABA transporter currents; bumetanide (10–20 μ M, Sigma-Aldrich) and furosemide $(50-200 \,\mu\text{M}, \text{Sigma-Aldrich})$ to block cation chloride co-transporters, carbenoxolone (100 μ M, Sigma-Aldrich) to block gap junctions, 6,7-dinitro-quinoxaline-2,3-dione (DNQX; 20 µm; Tocris) to block AMPA receptors and DL-AP-5 (50 μ M, Tocris) to block NMDA receptors.

Morphological identification of recorded cells

Cells were first visualized in living slices by injecting Alexa 488 and the resulting images were acquired with an FG7 frame grabber (Scion Instruments, Frederick, MD, USA) using NIH ImageJ. Slices were then fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) and to better analyse the morphology of cells, biocytin was revealed by using streptavidin conjugated with different fluorophores (Russo *et al.* 2008). In selected cases, slices were treated with different primary and secondary antibodies as described below. The slices were whole-mounted and examined with a confocal microscope (FV 300; Olympus, Tokyo, Japan).

Ca²⁺ imaging

CC-contacting cells were filled with the calcium indicator Fluo-4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by puff application (Picospritzer III, Parker Instrumentation) of the acetoxymethyl ester form (Fluo4-AM, 15–20 μ M) dissolved in 0.007% of pluronic acid (Invitrogen) and 0.3% DMSO (Sigma-Aldrich). Alternatively, single cell electroporation of the Fluo-4 K⁺ salt (200–500 μ M) dissolved in intracellular solution that lacked EGTA was performed by applying two voltage pulses (10 ms, 10 V) with a patch pipette placed on the surface of CC-contacting cells. Excitation was performed with a fluorescent source (EL 6000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a shutter controlled by TTL pulses. The filters for Ca²⁺ imaging were as follows:

excitation filter 470 ± 40 nm; dichromatic mirror 500 nm; emission filter 525 ± 50 nm (Leica Microsystems, Weztlar; Germany). Time lapse imaging was performed with ImageJ (NIH) with a plug-in to use a frame grabber (LG7, Scion Instruments) attached to a CCD camera (TM-300, Pulnix, Hampshire, UK). Images were captured at 1–5 s intervals and adjusted to minimize background and avoid saturation. Intensity measurements were done with ImageJ (NIH) for defined regions of interest (ROI) and expressed as the change of fluorescence relative to background fluorescence ($\Delta F/F_0$).

Immunohistochemistry

Animals were anaesthetized $(50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pentobarbital};$ I.P.) and fixed by intracardiac perfusion with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB (pH 7.4) after removing the blood with isotonic saline solution (pH 7.4). For GABA immunostaining, turtles were fixed in 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in 0.1 M PB (pH 7.4). Tissues were sectioned with a vibrating-blade microtome (60–80 μ m) and placed in PB with 0.5% bovine serum albumin for 30 min and then incubated with the primary antibodies diluted in PB with 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). The following primary antibodies were used: (1) anti-GABA (rabbit polyclonal, 1:100; no. 20094, Immunostar, Hudson, WI, USA); (2) anti-HuC/D (mouse monoclonal, 1:100; no. A-21271, Molecular Probes, Eugene, OR, USA); (3) anti-BLBP (rabbit polyclonal, 1:1000; no. AB9558, Millipore, Temecula, CA, USA); (4) anti-GAD-65/67 (C-20) (goat polyclonal antibody, 1:200; no. sc-7513, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); (5) anti-NKCC1 (T4, mouse monoclonal, 1:10; Developmental Studies Hybridoma Bank); (6) anti-KCC2 (rabbit polyclonal, 1:1000; no. 07-432, Millipore); (7) anti-GABA transporter-3 (GAT3, rabbit polyclonal, 1:200; no. AB1574, Millipore); (8) anti-GABA transporter-1 (GAT1; rabbit polyclonal, 1:500; no. AB1570W, Millipore); and (9) anti-S100 (β subunit) (mouse monoclonal, 1:500, no. S2532, Sigma). After washing in PB, tissues were incubated in secondary antibodies conjugated with Alexa fluorophores (Invitrogen). The Zenon labelling kit (Invitrogen) was used for HuC/D when this antibody was combined with anti-NKCC1. In co-labelling experiments, Alexa 488 and 633 were used to avoid cross-talk. Control experiments were performed by omitting or replacing primary or secondary antibodies with pre-immune normal serum. In these experiments no detectable staining was observed. The histological material was visualized by confocal microscopy (FV 300; Olympus, Tokyo, Japan). The images were acquired with Fluoview 5 (Olympus) and then exported to Photoshop 7 or Corel Draw for image adjustment.

Results

GABA around the CC

GABA released from neuroblasts (Wang et al. 2003; Hack et al. 2005) or from neighbouring GABAergic interneurones (Tozuda et al. 2005) regulates neurogenesis in the embryo and the adult brain (Bordey, 2007). To explore the possible source of GABA around the CC, we made immunohistochemistry for GABA and its synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD). We found numerous GAD⁺ terminals around the CC (Fig. 1A). On the lateral aspects of the CC, many of the terminals were in close apposition with cell bodies (Fig. 1A, main panel and upper inset) and processes of BLBP⁺ progenitors (Fig. 1A, main panel and lower inset). Immunoreactivity for GAD was absent or very weak in most CC-contacting cells. However, a few cells located on the dorso-lateral aspect of the CC were positive for GAD (Fig. 1A, arrowheads; Ba, arrows). GAD⁺ cells were identified as neurones because they co-expressed the early neuronal marker HuC/D (Fig. 1Ba-c, arrows). In contrast to the weak expression of GAD, many CC-contacting cells stained positive for GABA (Fig. 1*Ca*). Most GABAergic cells around the CC (159 out of 177 cells) are identified as belonging to the neuronal lineage because they expressed HuC/D (Fig. 1*Ca*–*c*).

GABA-induced currents in progenitor cells

In the subventricular zone (SVZ), tonic activation of GABA receptors has an important role in the regulation of the proliferative capacity of progenitors (Liu et al. 2005; Bordey, 2007). Our immunohistochemical studies suggest that GABA may also signal on CC-contacting progenitors. To explore this possibility, we made patch-clamp recordings of progenitors on the lateral aspects of the CC and focally applied GABA. Figure 2A shows the typical electrophysiological phenotype of CC-contacting BLBP⁺ progenitors which is dominated by leak currents (Fig. 2Aa; see Russo et al. 2008). These cells were electrically coupled as revealed by dye coupling of Alexa 488 (Fig. 2Ab). As expected, these clusters of cells were in close proximity with GAD^+ terminals (Fig. 2*Ab*, inset). In line with these findings, the majority of clustered progenitors (48 out of 59) responded to GABA generating small depolarizations from rest (Fig. 2Ba and Ca). In 26 out of 57 progenitors, GABA generated inward currents (Fig. 2Bb) that did not reverse at membrane potentials from -100 to +20 mV (Fig. 2Bc). In the remaining cases (31 out of 57), we found currents (Fig. 2Cb) that reversed between -75 and -27 mV (-49.1 ± 4.3 mV, n = 31; Fig. 2*Cc*). In all cases, GABA had a depolarizing effect because the resting membrane potentials of CC-contacting progenitors were more negative $(-85.6 \pm 2.5 \text{ mV}, n = 31)$ than the reversal potential for GABA-induced currents (E_{GABA}).

Because CC-contacting progenitors are electrically coupled via gap junctions (Russo *et al.* 2008), GABA-induced currents may be contributed by the recorded cell and/or by their coupled neighbours. The gap junction blocker carbenoxolone (100 μ M) uncoupled the recorded cell (Fig. 2*Da*) and reduced the amplitude of GABA currents, producing a shift of E_{GABA} toward hyperpolarized potentials (Fig. 2*Db*, 13.2 ± 2.6 mV, n = 5). In a minority of cases (2 out of 8), carbenoxolone suppressed non-reversing GABA-induced currents (Fig. 2*Dc*), indicating the current originated from neighbours coupled to the recorded cell. In the remaining cases the amplitude of the transporter current decreased (4 out of 8) or unmasked a small reversing GABA-induced current (2 out of 8, data not shown).

The data in Fig. 2 suggest different mechanisms for GABA-induced currents. To explore the mechanisms of GABA-induced currents in CC-contacting progenitors, we bath applied nipecotic acid – a non-selective blocker of GABA transporters (GAT) – and the selective GABA_A receptor antagonists gabazine and bicuculline. In 7 out of 15 clustered progenitors, GABA-induced currents had components mediated by GAT and GABA_A receptors since the current was reduced by nipecotic acid (1 mM) and

gabazine (20 μ M) and abolished when both drugs were applied together (Fig. 3*A*). In other cases (4 out of 15 cells), the currents were mediated only by GAT because they were blocked by nipecotic acid (1 mM) but not by gabazine (20 μ M) (Fig. 3*B*). In the remaining cells (4 out of 15) GABA-induced currents were abolished by gabazine (20 μ M) or bicuculine (40 μ M) (Fig. 3*C*).

Progenitor cells in the adult SVZ express GAT3/4 transporters (Bolteus & Bordey, 2004). Thus, to test whether GABA-induced currents sensitive to nipecotic acid may be mediated by GAT3 we used the selective antagonist SNAP 5114. We found that SNAP 5114 (100 μ M) abolished non-reversing GABA-induced currents (Fig. 3*Da*, *n* = 4). In line with these results, immunohistochemistry against GAT3 and the glial and ependymal cell marker S100 –which is also expressed in BLBP⁺ cells (Trujillo-Cenóz *et al.* 2007) – showed that on the lateral aspects of the CC, cells immunoreactive for S100 also expressed GAT3 (Fig. 3*Db*, arrows).

The fact that E_{GABA} values were more depolarized than expected (-78 mV, calculated from the Nernst equation) suggested a robust mechanism for Cl⁻ accumulation in BLBP⁺ progenitor cells. Because the excitatory effect of GABA during development is mostly due to the activity



Figure 1. Source of GABA around the CC

A, immunohistochemistry for GAD-65/67 (red) and brain lipid binding protein (BLBP, green). A plexus of GAD⁺ terminals surrounds the CC. A few CC-contacting cells on the dorso-lateral aspect of the CC stained positive for GAD (arrowheads). Many GAD⁺ terminals were in close apposition with either proximal (upper inset, arrows) or distal (lower inset, arrow) processes of BLBP⁺ cells. *B*, immunohistochemistry for GAD shows strongly reactive terminals around the CC and a weaker expression of GAD in the cytoplasm of a few cells located on the dorsal aspect of the CC (arrows in *a*). These GAD⁺ cells expressed the early neuronal marker HuC/D (arrows in *b*). However, notice that most HuC/D⁺ cells around the CC were GAD⁻ (*a*-*c*). *C*, in contrast to GAD expression, the CC is surrounded by a large number of cells containing GABA (*a*) which also expressed HuC/D (*b* and *c*). Main panel in *A*, *B* and *C* are confocal optical sections. Upper and lower insets are stacks of 10 optical sections. Scale bars: *A*, main panel 20 μ m, upper and lower insets, 10 μ m; *B* and *C*, 10 μ m. CC: central canal.

of a Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter (NKCC1) (Owens & Kriegstein, 2002; Spitzer, 2010), we carried out immunohistochemistry for NKCC1. The antibody we used (T4, DSHB) specifically recognizes NKCC1 in the central nervous system because blocking NKCC1 expression by RNA interference eliminates the immunostaining in both newborn dentate granule cells (Ge et al. 2006) and immature cortical neurones (Wang & Kriegstein, 2008). In addition, immunostaining with this antibody in the retina is present in wild-type but not in NKCC1 knockout mice (Li et al. 2008). As shown in Fig. 3Ea, NKCC1 expressed around the CC and particularly in the endfeet of BLBP⁺ progenitors in contact with the CC lumen. In agreement with this, the selective NKCC1 antagonist bumetanide $(20 \,\mu\text{M})$ shifted E_{GABA} toward hyperpolarized potentials (Fig. 3*Eb* and *Ec*, average shift -9.4 ± 1.8 mV, n = 7).

GABA-induced currents in CC-contacting neurones

We speculated that as the region surrounding the CC is a neurogenic niche (Fernández *et al.* 2002; Russo *et al.* 2004, 2008), GABA signalling should reflect the different degrees of maturation of CC-contacting neurones. To test this idea, we analysed the responses of CC-contacting neuro-

nes to focal application of GABA. Conventional whole-cell patch-clamp recordings showed that GABA (n = 11) or the GABA_A selective agonist muscimol (n = 10, data not shown) generated currents that reversed between -81 and $-49 \text{ mV}(-65.5 \pm 4.2, n = 18)$ in all CC-contacting neurones (Fig. 4A-C). GABA-induced currents were mediated entirely by GABA_A receptor activation because they were abolished by gabazine (Fig. 4D; $20 \,\mu\text{M}$, n=3) or bicuculline (40 μ M, n = 2; data not shown). Focal application of 50 μ M baclofen – a GABA_B receptor agonist - did not produce any effect on CC-contacting neurones (n=8), data not shown). In neuroblasts of the adult mammalian brain, GABAA receptors are tonically activated by ambient GABA (Ge et al. 2006; Bordey, 2007). Similarly, we found that application of gabazine $(20 \,\mu\text{M})$ blocked a tonic current in CC-contacting neurones (n = 11; Fig. 4*E*).

GABA acts as an excitatory transmitter in immature neurones, shifting to an inhibitory action as neurones complete their differentiation (Ben-Ari, 2002; Owens & Kriegstein, 2002; Cherubini *et al.* 2010). If CC-contacting neurones are in different stages of maturation, then it is reasonable to speculate that GABA should produce heterogeneous effects. To test the actual effect of GABA on



Figure 2. GABA effects on CC-contacting progenitors

A, current responses to a series of voltage steps recorded in whole-cell mode (a). After recording, the cell appeared dye coupled with neighbouring cells (*b*). Notice the close proximity of GAD terminals to the cluster of dye coupled cells (*b*, main panel and inset). *B*, progenitors were depolarized by transient application of GABA (400 ms, 1 mm; a). In some progenitors GABA-induced inward currents (*b*) did not reverse at membrane potentials from –100 to +20 mV (*c*). *C*, in other clusters of progenitors, the depolarization induced by GABA (a) was generated by currents (*b*) that had clear reversal potentials (*c*). *D*, the gap junction blocker carbenoxolone (100 μ M) increased the apparent input resistance (a) and decreased a GABA-induced current, shifting the reversal from –49 to –60 mV (*b*). In a few cases, the GABA-induced current disappeared in the presence of carbenoxolone (*c*). Holding potential in *Db* and *c*, –100 mV. *Ab*, confocal optical section. Scale bar in *Ab*: main panel, 20 μ m; inset, 3 μ m.

CC-contacting neurones, we made gramicidin perforated patch-clamp recordings. GABA-induced currents in CC-contacting neurones (Figs 5Aa and 6Aa) reversed between -34 and -81 mV ($-56.1 \pm 1.9 \text{ mV}$, n = 41, see Figs 5Ab and 6Ab) and as expected, were abolished by gabazine (n = 9, Figs 5Ac, inset and 6Ac lower trace). In 18 out of 46 cells, GABA produced a depolarization from rest (Fig. 5Ac) that in some cases was strong enough to generate spike firing (Fig. 5*Ca*, 6 out of 18). GABA hyperpolarized from rest the remaining cells recorded with the perforated patch-clamp technique (28 out of 46, Fig. 6Ac). To confirm the recordings were done in the perforated patch configuration, we routinely excited the Alexa 488 contained in the pipette and observed no diffusion into the cell (Fig. 5Ba). After rupturing the patch the dye quickly filled the recorded cell and confirmed it contacted the CC lumen (Fig. 5Bb). As an alternative approach to evaluate GABA-induced excitation, we applied GABA in the cell-attached configuration. Under these conditions,

application of GABA generated spike firing in 4 out of 12 cells (Fig. 5*Cb*). The complete blockade of GABA-induced currents by gabazine suggested that, unlike progenitors, there are no GABA transporters in CC-contacting neurones. In support of this interpretation, the neuronal GABA transporter GAT1 was expressed in the ventral and dorsal horn but not in the region surrounding the CC (data not shown).

Most CC-contacting neurones hyperpolarized by GABA (18 out of 25) fired action potentials repetitively (Fig. 6Aa and c), suggesting they may be cells in more advanced stages of differentiation (see discussion). In line with this, some CC-contacting neurones inhibited by GABA expressed GAD (Fig. 6Ba-c, arrow), another element favouring a more differentiated stage for these cells.

Because the input resistance of CC-contacting neurones (\sim 1–4 G Ω) is close to the resistance of the seal (\sim 4–18 G Ω), it is likely that the resting membrane





A, GABA-induced currents with components sensitive to the GABA transporter blocker nipecotic acid (1 mM, nip. ac.) and gabazine (20 μ M). Application of nipecotic acid and gabazine together blocked the response. *B*, in cells in which the GABA-induced currents had no reversal, the response was blocked by nipecotic acid (1 mM) and not affected by gabazine (20 μ M). *C*, in a third class of progenitors, the GABA-induced currents were abolished by the GABA_A receptor antagonists gabazine (20 μ M) or bicuculline (40 μ M). *D*, addition of the specific GAT3 antagonist SNAP 5114 (100 μ M) blocked a non-reversing GABA-induced current (*a*). Double immunostaining showed expression of GAT3 (*b*) in S100 cells (arrows in *b*) close to the CC lumen. *E*, NKCC1 (*a*) was strongly expressed in the apical processes of BLBP (*b*) immunoreactive cells. The NKCC1 blocker bumetanide (20 μ M) shifted the reversal of GABA-induced currents toward hyperpolarized potentials (*b* and *c*). All the recordings were made in whole-cell mode at a holding potential of –100 mV. *Db* and *Ea*, stacks of 10 optical sections. Scale bars: 5 μ m.

potential was underestimated in our study due to the shunt to ground through the seal (Tyzio *et al.* 2003). To overcome this problem, we measured the reversal potential of K^+ currents in cell-attached mode (assuming 150 mM K^+ in the patch solution gives a symmetric K^+ concentration) to estimate the resting membrane potential (Fig. 7*A*; see Wang *et al.* 2003). We found that the resting potential was more hyperpolarized (19.5 ± 2.7 mV, n = 6) than that measured with perforated patch recordings implying that in most cases GABA depolarizes CC-contacting neurones from rest (Fig. 7*B*).

The depolarizing action via GABA_A receptors is due to a high [Cl⁻]_i attained by the co-transporter NKCC1 which is counteracted by the extrusion of Cl⁻ by KCC2 (Ben-Ari, 2002; Spitzer, 2010). Thus, the actual effect of GABA would be determined by the balance of NKCC1 and KCC2 in CC-contacting neurones. Figure 7*C* shows that in many cells (14 out of 17) the selective NKCC1 antagonist bumetanide (20 μ M) shifted E_{GABA} to more hyperpolarized potentials (-56.5 ± 2.4 mV to -64.7 ± 2.2 mV; *P* < 0.004, Wilcoxon's matched pairs test, *n*=14; Fig. 7*Ca*-*c*). To check whether KCC2 could be active in cells with relatively hyperpolarized E_{GABA} (\geq -55 mV), we applied the non-selective antagonist of cation chloride co-transporters furosemide (Payne *et al.* 2003). In 5 out of



Figure 4. CC-contacting neurones have functional GABA_A receptors

A, voltage responses to a series of current steps in a CC-contacting neurone. Notice the ability to generate repetitive fast spikes. *B* and *C*, a brief puff of GABA (40 ms, 100 μ M) in this cell generated currents (*B*) that reversed at -70 mV (*C*). *D*, GABA-induced currents in CC-contacting neurones were abolished by gabazine (20 μ M). *A*–*D* from the same cell. *E*, in the presence of 1 μ M TTX, gabazine (20 μ M) blocked a tonic GABA_A outward current. All recordings were done in the conventional whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Holding potentials in *D*, -100 mV; *E*, -40 mV.

8 cells, E_{GABA} shifted to depolarized membrane potentials $(-72 \pm 3.3 \text{ mV to} -59.65 \pm 2.8 \text{ mV}; P < 0.03$, Wilcoxon's matched pairs test, n = 5) in the presence of furosemide $(50-200 \ \mu\text{M}, \text{Fig. }7Ca-c)$ suggesting a high KCC2:NKCC1 ratio (Woodin *et al.* 2003). Immunohistochemistry for these transporters showed a high expression of NKCC1 in most CC-contacting neurones (Fig. 7D) whereas the expression of KCC2 was less robust and mostly confined to cells located dorso-laterally (Fig. 7E, arrowheads). However, the expression of KCC2 in neurones outside the ependyma was conspicuous (Fig. 7*Eb* and *c*; arrows).

As a functional correlate of KCC2 immunohistochemical data, we tested the activity of KCC2 in CC-contacting neurones with different E_{GABA} using a strategy described by Ben-Ari et al. (2011) in the hippocampus. In gramicidin perforated patch recordings we first applied GABA at a holding potential equal to E_{GABA} and then shifted to a depolarized potential (0 mV, 1 min), where GABA generated large outward currents due to the influx of Cl⁻ via GABA_A receptors (Fig. 7*Fa* and *b*, n = 13). After returning to the initial holding potential, GABA generated inward currents because of the shift in E_{GABA} induced by the load of Cl⁻ (Fig. 7*Fa* and *b*). The time course of recovery of E_{GABA} reflects the dynamic removal of Cl⁻ by KCC2 (Ben-Ari et al. 2011; Nardou et al. 2011). We found that in cells with depolarized E_{GABA} the recovery was slow, taking up to 10 min (Fig. 7Fa and c). However, in CC-contacting neurones with a hyperpolarized E_{GABA} (Fig. 7*Fb*, $E_{\text{GABA}} = -78 \text{ mV}$), the inward GABA-induced current disappeared with a faster time course (Fig. 7*Fc*). In these cells ($E_{\text{GABA}} \ge -68 \text{ mV}$), the half-time decay of the recovery was increased by furosemide (Fig. 7Fc, inset; 4 out of 4 cells, average increase 61.7 ± 24.7 s) suggesting KCC2 contributed to the clearance of intracellular Cl⁻. Overall, these results strengthen the interpretation that the depolarized E_{GABA} observed in more immature CC-contacting neurones arises from low levels of KCC2 activity.

Intracellular Ca²⁺ responses induced by GABA

Many regulations exerted by GABA on progenitors and neuroblasts in neurogenic niches are mediated by a rise in intracellular Ca²⁺ (Owens & Kriegstein, 2002; Ge *et al.* 2006; Bordey, 2007). To check whether GABA signalling around the CC also produce changes in $[Ca^{2+}]_i$, we performed Ca²⁺ imaging of CC-contacting cells. BLBP cells on the lateral aspects of the CC were loaded with the Ca²⁺ indicator Fluo4 either by puff application of Fluo4-AM or by electroporation of the K⁺ salt of Fluo4. As shown in Fig. 8*Aa*, GABA produced a slow increase in $[Ca^{2+}]_i$ (15.4 ± 3.7% $\Delta F/F_0$; time to peak 165.5 ± 24.2 s, n = 25) in some of the Fluo4 loaded cells lying on the



Figure 5. GABA as an excitatory transmitter

A, response of a CC-contacting neurone to a current step (gramicidin perforated patch-clamp technique) elicits two small spikes (a). The current–voltage relationship of the peak GABA-induced current (b) revealed an E_{GABA} close to –40 mV. In current clamp mode, GABA depolarized the cell (c, left trace) but did not produce spiking even when the membrane was depolarized with a current pulse (c, right trace). The inward GABA-induced current was blocked by gabazine (10 μ M; c, inset). *B*, Alexa 488 (250 μ M) in the pipette did not fill the cell in the perforated patch configuration. After attaining the whole-cell configuration the cell was filled with Alexa 488 revealing an apical process contacting the CC. *C*, in some cases the GABA-induced depolarization generated spikes (a, gramicidin perforated patch; *b*, cell-attached mode). The GABA-induced excitation was blocked by gabazine (20 μ M, *a*). *B*, epifluorescence images in a living slice. Scale bar in *B*, 10 μ m.

lateral aspect of the CC (25 out of 40 cells). Although we did not characterize the time course of the decay of the Ca²⁺ response to avoid bleaching of the dye, the time needed for recovery of $[Ca^{2+}]_i$ before GABA application could last several minutes (up to 13 min, data not shown). Immunohistochemistry against BLBP confirmed that Fluo4 loaded cells belonged to the domain of BLBP⁺ RG (Fig. 8*Ab*). The increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by GABA involved GABA_A receptors and required extracellular Ca²⁺ because it was strongly decreased by adding gabazine (n=8) or lowering Ca²⁺ (n=5) in the bath to 0.2 mM (Fig. 8*B* and *C*).

We also explored the Ca^{2+} response to GABA application in CC-contacting neurones. Immature



Figure 6. GABA as an inhibitory transmitter

A, repetitive spiking of a CC-contacting neurone (a) generated by a depolarizing current pulse (gramicidin perforated patch technique). The *I*–*V* plot for GABA-induced currents in this cell showed a reversal at –66 mV (*b*). A puff of GABA hyperpolarized the cell and inhibited spike firing (*c*, upper trace), an effect blocked by gabazine (10 μ M) (*c*, lower trace). *B*, a repetitive spiking CC-contacting neurone inhibited by GABA (*a*, main panel and inset). The recorded cell was reactive for GAD (*b* and *c*, arrows). Confocal optical sections. Scale bars: *B*, main panels, 10 μ m; inset, 10 mV and 400 ms. *A* and *B* from the same cell.

neurones loaded with Fluo4 were easily identified by their pear-like shape. In 19 of 32 cells, GABA produced a substantial $[Ca^{2+}]_i$ increase $(17.6 \pm 8.8\%\Delta F/F_0)$; time to peak 74.3 ± 13.8 s; Fig. 9*Aa* and *B*). In the developing spinal cord of *Xenopus* embryos, GABA generates a rise in $[Ca^{2+}]_i$ mediated by activation of metabotropic receptors (Root *et al.* 2008). However, the increase in $[Ca^{2+}]_i$ in CC-contacting neurones was blocked by gabazine, implying GABA_A receptors (Fig. 9*Ab* and *B*; n = 6). Similar to progenitor cells, the rise in $[Ca^{2+}]_i$ in CC-contacting neurones was blocked in low (0.2 mM) extracellular Ca²⁺ (n = 6, data not shown). The neuronal nature of the cell shown in Fig. 9 was confirmed by immunohistochemistry for HuC/D (Fig. 9*C*).



Figure 7. Mechanisms of GABA actions in CC-contacting neurones

A, a voltage ramp induced a current in cell-attached mode that reversed at 90 mV in a symmetric $[K^+]$ condition. B, histogram showing the E_{GABA} measured in gramicidin perforated patch recordings. The average resting potentials estimated in cell-attached (RMP CA) and perforated patch (RMP PP) modes are indicated by arrows. C, currents induced by GABA at -70 mV (1) in control (top trace) and in the presence of bumetanide (20 µM, second trace from top). Notice that in the presence of bumetanide, GABA generated an outward current, an effect that reversed upon wash-out (third trace from top). Addition of furosemide (100 μ M, forth trace from top) increased the amplitude of the inward GABA-induced current. The I-V plots of GABA-induced currents shows the shifts in EGABA induced by bumetanide and furosemide (b). The scatter plot in c shows the changes in E_{GABA} induced by bumetanide and furosemide for different cells. D, most HuC/D cells (a) express NKCC1 (b and c). E, double immunohistochemistry for HuC/D (a) and KCC2 (b). KCC2 was strongly expressed in neurones outside the CC region (a-c arrows) whereas in the ependyma was only weakly expressed in some HuC/D⁺ cells located dorsally (a-c, arrowheads). F, kinetics of Cl⁻ removal in CC-contacting neurones recorded in perforated patch mode. GABA (50 ms, 100 μm; arrows) was applied in the presence of DNQX (20 μ M) and AP-5 (50 μ M) first at a holding potential equal to E_{GABA} (-35 mV, a) and then at 0 mV during 1 min where GABA induced outward currents. Upon returning to the initial holding potential, GABA induced inward currents that decayed slowly with a half-decay time of 168 s (a, inset). In a cell with a more hyperpolarized E_{GABA} (-78 mV, b) the GABA-induced inward currents recovered with a faster kinetic (half-decay time 32 s). Addition of furosemide (200 µM) slowed down the time course of recovery (b, inset). The scatter plot in c shows the relationship between E_{GABA} and the half-decay time for different CC-contacting neurones. Notice that depolarized E_{GABA} values correlate with longer half-decay times. D and E, confocal optical sections. Scale bars: D and E, 20 μ m.



Figure 8. GABA induces intracellular Ca²⁺ increases in BLBP⁺ progenitors

A, multiple cells on the lateral aspects of the CC loaded with Fluo4 (a) responded with an increase in $[Ca^{2+}]_i$ to puff application of GABA (10 s). Combination with immunohistochemistry for BLBP showed that many Fluo4 loaded cells belonged to the domain of BLBP⁺ progenitors (b). B, the Ca²⁺ response induced by GABA in CC-contacting progenitors was abolished by addition of gabazine (20 μ M). C, plot showing the time course of the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by GABA. The response was abolished in low Ca²⁺ Ringer solution (0.2 mM). Scale bars: A and B, 10 μ m.

Discussion

Neurogenesis within already operating circuits must be homoeostatically regulated to preserve function. In the brain, GABA is a key component of this type of regulation (Ben-Ari, 2002). We find here that GABA signals on BLBP⁺ spinal progenitors and CC-contacting neurones in a way similar to other neurogenic niches (Bordey, 2007). The effects of GABA on CC-contacting neurones depended on the balance between NKCC1 and KCC2 suggesting various stages of neuronal maturation. GABA_A receptor activation led to an increase in $[Ca^{2+}]_i$, which may provide a link between activity and gene transcription (Ben-Ari & Spitzer, 2010).

The sources of GABA around the CC

Two potential sources of GABA appeared around the CC: (a) a plexus of GAD⁺ terminals and (b) a population of GABAergic neurones. The numerous GAD⁺ terminals around the CC suggest a source for phasic, synaptically

driven GABA signalling (Bordey, 2007). Indeed, phasic GABA signalling in CC-contacting neurones is supported by our previous studies showing spontaneous GABAergic synaptic potentials (Russo et al. 2004). However, in contrast to hippocampal progenitors (Tozuka et al. 2005), phasic GABA_A receptor activation seems unlikely for spinal progenitors because we never observed spontaneous synaptic events in BLBP⁺ cells. Unlike the abundant GAD⁺ terminals, GAD immunoreactivity in CC-contacting cells was faint and confined to a few cells. However, as in the adult SVZ (Wang et al. 2003) most CC-contacting neurones contained GABA. It remains to be determined whether CC-contacting GABAergic cells may locally release GABA like their counterparts in the SVZ (Liu et al. 2005). The tonic activation of GABA_A receptors reported here supports this possibility. Alternatively, synaptically released GABA may spill over contributing a tonic GABA_A-induced current.

The mismatch between the GABAergic nature and GAD immunoreactivity of CC-contacting neurones suggests



Figure 9. GABA increases Ca²⁺ in CC-contacting neurones

A, a cell loaded with Fluo4 (puff application of the Fluo4-AM ester) responded with an increase in $[Ca^{2+}]_i$ to GABA (a). GABA failed to increase $[Ca^{2+}]_i$ in the presence of gabazine (b, 20 μ M). B, time course of $[Ca^{2+}]_i$ increase shown in A in control and after addition of gabazine (20 μ M). C, immunohistochemistry for HuC/D confirmed that the cell shown in A was a CC-contacting neurone. Scale bars: A and C, 10 μ m. that GABA may be synthesized by a pathway different from glutamate conversion by GAD (Martin & Rimvall, 1993). Some reports show that SVZ GABAergic neuroblasts express GAD (Wang et al. 2003) whereas others reported low levels of GAD until SVZ neuroblasts reach the olfactory bulb (De Marchis et al. 2004), and proposed that GABA may be produced from putrescine (Sequerra et al. 2007). In the developing retina, GABA synthesis is first performed by ornithine decarboxylase and then taken over by GAD as its initial low expression increases during development (Yamasaki et al. 1999). A similar scenario may take place around the CC. The fact that GAD was expressed by a subset of CC-contacting cells may indicate they are in more advanced stages of differentiation, as suggested by their functional traits of maturity such as inhibition by GABA and repetitive firing (Spitzer et al. 2000).

GABA signalling in spinal progenitors

In most clusters of electrically coupled BLBP⁺ progenitors, GABA-induced currents had sizeable components mediated by GAT and GABA_A receptors whereas a few were dominated either by GAT or GABA_A components. The recordings obtained in the presence of carbenoxolone suggest that within a cluster progenitors react differently to GABA. The heterogeneity of GABA responses resembles the variable expression of K⁺ delayed rectifier currents among BLBP/Pax6⁺ progenitors (Russo *et al.* 2008), and may reflect different functional roles or developmental stages.

In the SVZ, GABA uptake into precursors by GAT3/4 plays an important role in clearing GABA released from neuroblasts, thereby regulating their migration (Bolteus & Bordey, 2004) and the proliferation of progenitors (Liu *et al.* 2005). CC-contacting progenitors expressed functional GAT3 whereas the neuronal GAT1 was absent around the CC, indicating the removal of GABA in the ependyma relies on uptake via GAT3 by progenitors. The tridimensional network of BLBP/Pax6 progenitors around HuC/D⁺ cells (Russo *et al.* 2008) is a geometric arrangement similar to that of the SVZ which appears well suited to spatially control extracellular GABA levels (Bolteus & Bordey, 2004; Platel *et al.* 2008).

As in the mammalian brain (Owens & Kriegstein, 2002), many BLBP⁺ progenitors had functional GABA_A receptors. The mismatch between the recorded E_{GABA} in many clusters of progenitors and the theoretical equilibrium potential for Cl⁻ imposed by the pipette solution may be explained by the lack of space clamp of electrically coupled cells far from the recording site. The shift of E_{GABA} toward hyperpolarized potentials produced by carbenoxolone supports this interpretation. However, the E_{GABA} in cells uncoupled with carbenoxolone was still

more depolarized than predicted by $[Cl^-]_i$, suggesting an efficient mechanism for Cl^- accumulation. This possibility is supported by the strong expression of NKCC1 in the apical process of BLBP⁺ cells.

The GABA-induced depolarization in CC-contacting progenitors resembles GABA actions on progenitors in the developing brain (Lo Turco et al. 1995) and postnatal neurogenic niches (Bolteus & Bordey, 2004; Liu et al. 2005). In the SVZ, GABA released by neuroblasts decreases the proliferation of progenitors (Lo Turco et al. 1995; Haydar et al. 2000; Liu et al. 2005). It is tempting to speculate that GABA released from CC-contacting neurones regulates the proliferation of BLBP⁺ progenitors. In addition, the intimate relationship between GABAergic terminals and BLBP+ cells raises the possibility that spillover from synaptically released GABA may influence progenitors via GABA_A receptors. GAD⁺ terminals around the CC are likely to originate from neighbouring GABAergic interneurones because CC-contacting neurones lack local axon collaterals (Russo et al. 2004; Trujillo-Cenóz et al. 2007). Thus, GABA released from interneurones may help regulating the behaviour of CC-contacting progenitors according to the activity of spinal circuits. In vivo experimental approaches are needed to test these possibilities.

GABA: a signal for maturation of CC-contacting neurones?

CC-contacting neurones had functional GABA_A receptors as indicated by the full blockade of GABA-induced currents by gabazine. In gramicidin perforated patch recordings, GABAA receptor activation generated responses ranging from depolarizations that elicited spike firing to hyperpolarizations from rest. Taking into account the resting membrane potential estimated from cell-attached recordings, GABA depolarized from rest most CC-contacting neurones as reported for migrating neuronal progenitors in the SVZ and rostral migratory stream (Wang *et al.* 2003). The depolarized E_{GABA} implies a $[Cl^-]_i$ higher than in mature neurones and is in agreement with the robust expression of NKCC1 in HuC/D⁺ cells. Although KCC2 strongly expressed in spinal neurones outside the ependyma, it only expressed weakly in a few CC-contacting HuC/D⁺ cells. Thus, our electrophysiological and immunohistochemical findings suggest a predominance of NKCC1 over KCC2 rendering a depolarized E_{GABA} in most CC-contacting neurones. This interpretation is supported by the shift of E_{GABA} towards hyperpolarized potentials by the NKCC1 antagonist bumetanide whereas furosemide, a blocker of both NKCC1 and KCC2 (Payne et al. 2003), had the opposite effect on cells with relatively hyperpolarized E_{GABA} . The functional assay of KCC2 (see Fig. 7F) implies that the
more hyperpolarized E_{GABA} in some CC-contacting neurones results from the appearance of some degree of KCC2 activity.

Both in the SVZ and the dentate gyrus, GABA provides an excitatory drive to newborn neurones because of high activity of NKCC1 (Bordey, 2007). As neurones mature, GABA action switches from excitation to inhibition because down-regulation of NKCC1 and/or increase of KCC2 activity (Rivera *et al.* 1999; Ganguly *et al.* 2001). Our data suggest that HuC/D⁺ cells in the ependyma are neurones in different stages of maturation with variable NKCC1:KCC2 ratios that determine GABA actions from excitation to inhibition. In agreement, HuC/D⁺ cells hyperpolarized by GABA generally spiked repetitively – an electrophysiological phenotype of more differentiated neurones (Russo & Hounsgaard, 1999; Spitzer *et al.* 2000) – and had measurable KCC2 activity.

GABA and Ca²⁺: a tandem in neurogenic niches

Most GABA actions on neurogenesis are mediated by an increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by membrane depolarization (Ge et al. 2006; Bordey, 2007). In many CC-contacting progenitors and neurones, GABA produced a prolonged increase in $[Ca^{2+}]_i$ that required extracellular Ca^{2+} and GABA_A receptor activation. The time course of Ca^{2+} signals was similar to spontaneously occurring slow Ca²⁺ waves in the developing spinal cord of *Xenopus* (Gu et al. 1994) and to GABA-induced Ca²⁺ signals in cortical progenitors (LoTurco et al. 1995). The increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by GABA is commonly attributed to the opening of voltage-gated Ca2+ channels (Ben-Ari, 2002). Whereas this may be a plausible mechanism for CC-contacting neurones, it is unlikely that the small depolarization observed in many cells would be enough to open voltage-gated Ca2+ channels. Moreover, BLBP⁺ progenitors lack inward voltage-gated currents (Russo et al. 2008). Alternative mechanisms such as activation of Ca²⁺ permeable transient receptor potential channels gated by osmotic changes may participate in the GABA-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase described here (Chavas et al. 2004). The detailed mechanisms and functional relevance of GABA-induced [Ca²⁺]_i increases in CC-contacting cells remains to be clarified.

Concluding remarks

GABAergic signalling appears to play a key part in matching the activity of neural circuits with different steps of neurogenesis in the brain (Ben-Ari & Spitzer, 2010). We present here the first evidence that the region surrounding the CC has various components of GABAergic signalling characteristic of adult neurogenic niches, suggesting that GABA may similarly regulate neurogenesis in the turtle spinal cord. Some elements of GABA signalling described here may still be at work in the rat ependyma. Although the mammalian spinal cord seem to have lost the ability for neurogenesis (Horner et al. 2000), there are cells in the rat ependyma that display molecular and electrophysiological features of neuroblasts which, as described here, respond heterogeneously to GABA (Marichal et al. 2009). Interestingly, a recent study in the spinal cord of adult mice reported neurogenesis enhanced by sensory stimulation, but newborn neurones fail to mature and integrate into existing spinal circuits (Shecther *et al.* 2010). It is possible that progression of these neuroblasts to mature neurones does not occur because the lack of key components of GABAergic signalling. Understanding the GABAergic modulation of progenitors and neuroblasts in different animal models may give useful clues about key mechanisms needed for functional neurogenesis in the spinal cord.

References

- Alaburda A, Russo R, MacAulay N & Hounsgaard J (2005). Periodic high-conductance states in spinal neurons during scratch-like network activity in adult turtles. *J Neurosci* 25, 6316–6321.
- Barry PH & Diamond JM (1970). Junction potentials, electrode standard potentials, and other problems in interpreting electrical properties in membranes. *J Membr Biol* **3**, 93–122.
- Ben-Ari Y (2002). Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3, 728–739.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R & Khazipov R (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87, 1215–1284.
- Ben-Ari Y & Spitzer NC (2010). Phenotypic checkpoints regulate neuronal development. *Trends Neurosci* 33, 485–492.
- Ben-Ari Y, Tyzio R & Nehlig A (2011). Excitatory action of GABA on immature neurons is not due to absence of ketone bodies metabolites or other energy substrates. *Epilepsia* **52**, 1544–1558.
- Bolteus AJ & Bordey A (2004). GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* **24**, 7623–7631.
- Bordey A (2007). Enigmatic GABAergic networks in adult neurogenic zones. *Brain Res Brain Res Rev* 53, 124–134.
- Chavas J, Forero ME, Collin T, Llano I & Marty A (2004). Osmotic tension as a possible link between GABA_A receptor activation and intracellular calcium elevation. *Neuron* **44**, 701–713.
- Cherubini E, Griguoli M, Safiulina V & Lagostena L (2010). The depolarizing action of GABA controls early network activity in the developing hippocampus. *Mol Neurobiol* **43**, 97–106.
- Danilov AI, Covacu R, Moe MC, Langmoen IA, Johansson CB, Olsson T & Brundin L (2006). Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis. *Eur J Neurosci* **23**, 394–400.

De Marchis S, Temoney S, Erdelyi F, Bovetti S, Bovolin P, Szabo G & Puche AC (2004). GABAergic phenotypic differentiation of a subpopulation of subventricular derived migrating progenitors. *Eur J Neurosci* **20**, 1307–1317.

Fernández A, Radmilovich M & Trujillo-Cenóz O (2002). Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. *J Comp Neurol* **453**, 131–44.

Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Hu X, Liu Z, Jensen J & Qiu M (2003). Molecular mapping of the origin of postnatal spinal cord ependymal cells: evidence that adult ependymal cells are derived from Nkx6.1⁺ ventral progenitor cells. *J Comp Neurol* **456**, 237–244.

Fricker D, Verheugen JA & Miles R (1999). Cell-attached measurements of the firing threshold of rat hippocampal neurones. *J Physiol* **517**, 791–804.

Ganguly K, Schinder AF, Wong ST & Poo M (2001). GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* **105**, 521–532.

Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL & Song H (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* **439**, 589–593.

Gu X, Olson EC & Spitzer NC (1994). Spontaneous neuronal calcium spikes and waves during early differentiation. *J Neurosci* 14, 6325–6335.

Hack MA, Saghatelyan A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM & Gotz M (2005). Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* **8**, 865–872.

Haydar TF, Wang F, Schwartz ML & Rakic P (2000). Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* **20**, 5764–5774.

Hille B (2001). *Ionic Channels of Excitable Membranes*, pp. 1–20. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.

Horner PH, Power AE, Kempermann G, Kuhn GH, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ & Gage FH (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* **20**, 2218–2228.

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U & Frisén J (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* **96**, 25–34.

Lee SK & Pfaff SL (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* 4, 1183–1191.

Li B, McKernan K & Shen W (2008). Spatial and temporal distribution patterns of Na-K-2Cl cotransporter in adult and developing mouse retinas. *Vis Neurosci* **25**, 109–123.

Liu X, Wang Q, Haydar TF & Bordey A (2005). Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* **8**, 1179–1187.

LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB & Kriegstein AR (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* **15**, 1287–1298.

Ma DK, Kim WR, Ming GL & Song H (2009). Activitydependent extrinsic regulation of adult olfactory bulb and hippocampal neurogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1170**, 664–673. Marichal N, García G, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O & Russo RE (2009). Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in "standby mode"? *J Neurosci* **29**, 10010–1024.

Martin DL & Rimvall K (1993). Regulation of gammaaminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem* **60**, 395–407.

Melby ECJ & Altman NH (1974). *Handbook of Laboratory Animal Science*. CRC, Cleveland.

Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O & Frisén J (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* **6**, 1494–1507.

Myers VB & Haydon DA (1972). Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. II. The ion selectivity. *Biochim Biophys Acta* **274**, 313–322.

Nardou R, Yamamoto S, Chazal G, Bhar A, Ferrand N, Dulac O, Ben-Ari Y & Khalilov I (2011). Neuronal chloride accumulation and excitatory GABA underlie aggravation of neonatal epileptiform activities by phenobarbital. *Brain* **134**, 987–1002.

Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P & Moonen G (2001). Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* **305**, 187–202.

Owens DF & Kriegstein AR (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* **3**, 715–727.

Payne JA, Rivera C, Voipio J & Kaila K (2003). Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* **26**, 199–206.

Pinto L & Götz M (2007). Radial glial cell heterogeneity—the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol* **83**, 2–23.

Platel JC, Dave KA & Bordey A (2008). Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain. *J Physiol* **586**, 3739–3743.

Reali C & Russo RE (2005). An integrated spinal cord-hindlimbs preparation for studying the role of intrinsic properties in somatosensory information processing. *J Neurosci Methods* **142**, 317–326.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M & Kaila K (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251–255.

Root CM, Velázquez-Ulloa NA, Monsalve GC, Minakova E & Spitzer NC (2008). Embryonically expressed GABA and glutamate drive electrical activity regulating neurotransmitter specification. *J Neurosci* **28**, 4777–4784.

Russo RE, Fernández A, Reali C, Radmilovich M & Trujillo-Cenóz O (2004). Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurones in the turtle spinal cord. *J Physiol* **560**, 831–838.

Russo RE & Hounsgaard J (1996*a*). Plateau-generating neurones in the dorsal horn in an in vitro preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol* **493**, 39–54.

Russo RE & Hounsgaard J (1996*b*). Burst-generating neurones in the dorsal horn studied in an in vitro preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol* **493**, 55–66.

- Russo RE, Reali C, Radmilovich M, Fernández A & Trujillo-Cenóz O (2008). Conexin 43 define functional domains of neurogenic precursors in the spinal cord. *J Neurosci* 28, 3298–3309.
- Sequerra EB, Gardino P, Hedin-Pereira C & de Mello FG (2007). Putrescine as an important source of GABA in the postnatal rat subventricular zone. *Neuroscience* 146, 489–493.
- Shechter R, Baruch K, Schwartz M & Rolls A (2010). Touch gives new life: mechanosensation modulates spinal cord adult neurogenesis. *Mol Psychiatry* **16**, 342–52.
- Spitzer NC (2006). Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444, 707–712.
- Spitzer NC (2010). How GABA generates depolarization. *J Physiol* **588**, 757–758.
- Spitzer NC, Vincent A & Lautermilch NJ (2000). Differentiation of electrical excitability in motoneurons. *Brain Res Bull* **53**, 547–552.
- Tanaka EM & Ferretti P (2009). Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* **10**, 713–723.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T & Hisatsune T (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* **47**, 803–815.
- Trujillo-Cenóz O, Fernández A, Radmilovich M, Reali C & Russo RE (2007). Cytological organization of the central gelatinosa in the turtle spinal cord. *J Comp Neurol* **502**, 291–308.
- Tyzio R, Ivanov A, Bernard C, Holmes GL & Ben-Ari Y, Khazipov R (2003). Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J Neurophysiol* **90**, 2964–2972.
- Verheugen JA, Fricker D & Miles R (1999). Noninvasive measurements of the membrane potential and GABAergic action in hippocampal interneurones. *J Neurosci* **19**, 2546–2555.
- Wang DD & Kriegstein AR (2008). GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *J Neurosci* 28, 5547–5558.
- Wang DD, Krueger DD & Bordey A (2003). GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABA_A receptor activation. *J Physiol* **550**, 785–800.

- Woodin MA, Ganguly K & Poo MM (2003). Coincident preand postsynaptic activity modifies GABAergic synapses by postsynaptic changes in Cl⁻ transporter activity. *Neuron* **39**, 807–820.
- Yamasaki EN, Barbosa VD, De Mello FG & Hokoc JN (1999). GABAergic system in the developing mammalian retina: dual sources of GABA at early stages of postnatal development. *Int J Dev Neurosci* **17**, 201–213.

Authors contributions

The study was done in the department of Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. C.R.: conception and design of the experiments; collection, analysis and interpretation of electrophysiological data and Ca^{2+} imaging; drafting of the manuscript. A.F. and M.R.: collection, analysis and interpretation of immuno-histochemical data. O.T.C.: analysis and interpretation of immuno-histochemical data; revising the manuscript critically for important intellectual content. R.E.R.: conception and design of the experiments; analysis and interpretation of data; writing of the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank G. Fabbiani and M. I. Rehermann for technical assistance and Dr Antonia Marin-Burgin for advice on Ca²⁺ imaging. The Na⁺–K⁺–Cl⁻ co-transporter (NKCC1) monoclonal antibody developed by Drs C. Lytle and B. Forbush III was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA, USA. The work described here was supported by Grant no. FCE_2920 from ANII and Grant no. R01NS048255 from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke to R.E.R. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke or the National Institutes of Health.