



Ministerio
de Educación
y Cultura



TESIS

MAESTRÍA EN NEUROCIENCIAS

PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
(PEDECIBA) - BIOLOGÍA

**Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable,
Departamento de Neurofisiología celular y molecular.**

**Posible rol secretor del proceso apical de las células que
contactan el líquido cefalorraquídeo en la médula
espinal de ratones.**

Lic. MAGDALENA VITAR

Orientador: Dr. FEDERICO TRIGO

[Escriba aquí]

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no podría haberse llevado a cabo sin la participación de quienes me orientaron, formaron y participaron en la obtención de evidencias experimentales a través de los múltiples abordajes experimentales que aquí se presentan. Quiero agradecer al Dr. Raúl Russo, quien me recibió en su laboratorio brindándome la oportunidad de llevar adelante este trabajo. A la MSc. Gabriela Fabianni por su invaluable apoyo en la puesta a punto de los abordajes inmunohistoquímicos aquí presentados. También al Dr. Omar Trujillo y la MSc. M^a Inés Rehermann, quienes me formaron y trabajaron en la obtención de imágenes del PAP mediante microscopía electrónica de transmisión.

Asimismo, quiero destacar el rol de la Dra. Lucía Canclini del Depto. de Genética del IIBCE, quien me formó en el manejo de cultivos celulares y trabajó con nosotros en el reacondicionamiento de la línea celular HEK-GABA.

Por último, quiero destinar un agradecimiento especial a mi orientador Federico Trigo quien me formó y colaboró en la obtención de evidencias electrofisiológicas aquí presentadas. En tanto orientador, Federico supo poner a mi disposición todos los recursos materiales y humanos, tendiendo los puentes que fueran necesarios, para impulsarme en la realización de este trabajo.

Fuentes de Financiación.

La presente maestría contó con financiación de la ANII mediante el Fondo Clemente Estable (FCE_1_2021_1_166464), cuyo responsable es el Dr. Federico Trigo.

Además, conté con financiación de PEDECIBA para realizar una pasantía en el Departamento de Genética del IIBCE con la Dra. Lucía Canclini. Esta oportunidad me permitió formarme en el cultivo de células HEK-GABA para utilizarlas como *sniffers* de GABA y fue por lo tanto clave para el desarrollo de mi maestría.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	3
ANTECEDENTES.....	5
I. Generalidades anatómicas, estructurales y funcionales de la médula espinal.....	5
II. Las <i>cerebrospinal fluid-contacting neurons</i>	7
A. Propiedades electrofisiológicas de las CSFcNs.....	7
B. Canal <i>Polycystic kidney disease 2-like 1</i> en las CSFcNs.	9
C. Función del proceso apical como estructura sensorial polimodal	10
D. Rol de las CSFcNs como parte de un sistema de integración sensorio-motora.	12
III. Posible rol secretor del proceso apical de las CSFcNs	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
I. Hipótesis	16
II. Objetivos generales y específicos	16
ABORDAJE EXPERIMENTAL, METODOLOGÍA Y MATERIALES	17
I. Animales.....	17
II. Ensayos de inmunohistoquímica.....	17
III. Microscopía electrónica de transmisión	18
IV. Microscopía confocal y análisis de imágenes.....	20
V. Cultivo de células HEK-GABA	21
VI. Experimentos electrofisiológicos.....	22
A. Obtención de las rodajas de médula espinal.....	22
B. Adquisición de registros electrofisiológicos en rodajas de médula espinal	22
C. Protocolo para el desenjaulado de GABA.....	23
D. Protocolo para la caracterización de corrientes de calcio operadas por voltaje en las CSFcNs.....	23
E. Protocolo para caracterizar la sensibilidad de los <i>sniffers</i> de GABA.....	24
F. Protocolo para evaluar la secreción de GABA mediante <i>sniffers</i>	24
G. Obtención de registros de capacitancia de membrana en el proceso apical. .	25
VII. Estadística.....	25
RESULTADOS	26

[Escriba aquí]

I. Caracterización de la densidad de CSFcNs que expresan GFP en ratones GATA3.	26
II. Búsqueda de elementos ultraestructurales compatibles con la presencia de un aparato secretor en el proceso apical de las CSFcNs.	27
III. Búsqueda de receptores funcionales GABA _A en el proceso apical de las CSFcNs	28
IV. Búsqueda de marcadores moleculares de secreción vesicular en el proceso apical de las CSFcNs.	30
V. Caracterización de corrientes de calcio operadas por voltaje en las CSFcNs.	34
VI. Búsqueda de evidencias funcionales directas de la secreción de GABA desde el PAP.....	36
A. Utilización de <i>sniffers</i> para poner en evidencia la secreción de GABA.....	36
B. Medidas de la capacidad de membrana en el proceso apical durante la estimulación de CSFcNs.....	41
DISCUSIÓN	43
A. Resultados compatibles con la secreción vesicular (en particular de GABA). .	44
B. Resultados que no son compatibles con la secreción vesicular (en particular de GABA).	45
ANEXOS.....	47
ANEXO 1: Soluciones y reactivos.....	47
I. Sedantes, anestésicos y fijadores	47
II. Reactivos y soluciones para ensayos de Inmunohistoquímica	47
III. Reactivos y soluciones para cultivos celulares	48
IV. Reactivos y soluciones para MET	49
V. Soluciones y reactivos para electrofisiología	50
ANEXO 2: Figuras suplementarias	53
BIBLIOGRAFÍA	55

ABREVIATURAS

AC: *alternating current*

ANOVA: análisis de varianza

ASIC: *acid-sensing ion channels*

Ca⁺⁺: calcio

CC: canal medular central

CCP: coeficiente de correlación de Pearson

CGP: centros generadores de patrones

CSFcNs: *cerebrospinal fluid contacting neurons*

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DC: *direct current*

DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DPNI-GABA: *nitroindoline-caged GABA*

DREADD: *designer receptors exclusively activated by designer drugs*

eGFP: *enhanced green fluorescent protein*

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GABA_AR: receptor de GABA-A

HEK: *human embryonic kidney*

HEK-GABA: células HEK modificadas para expresar el GABA_AR en la membrana plasmática

ICa: corriente de Ca⁺⁺

ICaT: ICa de tipo T

IHQ: Inmunohistoquímica

IKA: corriente de K⁺ de tipo A

IKD: Corriente de K⁺ de tipo D

K⁺: potasio

KO: *knockout*

LCR: líquido cefalo – raquídeo

ME: médula espinal

MET: microscopía electrónica de transmisión

Na⁺: sodio

nACh: receptores colinérgicos nicotínicos

PA: potencial de acción

PFA: paraformaldehído

PAP: proceso apical

PB: buffer fosfato

PBS: PB salino

PBST: PBS Tritón

PKD2L1: polycystic kidney disease 2-like 1 protein

SFB: suero fetal bobino

Syt: sinaptotagmina

TE: tronco encefálico

TEA: tetraetilamonio

TTX: tetrodotoxina

VGAT: transportador vesicular de GABA

WCR: *whole cell recording*

4-AP: 4-aminopiridina

RESUMEN

Las *cerebrospinal fluid-contacting neurons* son neuronas GABAérgicas de la médula espinal, cuyos somas se localizan en la zona subependimaria, y poseen un proceso apical que contacta el líquido cefalorraquídeo. Las propiedades funcionales de estas células son objeto de debate en la actualidad. Si bien algunos autores postulan un rol sensorial químico y mecánico del proceso apical en ratones, basados en evidencias ultraestructurales preliminares de nuestro laboratorio (i.e. presencia de elementos túbulo-vesiculares en el proceso apical), decidimos explorar la hipótesis de la secreción vesicular de GABA en dicho compartimento.

Para poner a prueba esta hipótesis, implementamos múltiples enfoques experimentales utilizando como modelo de estudio ratones transgénicos GATA3, los cuales expresan la proteína fluorescente verde en las células de interés.

Para resolver la ultraestructura de los procesos apicales obtuvimos imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión. La presencia de un intrincado sistema de túbulos y vesículas de apariencia aplanada en el proceso apical fue compatible con la presencia de un aparato secretor. También buscamos evidencias moleculares de secreción vesicular mediante técnicas inmunohistoquímicas. Si bien evidenciamos la presencia del transportador vesicular de GABA en los procesos apicales, no hallamos indicios de otras proteínas presinápticas como la synaptotagmina 1 y 2, o la syntaxina 4.

Por otra parte, pusimos en evidencia la presencia de receptores funcionales GABA_A en el proceso apical mediante el desenjaulado de GABA en dicho compartimento. De producirse secreción de GABA desde el proceso apical, este resultado permitiría especular respecto de un posible mecanismo de comunicación autócrina o parácrina.

Para obtener evidencias electrofisiológicas de la secreción de GABA desde el proceso apical, decidimos utilizar la técnica de "sniffers de GABA" que consiste en obtener registros electrofisiológicos a partir de células que expresen receptores GABA-A, capaces de detectar la presencia de GABA cerca del sitio de liberación durante la estimulación eléctrica de la célula secretora. Con esta finalidad cultivamos células HEK-293 modificadas genéticamente para expresar dicho receptor (células HEK-GABA). Mediante este abordaje, y contrariamente a lo esperado, no obtuvimos corrientes GABAérgicas en las células HEK-GABA como consecuencia de la estimulación eléctrica de las *cerebrospinal fluid-contacting neurons*. Por lo tanto, contemplamos la posibilidad de secreción de un contenido vesicular diferente de GABA. Para explorar esta alternativa realizamos mediciones de capacitancia de membrana en los procesos apicales. En las *cerebrospinal fluid-contacting neurons* la despolarización y posterior reclutamiento de conductancias activas de calcio, no provocó cambios en la capacitancia de membrana en el proceso apical.

Sin embargo, si bien las *cerebrospinal fluid-contacting neurons* presentan conductancias activas de calcio, resulta oportuno señalar que no contamos aún con evidencias de la presencia de estas conductancias en el proceso apical. Además, la secreción vesicular dependiente de calcio podría ser mediada por otros sustratos moleculares permeables a dicho ion, como PKD2L1. Puesto que estos canales no son sensibles a voltaje, una posibilidad que contemplamos es que la aplicación de pulsos despolarizantes no sea eficaz para mediar un incremento de la concentración de calcio en el proceso apical.

Si bien aquí no hemos obtenido evidencias funcionales de la secreción de GABA desde el proceso apical, consideramos necesario explorar nuevas avenidas experimentales para descartar esta hipótesis por completo.

ANTECEDENTES

En esta tesis de maestría nos enfocamos en el estudio de una neurona del sistema nervioso central de ratón, la *cerebrospinal fluid contacting neuron* (CSFcN), que se ubica en la médula espinal (ME). Antes de referirnos a las características anátomo - funcionales de esta neurona en mamíferos realizaremos una breve introducción de las principales características anatómicas, estructurales y funcionales de la ME.

I. Generalidades anatómicas, estructurales y funcionales de la médula espinal.

La ME, junto al cerebro, constituye el sistema nervioso central. Se extiende desde el foramen magno hasta el cono medular y se aloja dentro del canal vertebral. Anatómicamente se organiza en segmentos que corresponden a las raíces nerviosas que emergen entre las vértebras. La ME se divide en regiones cervical, torácica, lumbar y sacra, como se muestra en la **figura 1**. Histológicamente, se compone de la sustancia gris central, con forma de mariposa, que alberga principalmente cuerpos neuronales, y la sustancia blanca periférica, que contiene abundantes tractos de fibras nerviosas ascendentes, descendentes y locales.

La ME está implicada en la integración y procesamiento de información sensorial, motora y autónoma. La sustancia gris se estructura en columnas longitudinales y núcleos segmentados a lo largo de la médula. Las neuronas en el asta dorsal, por un lado, procesan información sensorial desde receptores periféricos y transmiten estas señales hacia el encéfalo mediante vías ascendentes. El asta ventral, por otro lado, contiene a las motoneuronas que inervan los músculos esqueléticos. Estas neuronas reciben información procedente del encéfalo por medio de las vías de control motor descendentes, así como información propioceptiva desde músculo (husos neuromusculares) y tendones (órganos tendinosos de Golgi). Asimismo, las motoneuronas forman parte de redes neuronales espinales locales, implicadas en la generación de patrones locomotores y en el reclutamiento alternante de los miembros, (ver sección IIA y **figura 4**). Adicionalmente, el asta lateral, que se encuentra principalmente en las regiones torácica y lumbar superior, está implicada en la regulación de funciones autonómicas a través del sistema nervioso simpático.

El canal central (CC) se dispone en el centro de la sustancia gris y se extiende longitudinalmente a lo largo de toda la ME. Está revestido por células ependimarias y baña en el líquido cefalorraquídeo (LCR), que desempeña un papel crucial en la protección mecánica y en la regulación del ambiente químico del tejido nervioso.

El LCR es producido y secretado activamente en los plexos coroideos de las cavidades ventriculares y circula a través de los ventrículos, las cisternas y el espacio subaracnoideo para ser absorbido por las vellosidades aracnoideas. El LCR formado en los plexos coroideos contiene micronutrientes tales como vitaminas (folato, ácido ascórbico, tiamina, monofosfatos de piridoxal); iones (principalmente de Na^+ , Cl^- , HCO_3^- y menores cantidades de K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}); péptidos y proteínas (que pueden ser transferidos activamente desde la sangre al LCR como la leptina, o sintetizados en el plexo coroideo como el factor de crecimiento insulínico (IGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), etc. Por otra parte, macronutrientes como la glucosa, aminoácidos y lactato; así como muchos micronutrientes, hormonas, vitaminas y minerales son transportados al espacio extracelular desde la sangre a través de la BHE. Se acepta que existe difusión de moléculas entre el espacio extracelular cerebral y el LCR formado en las cavidades ventriculares, a través de las células endimarias y la piamadre (Spector et al., 2015). Por otra parte la osmolaridad y pH del LCR es similar a las descritas en plasma, i.e., en el entorno de 300 mOsm/L y 7,4 respectivamente (Damkier et al., 2013).

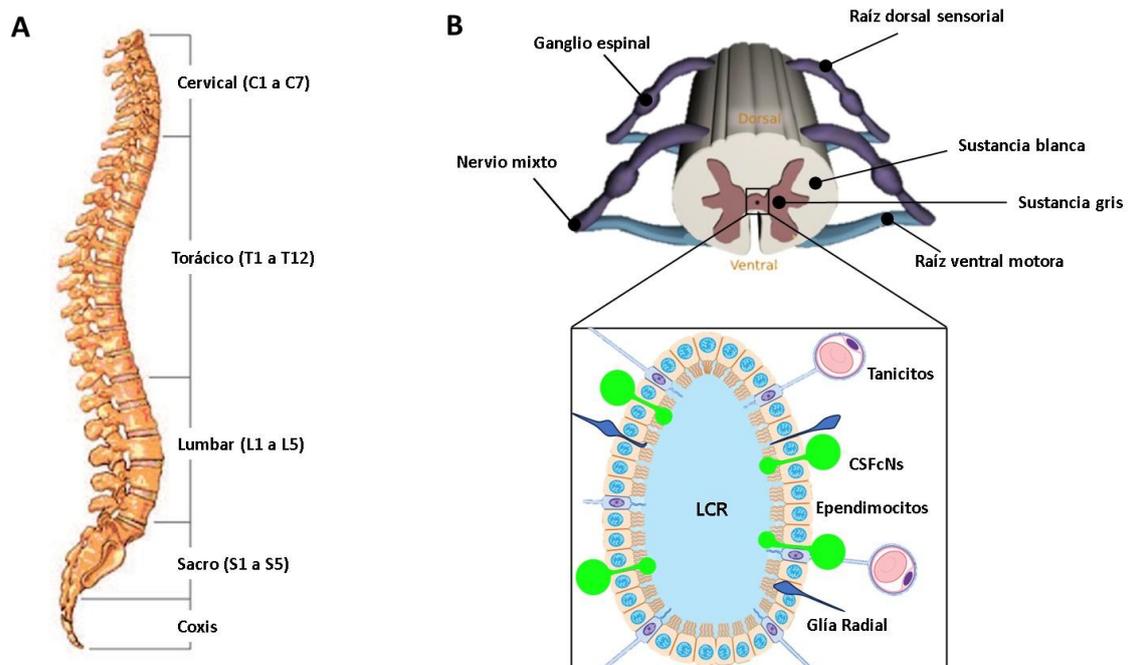


Figura 1. Generalidades de la médula espinal. Representación esquemática de aspectos anatómicos e histológicos de la ME. **A.** La ME se dispone dentro del canal vertebral y se organiza en regiones cervical, torácica, lumbar y sacra. **B.** Panel superior: se ilustra la distribución de la sustancia gris y blanca en la ME así como las raíces nerviosas ventrales (motoras), raíces dorsales (sensitivas) y ganglios sensoriales paravertebrales (donde se encuentra el cuerpo celular de las neuronas pseudounipolares del ganglio de la raíz dorsal). Panel inferior: el recuadro representa esquemáticamente el CC, que está compuesto fundamentalmente por endimocitos, tanicitos, glía radial y los PAp de las CSFcNs. Modificado de Moore, 2016 (*Veterinary pathology*) y https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_01medula.php.

Además de endoteliales, el CC está conformado por tanicitos, glías radiales, y los procesos apicales (PAp) de nuestras células de interés: las CSFcNs (**Figura 1**).

II. *Las cerebrospinal fluid-contacting neurons.*

Pasemos ahora a describir a las neuronas que constituyen el centro de estudio de esta maestría, las CSFcNs. Las CSFcNs son neuronas GABAérgicas evolutivamente bien conservadas. Están presentes en todas las especies de vertebrados que han sido estudiadas (Djenoune et al., 2014): en vertebrados no mamíferos como peces (Jalalvand et al., 2014; Vigh & Vigh-Teichmann, 1998), anfibios (Alibardi, 2019) y reptiles (Alibardi, 2019; Russo et al., 2004); así como en mamíferos como la rata (Stoeckel et al., 2003), el ratón (Orts-Del'Immagine et al., 2014), el gato, el mono (Liu et al., 2023) e inclusive en el ser humano (Humphrey, 1947). Las CSFcNs de todas las especies que han sido estudiadas se distribuyen en sentido céfalo-caudal desde el tronco encefálico (TE) bajo y a lo largo de toda la ME. Sus cuerpos celulares o somas se localizan en una posición sub-ependimal y proyectan un proceso dendrítico que se extiende en dirección al CC; el mismo termina en una estructura con forma de bulbo en contacto con el LCR, el proceso apical (PAp). En suma, las CSFcNs contribuyen a formar la pared del canal del epéndimo (células representadas en verde en la **figura 1 B**) junto a los endoteliales, los tanicitos y las glías radiales, y se localizan por tanto en la interfase entre LCR y parénquima medular.

La mayor parte del conocimiento del que se dispone actualmente sobre el rol funcional de las CSFcNs en los circuitos espinales (que desarrollaremos en las secciones C y D del presente apartado) proviene de experimentos desarrollados en peces como la lamprea y el pez cebra. A pesar de ello, se asume en la literatura que el rol de las CSFcNs en las diferentes especies es, de manera general, el mismo (Djenoune & Wyart, 2017; Wyart et al., 2023). A continuación, aunque nos concentremos en la descripción de las características de las CSFcNs en roedores, también describiremos cuando se considere necesario alguna característica particular de las CSFcNs en vertebrados inferiores. Consideramos que tener presente la fisiología de estas células en vertebrados inferiores puede aportar a la comprensión, así como orientar la investigación del rol funcional de las mismas en mamíferos como el ratón.

A. *Propiedades electrofisiológicas de las CSFcNs*

Para revisar las propiedades electrofisiológicas de las CSFcNs en roedores, debemos comenzar haciendo referencia a la primera caracterización electrofisiológica pormenorizada de las CSFcNs en mamíferos, la cual fue realizada por Marichal y colaboradores (Marichal et al., 2009) en ratas neonatas. En este trabajo se puso de

manifiesto la heterogeneidad funcional de la población de CSFcNs, reflejando la coexistencia de neuronas con distintos grados de maduración en su repertorio electrofisiológico. Las células de un perfil electrofisiológico más inmaduro en este modelo no desarrollan, o bien desarrollan una única, espiga de sodio (Na^+) en respuesta a un pulso despolarizante; en tanto que las de fenotipo más maduro son capaces de producir trenes de espigas. Si bien la presencia de neuronas con un perfil electrofisiológico inmaduro podría deberse a que este ensayo se llevó a cabo en animales neonatos, cabe destacar que en el ratón adulto también se han descrito dos poblaciones similares a las descritas por Marichal (Orts-Del'Imagine et al., 2016).

Asimismo, el trabajo de Marichal señala que en la rata neonata el potencial de reversión de la corriente mediada por GABA_A Rs da cuenta de un potencial de equilibrio del cloruro más despolarizado en neuronas con un perfil electrofisiológico inmaduro, tal como se ha descrito para neuronas hipocampales (Tozuka et al., 2005). Esta observación también ha sido confirmada recientemente en ratones adultos, donde algunas CSFcNs son despolarizadas por GABA en tanto otras son hiperpolarizadas (Riondel et al., 2024).

Otras características electrofisiológicas relevantes de las CSFcNs en el ratón incluyen la expresión de una multitud de receptores iónicos para diferentes tipos de ligandos, lo que indica que las CSFcNs son altamente moduladas por una amplia variedad de neurotransmisores y neuromoduladores. En efecto, se ha descrito que las CSFcNs poseen receptores GABA_A , receptores glicinérgicos, glutamatérgicos de tipo AMPA/Kainato y colinérgicos de tipo nicotínico (nACh) (Orts-Del'Imagine et al., 2016). Además, expresan receptores purinérgicos P2X (Stoeckel et al., 2003).

En lo que se refiere a las conductancias dependientes de voltaje, además de las conductancias de sodio y potasio, las CSFcNs presentan dos tipos de espigas de calcio (Ca^{++}), a saber: despolarizaciones lentas mediadas por corrientes de Ca^{++} de alto umbral, así como espigas mediadas por la corriente de calcio de bajo umbral I CaT (Johnson et al., 2023; Marichal et al., 2009). Estas últimas son de escasa amplitud y se generan en respuesta al reclutamiento de receptores purinérgicos. Las conductancias de alto umbral median la generación de espigas de Ca^{++} de mayor amplitud, son sensibles a Cd^{2+} y son reclutadas por ACh (Johnson et al., 2023).

Finalmente, una de las características más remarcables de las CSFcNs es que al potencial de reposo presentan una intensa actividad espontánea de corrientes unitarias de gran amplitud (en torno a los 20 pA) mediadas por los canales PKD2L1 (Orts-Del'Imagine et al., 2016), tal como se muestra en la **figura 2**. En la sección que sigue se hará una breve descripción de ese canal.

B. Canal *Polycystic kidney disease 2-like 1* en las CSFcNs.

A pesar de que los canales PKD2L1 no forman parte del centro de este trabajo, los mismos se expresan en las CSFcNs en todas las especies estudiadas. Es por esta razón que a continuación describiremos sus características principales.

Los canales PKD2L1 pertenecen a la familia de los receptores TRP (de “*transient receptor potential*”, por sus siglas en inglés). Los canales TRP se dividen en 7 subfamilias de acuerdo con el grado de homología de sus secuencias peptídicas (Venkatachalam & Montell, 2007). El canal PKD2L1 es un homotetrámero que forma parte de la familia TRPP (TRP policísticos) o TRPP3 (Hulse et al., 2018). Como el resto de los canales TRP, PKD2L1 forma un canal no selectivo modulado por Ca^{++} (DeCaen et al., 2016) y permeable a iones de Na^+ , K^+ y Ca^{++} (X.-Z. Chen et al., 1999; DeCaen et al., 2014). Desde el punto de vista molecular, los canales TRP son tetrámeros (**figura 2 A**) en los que cada una de las 4 subunidades presenta 6 dominios transmembrana (S1 a S6); los dominios S5 y S6 constituyen el poro del canal (Hulse et al., 2018). Desde el punto de vista funcional, estos canales juegan roles fisiológicos importantísimos gracias a su capacidad de responder a una variedad amplísima de estímulos, como ser térmicos, químicos, mecánicos y osmóticos (Venkatachalam & Montell, 2007).

Desde el punto de vista funcional, los canales PKD2L1 se caracterizan por tener una conductancia unitaria de varias decenas de pS, lo que hace que su actividad sea evidente en registros de tipo *patch*, incluso en configuración de célula entera, tal cual se observa en la **figura 2 B**. A partir del registro de varias CSFcNs estimamos una conductancia unitaria de unos 200 pS, muy cercana a la que se había descrito previamente en la literatura (DeCaen et al., 2014). Las propiedades funcionales de este canal pueden modificarse en función de diversos factores, tales como el Ca^{++} intracelular (DeCaen et al., 2016), el pH (Jalalvand, Robertson, Wallén, et al., 2016; Jalalvand et al., 2018; Orts-Del’Immagine et al., 2012), su asociación con otras moléculas para formar heterodímeros (Delling et al., 2013; Inada et al., 2008), estímulos osmóticos (Orts-Del’Immagine et al., 2012), estímulos mecánicos (Sternberg et al., 2018) e incluso la temperatura (Higuchi et al., 2014) pudiendo variar su frecuencia de apertura e inactivación cuando la temperatura cambia discretamente (de 32 a 36 °C).

Si bien el canal PKD2L1 fue descrito por primera vez como un sensor de pH ácido en las papilas gustativas (Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006), también se ha caracterizado la sensibilidad de este canal al pH básico, en el rango de pH entre 8 y 9 (Shimizu et al., 2011).

En lo que se refiere a su modulación por asociación con otras proteínas, se ha observado que el complejo PKD1L1 – PKD2L1 media la señalización por Ca^{++} en cilios sensoriales de la retina (DeCaen et al., 2014; Delling et al., 2013). En sistemas de expresión, la asociación de PKD2L1 con PKD1L3 parece ser necesaria para otorgarle al canal su

sensibilidad al pH (Ishimaru et al., 2006; Shimizu et al., 2011), aunque esto está en discusión. Además, se ha visto que la calmodulina regula la actividad del canal mediante una interacción directa entre ambas proteínas (Delling et al., 2013).

Si bien originalmente se creía que sólo las CSFcNs expresaban PKD2L1 en el SNC (Djenoune et al., 2014; Huang et al., 2006), actualmente se han caracterizado células bipolares en la región ventromedial de la ME del ratón cuyas características electrofisiológicas así como su perfil de expresión molecular resultan similares a las CSFcNs, y expresan PKD2L1 (Jurčić et al., 2021). Además, el canal también se ha evidenciado en el cilio de células hipocampales en el ratón (Vien et al., 2023).

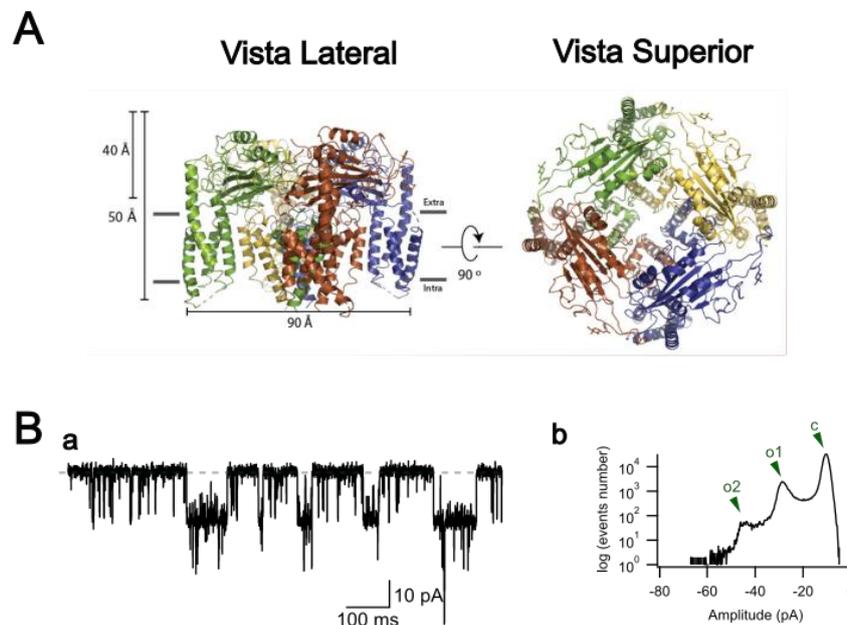


Figura 2. El canal PKD2L1. **A.** Arquitectura del canal PKD2L1. Se muestran las vistas lateral y superior. Los diferentes colores corresponden a las diferentes subunidades del tetrámero. Tomado de Hulse et al., 2018. **Ba.** Registros de la actividad espontánea de una CSFcN registrada en modo célula entera, fijación de voltaje a -60 mV, con una solución interna de gluconato de potasio. La línea punteada verde indica la corriente de base, cuando todos los canales están cerrados (“c” en el histograma en **b**). **b.** Histograma de la corriente registrada en **a**. Los 3 picos corresponden a los 3 estados del canal: c, cerrado; o1, 1 canal abierto; o2, 2 canales abiertos.

C. Función del proceso apical como estructura sensorial polimodal

En vertebrados inferiores el rol sensorial del PAP de las CSFcNs ha sido bien dilucidado. En efecto, en estos animales el PAP está implicado en el sensado de estímulos químicos

y mecánicos. En esta función el rol de los canales PKD2L1 es clave pues este canal es, al menos en parte, el responsable de la transducción de dichos estímulos. Así, se ha demostrado en el pez cebra que el canal PKD2L1 funciona como mecanorreceptor, con lo cual las CSFcNs son capaces de sensar por ejemplo la circulación de LCR por el CC (Sternberg et al., 2018). En el mismo sentido, en la lamprea los movimientos laterales de la columna (como los que ocurren durante el nado) producen el reclutamiento de las CSFcNs (Jalalvand, Robertson, Wallén, et al., 2016), aunque en este caso la proteína responsable parece ser un canal ASIC (de "*Acid Sensitive Ion Channel*"). Además, en la lamprea, las CSFcN son sensibles a cambios de pH: las acidificaciones discretas (pH = 7,1) del medio extracelular producen una respuesta de corriente despolarizante mediada por canales de tipo ASIC3 (Jalalvand, Robertson, Wallén, et al., 2016), en tanto que la alcalinización del medio (pH = 7,7) produce un aumento en la frecuencia de corrientes unitarias mediadas por PKD2L1 (Jalalvand, Robertson, Tostivint, et al., 2016).

En el ratón las CSFcNs también son sensibles a los cambios de pH del medio extracelular. Si bien se ha reportado que la aplicación de una solución ácida (pH 5) induce una corriente transitoria rápida mediada por canales de tipo ASIC1, y que la aplicación de una solución básica (pH 9) provoca un incremento de la frecuencia de apertura de corrientes unitarias mediadas por PKD2L1 (Orts-Del'Immagine et al., 2016), actualmente no hay trabajos que exploren la respuesta de las CSFcNs frente a cambios moderados de pH en el ratón, emulando fluctuaciones fisiológicas de este parámetro.

Asimismo, se ha demostrado que las CSFcNs del ratón son capaces de responder a estímulos osmóticos (Orts-Del'Immagine et al., 2012).

Dado que, como acaba de ser descrito, se le atribuye al PAp una función sensorial polimodal, la estructura del PAp ha sido centro de atención para los diferentes grupos que se interesan en estas neuronas. Como se observa en la **figura 3**, el PAp tiene una estructura diferente cuando se comparan especies diferentes.

Para empezar, en peces y reptiles el PAp de las CSFcNs de la ME presenta múltiples estereocilios que se proyectan hacia el CC en forma de cepillo, y un kinocilio que contacta la fibra de Reissner (agregación fibrosa de SCO-spondina secretada por el órgano subcomisural, que se extiende a lo largo de toda la extensión del CC de la ME). Esta organización es reminiscente del mecanismo de mecanotransducción en la cóclea, donde los cilios de las células ciliadas contactan la membrana tectorial y el movimiento de la misma induce la apertura de canales (Djenoune & Wyart, 2017; Jalalvand, Robertson, Wallén, et al., 2016; Sternberg et al., 2018; Trujillo-Cenóz et al., 2007; Vigh & Vigh-Teichmann, 1998; Wyart et al., 2009, 2023).

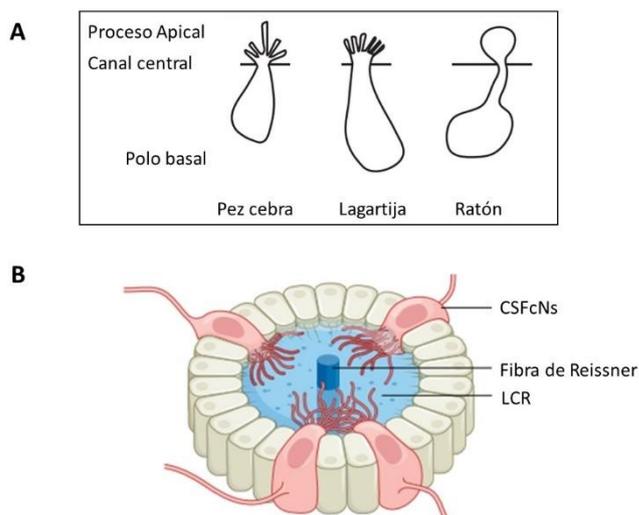


Figura 3. Características estructurales del PAp. Representación esquemática de las características estructurales del PAp en distintas especies. **A.** El PAp en peces y reptiles presenta múltiples estructuras ciliares, que no están presentes en el PAp de ratones. **B.** En peces se destaca la presencia de un kinocilio en contacto con la fibra de Reissner, como parte de un sistema mecano sensorial. Modificado de Djenoune & Wyart, 2017 y Wyart et al., 2009.

En roedores como la rata, sin embargo, se ha descrito que las CSFcNs presentan un cilio primario en el PAp, mas no esterocilios (Stoeckel et al., 2003). Si bien en el ratón un grupo también ha descrito la presencia de un cilio primario en el PAp, las evidencias presentadas al respecto resultan desde nuestro punto de vista poco convincentes (Gerstmann et al., 2022; Orts-Del'Immagine et al., 2014). En efecto, como fue mencionado precedentemente, las CSFcNs comparten vecindad con los endocitos, que poseen 3 o 4 cilios por célula. Esto hace que la interpretación de los resultados morfológicos (microscopía electrónica de transmisión, inmunohistoquímica) deba hacerse con mucha precaución ya que resulta difícil atribuir con certeza el origen del cilio. De hecho, nuestro laboratorio tiene resultados preliminares, que están fuera del objetivo de este trabajo de maestría, donde se combinan técnicas de inmunohistoquímica y reconstrucciones 3D a partir de cortes seriados de MET, que indican que las CSFcN no presentan cilio primario a nivel del PAp.

D. Rol de las CSFcNs como parte de un sistema de integración sensorio-motora.

En peces la participación de las CSFcNs en la modulación sensorio-motora se encuentra bien dilucidada. En la lamprea las CSFcNs de la ME proyectan colaterales axonales al asta ventral, donde podrían interactuar con los centros generadores de patrones (CGP) locomotores (Jalalvand, Robertson, Tostivint, et al., 2016). Los CGP son circuitos neuronales que producen patrones motores rítmicos, como los implicados en el desarrollo de la marcha, sin necesidad de entradas sensoriales o control por centros superiores (Marder & Bucher, 2001). En la lamprea, la eferencia rítmica de dichos CGP, registrada como potenciales compuestos a nivel de las raíces ventrales, reduce su frecuencia frente a aumentos y reducciones del pH extracelular, así como en respuesta a somatostatina aplicada en el baño (Jalalvand, Robertson, Tostivint, et al., 2016). Puesto que sólo las CSFcNs expresan somatostatina en la ME de estos animales, estos hallazgos

sugieren que estas células podrían mediar modulaciones de la función locomotora en respuesta a cambios en el pH del medio extracelular.

En pez cebra las CSFcNs proyectan contactos GABAérgicos sobre interneuronas glutamatérgicas implicadas en la generación de patrones locomotores como el nado lento (Fidelin et al., 2015). Las proyecciones dorsales de las CSFcNs contactan con motoneuronas primarias así como con interneuronas glutamatérgicas comisurales involucradas en la modulación sensoriomotora y reclutamiento de motoneuronas contralaterales (Hubbard et al., 2016). En esta especie, la mecanorrecepción de las CSFcNs forma parte de un sistema de retroalimentación sensorio – motor. Estas células integran información relativa a la posición del cuerpo durante la ejecución de movimientos de nado. La activación de CSFcNs ventrales está implicada en el control postural durante la locomoción rápida luego de la respuesta de escape (Hubbard et al., 2016). Asimismo, las CSFcNs sensan la flexión tanto activa (durante el nado) como pasiva de la ME (Böhm et al., 2016). En animales KO (*knockout*) para PKD2L1 hay compromiso de dicha respuesta mecanosensorial (ver más arriba), al tiempo que se reduce la frecuencia de los movimientos durante el nado (Böhm et al., 2016). La activación optogenética de estas neuronas conduce al desarrollo de movimientos característicos del nado lento (Fidelin et al., 2015; Wyart et al., 2009) en tanto que su activación durante el nado produce una reducción de la frecuencia de dichos movimientos (Fidelin et al., 2015). Por último, la inhibición de la actividad de estas células tiene como consecuencia la reducción de la frecuencia del nado espontáneo (Wyart et al., 2009).

En el ratón, las CSFcNs forman una red neuronal interconectada por medio de proyecciones recurrentes (**figura 4**). Los axones se ramifican localmente, y la rama principal discurre transversalmente hasta la región ventro-medial donde forman un haz longitudinal por donde discurren en dirección cefálica para emerger nuevamente hacia el CC, e inervar a otras CSFcNs (Nakamura et al., 2023). Los circuitos locomotores de la ME en el ratón (Kiehn, 2016) reciben inervación por parte de las CSFcNs, tal como se ilustra en la **figura 4**. Las CSFcNs establecen contactos inhibitorios funcionales con interneuronas colinérgicas premotoras V0c que se localizan en la ME medial, próximas al CC (Gerstmann et al., 2022; Nakamura et al., 2023; Zagoraiou et al., 2009). Las interneuronas premotoras V2a también presentan indicios anatómicos de formar contactos sinápticos con axones de CSFcNs (Nakamura et al., 2023). Además, las motoneuronas axiales que inervan el tronco y la porción proximal de los miembros extienden fibras dendríticas en dirección al CC donde contactan con terminales presinápticas procedentes de las CSFcNs (Nakamura et al., 2023).

Experimentos recientes indican que, en roedores, la eliminación selectiva de las CSFcNs por inducción de la expresión de toxina diftérica afecta el desempeño de algunos movimientos especializados (desplazamiento sobre barra o escalera horizontal), pero no afecta la actividad locomotora general ni la generación del ritmo y patrones locomotores estereotipados (Gerstmann et al., 2022).

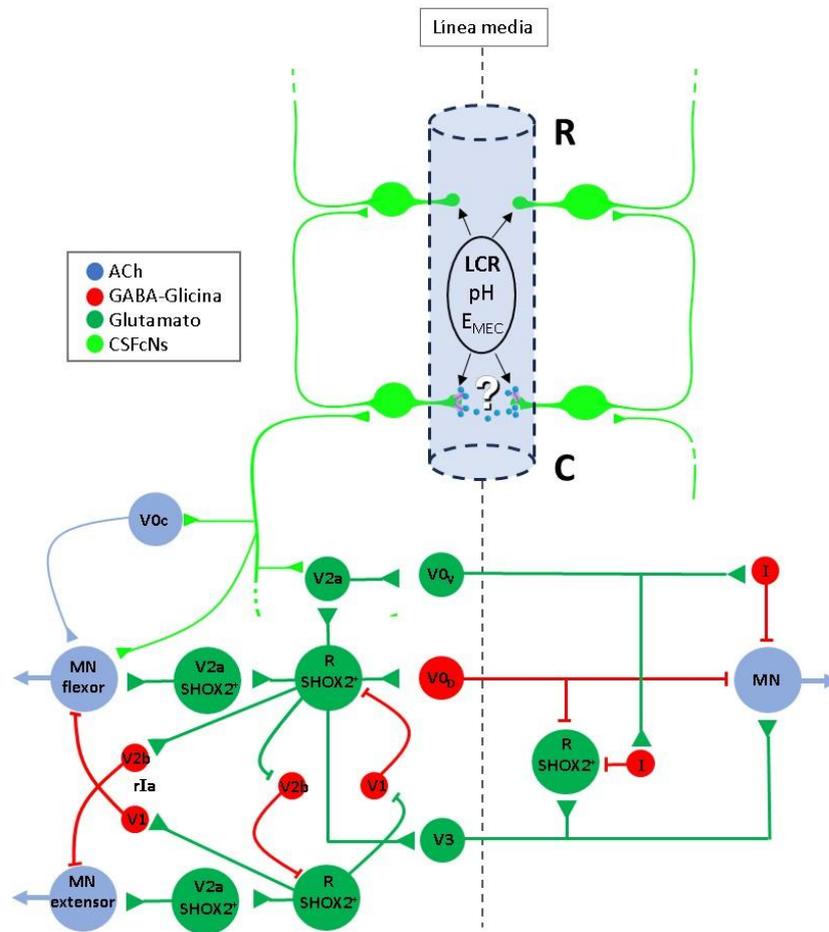


Figura 4. Representación esquemática de las CSFcNs como parte de un sistema de integración sensorio-motora en la ME del ratón. En la porción superior del esquema se representan las CSFcNs en torno al CC. Se ilustran los principales roles funcionales asignados al PAp (mecano y quimio recepción), así como el objeto de estudio del presente trabajo: el posible rol secretor del PAp, en el marco de un mecanismo de comunicación autócrina o parácrina. Las CSFcNs forman una red interconectada por contactos recurrentes fundamentalmente en dirección cefálica. Además, inervan Interneuronas comisurales V2a de la ME, así como interneuronas colinérgicas premotoras V0c y motoneuronas axiales. Las mismas se representan en la porción inferior del esquema donde se muestra un circuito locomotor de la ME del ratón. Las neuronas comisurales glutamatérgicas (VOV y V3) y GABAérgicas (VOD) proyectan sobre motoneuronas (MN), interneuronas inhibitorias (I) y neuronas marcapasos (R, SHOX2+) en la ME contralateral. Las neuronas marcapasos son responsables de la generación de eferencias rítmicas para la locomoción, e interactúan con interneuronas inhibitorias V2b y V1 como parte de un mecanismo de inhibición recíproca, constituyendo los denominados centros generadores de patrones (CGPs) de la ME. Estas neuronas se organizan en módulos funcionales que permiten el reclutamiento de grupos musculares flexores o extensores, a través del reclutamiento de interneuronas glutamatérgicas V2a SHOX2+ e interneuronas V2b y V1 de tipo r1a.

Otro grupo ha utilizado la técnica de los DREADDs (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*) para inhibir selectivamente una población neuronal mediante el uso de un ligando sintético que aumenta la permeabilidad al potasio y por ende hiperpolariza a las neuronas. Por medio de esta técnica se verificó que la inhibición de las CSFcNs genera un incremento del largo de los pasos a expensas de la frecuencia de la marcha en la prueba de la cinta caminadora (o cinta sin fin, donde se evalúa la habilidad motora y la coordinación de los animales al obligarlos a cruzar una escalera con peldaños de diferentes alturas y distancias, registrando errores y cambios en el patrón de movimiento), así como un incremento de los fallos en las pruebas de escalera horizontal, confirmando el rol de las CSFcNs en el desempeño de tareas motoras finas (Nakamura et al., 2023).

III. Posible rol secretor del proceso apical de las CSFcNs

El PAp de las CSFcNs constituye un compartimento dendrítico atípico. Tal como se desarrolló en secciones previas del presente ensayo, el PAp puede considerarse una estructura sensorial implicada en la quimio y mecano recepción. En el presente trabajo, en base a imágenes de microscopía electrónica obtenidas por nuestro grupo, que parecen sugerir la presencia de múltiples elementos tubulares y vesiculares en el PAp, nos proponemos abordar la posibilidad de un rol secretor del PAp, tal como ha sido propuesto por Djenoune y Wyart (Djenoune & Wyart, 2017). Cabe destacar que tanto en humanos (Casado et al., 2014; Rada et al., 1999) como en ratas (Ciriacks Klinker & Bowser, 2007; Sauvinet et al., 2003) se ha reportado la presencia de GABA en muestras de LCR. Dado que las CSFcNs son células GABAérgicas, nos hemos propuesto indagar respecto de la posible secreción de GABA desde el PAp de las CSFcNs hacia el LCR, en el marco de un mecanismo de comunicación de tipo neuro-humoral. En este caso, neuro-humoral refiere a que no existe una estructura sináptica especializada como en las sinapsis químicas clásicas, sino que el producto de secreción, el GABA, se liberaría directamente al LCR, de manera análoga a lo que sucede con las neuronas neurohipofisarias, que liberan su producto de secreción al torrente sanguíneo.

Aunque las CSFcNs en vertebrados no mamíferos integran un sistema de modulación sensoriomotora, en ratones las pruebas de tal función son aún limitadas. La liberación vesicular de GABA desde el PAp podría subyacer a la integración de la información sensorial transducida en el PAp, permitiendo la adaptación de la función de las redes locomotoras de la ME a los cambios en la composición del LCR.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

I. Hipótesis

El PAp de las CSFcNs es un compartimento secretor implicado en la secreción vesicular voltaje-dependiente de GABA hacia el LCR como parte de un mecanismo de comunicación neuro-humoral.

II. Objetivos generales y específicos

Objetivo General: Indagar respecto de un posible rol secretor vesicular de GABA desde el PAp de las CSFcNs en un modelo *in vitro* de ME del ratón adulto.

Objetivos Específicos:

Para demostrar la secreción vesicular de GABA desde el PAp de las CSFcNs hacia el LCR recopilaremos evidencia ultraestructural, molecular y electrofisiológica para satisfacer los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener evidencia ultraestructural y morfológica de la existencia de un aparato secretor a nivel del PAp.
2. Obtener evidencias funcionales de la secreción vesicular de GABA desde los PAs.

ABORDAJE EXPERIMENTAL, METODOLOGÍA Y MATERIALES

La información de todos los reactivos utilizados en este trabajo se detalla en el Anexo 1.

I. Animales.

En el presente trabajo hemos utilizado la cepa de ratones transgénicos GATA-3, tanto machos como hembras, con edades entre 1 y 2 meses. Los ratones fueron mantenidos en el bioterio del IIBCE, alimentados ad libitum y expuestos a un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 hs. La cepa GATA-3 ha sido modificada para expresar eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) bajo el control del promotor del factor de transcripción GATA3, el cual se encuentra activo en múltiples tipos celulares tales como células del sistema inmunitario (Tindemans et al., 2014), de la epidermis (Masse et al., 2014) y de la retina (P. Chen et al., 2022). En la ME la expresión de eGFP bajo el promotor de GATA3 resulta en el marcaje fluorescente del citoplasma de las CSFcNs. Estos animales transgénicos fueron donados por el Dr. Stavros Malas de la universidad de Chipre, y tienen como base la cepa CD1. Todos los protocolos aquí presentados cuentan con las autorizaciones correspondientes por parte de las entidades reguladoras de la ética en el manejo de animales de laboratorio (CEUA IIBCE, 001-01-2023).

II. Ensayos de inmunohistoquímica.

Los animales fueron sedados con Diacepam 2 μ l/g y anestesiados con una solución de 80% ketamina 50 mg/ml y 20% xilacina al 2%, en una dosis de 10 μ g/g para proceder a la fijación intra-cardíaca mediante cateterización del ventrículo izquierdo y perfusión. El animal anestesiado fue fijado con alfileres a una plancha de espuma en decúbito dorsal. Se realizó una incisión en el abdomen desde donde se realizó un neumotórax para acceder a la cavidad torácica. Rápidamente se seccionaron y retiraron las costillas y se procedió a canular el ventrículo izquierdo para la inyección de fluidos hacia la circulación sistémica. Se realizó una incisión en el hígado como vía de drenaje. En primer lugar, se perfundió una solución anticoagulante (20 ml de suero fisiológico + 200 μ l de citrato de Na⁺ al 2%) con el propósito de facilitar el drenaje completo de la sangre. Este proceso de exanguinación permite lavar los vasos y los tejidos, eliminando así cualquier residuo sanguíneo. Una vez logrado este lavado, se procedió a la circulación del fijador, i.e. 50 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato salino (PBS, pH = 7,4).

Para la identificación de las porciones cervical, torácica, lumbar y sacra de la ME se utilizaron como indicadores anatómicos los ensanchamientos cervical y lumbar. La médula fijada fue luego cortada en rodajas transversales (**figura 5 A**) de 70 μ m de

espesor o bien se realizó el preparado de hemi-médula mediante tracción mecánica separando la médula por la línea media en mitades derecha e izquierda, exponiendo el CC (**figura 5 C**). Las rodajas transversales se obtuvieron mediante el encastre del tejido en un medio de gelatina albúmina (Anexo 1). El tejido encastrado se cortó en micrótopo en tampón fosfato (PB). Puesto que en los animales GATA3 se marca con GFP el haz medular ventromedial, por donde discurren los axones de las CSFcNs, utilizamos esta referencia para identificar las regiones ventral y dorsal, tanto en rodajas como en hemimédula.

El protocolo para los ensayos de IHQ contra moléculas implicadas en la secreción vesicular (VGAT (*Vesicular GABA Transporter*), sinaptotagmina 1 y 2 (Syt1, Syt2) y sintaxina 4) consistió en los pasos siguientes: permeabilización y bloqueo con PBS - tritón (PBST) 1% + suero fetal bobino (SFB) 1% por 3 hs; incubación con anticuerpo primario (dilución 1/500) en PBST 0,3% + SFB (0,1%) durante 36hs; incubación con anticuerpo secundario conjugado con Alexa (dilución 1/1500) en PBST 0,3% + SFB (0,1%) durante 1h y 30 min; incubación con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (0,1 µg/ml) en PBS por 15 min; montado con medio Fluoromount™. Para la IHQ contra Syt1 luego del paso de permeabilización y bloqueo no volvimos a usar tritón ya que revierte la unión de este anticuerpo con su blanco molecular. Las características específicas de los anticuerpos utilizados se detallan en el Anexo 1. Para los controles negativos se utilizó el mismo protocolo en ausencia de anticuerpos primarios, en tanto que el marcaje de terminales sinápticas en los preparados de ME sirvió como control positivo. Las muestras montadas fueron visualizadas mediante microscopía confocal con un microscopio Olympus Fluoview FV300.

III. Microscopía electrónica de transmisión

Para los experimentos de MET se utilizaron dos tipos de preparaciones, a saber: rodajas de ME obtenidas a partir de ratones fijados por perfusión intra-cardíaca (como se detalla en la sección anterior), o bien rodajas de ME ex vivo fijadas por inmersión. Estas últimas fueron sometidas a un tratamiento previo a la fijación, que consistió en la inmersión de las mismas en una solución extracelular modificada (alta concentración de K⁺: 62,4 mM) para provocar una despolarización de aproximadamente 86 mV de amplitud durante 5 minutos. Los controles se realizaron con rodajas incubadas en LCR (solución extracelular) normal. La composición de las soluciones mencionadas en esta sección se detalla en el Anexo 1. La solución de fijación utilizada fue PFA al 4% + glutaraldehído 2% en PBS.

Para la obtención de las rodajas se disecó la ME y se realizaron cortes transversales de 200 µm de espesor utilizando un vibrátomo (LEICA VT 1000S). Se realizó una posfijación con osmio al 1% en PBS por una hora. El tejido se sometió a deshidratación en

concentraciones de etanol progresivamente mayores y luego en acetona anhidra. Se incluyó el preparado en Araldita para elaborar los bloques (Anexo 1), que fueron tallados para realizar cortes finos (1 μm de espesor) con un ultramicrotomo LKB ULTRATOME 4801A y cuchillas de vidrio. Los cortes finos fueron teñidos con azul de metileno borácico 1% durante 30 s, lavados con H_2O mQ y observados en el microscopio de luz para identificar las estructuras de interés. El bloque fue re-tallado para conservar la región del canal medular central y se realizaron cortes ultrafinos (60 a 80 nm de espesor) que se montaron en horquillas de cobre de ranura de 2×1 mm de diámetro, previamente recubiertas con membranas Polivinilformvar: 0.3% (Anexo 1). Las secciones montadas fueron tratadas para incrementar la densidad electrónica de las membranas celulares (contraste) con una solución de acetato de uranilo al 2% (4°C, 24 hs) y luego en citrato de plomo (Anexo 1) por 10 minutos en atmósfera de nitrógeno puro. Los preparados fueron examinados por MET (equipo JEOL CX 100).

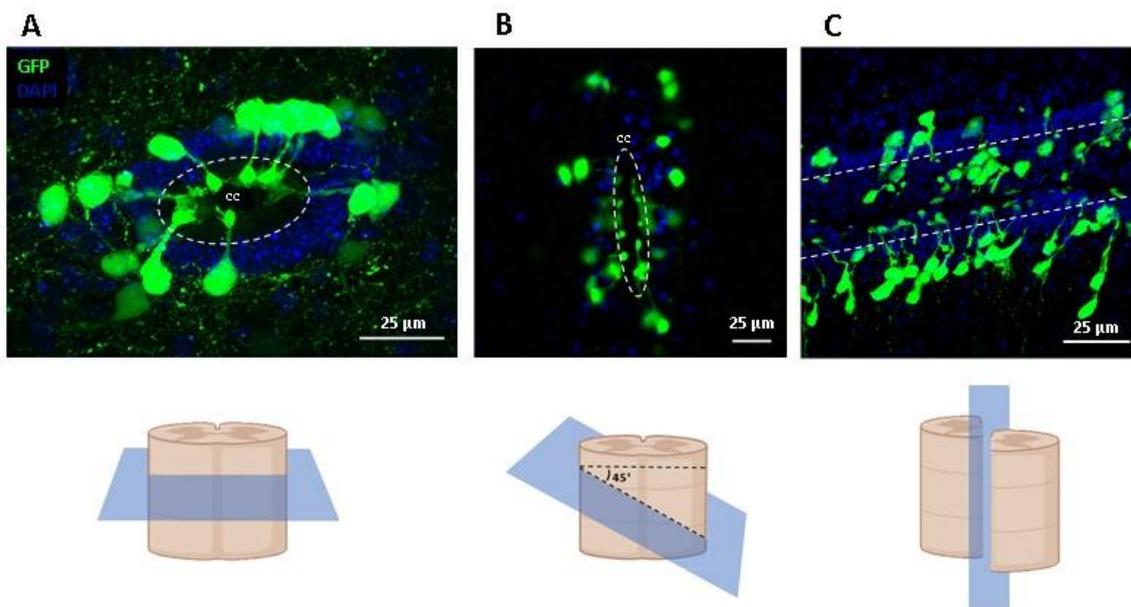


Figura 5. Preparados de ME utilizados en este trabajo. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal (proyecciones en Z) muestran a las CSFcNs en verde (GFP) y a los núcleos celulares en azul (DAPI), junto con una representación esquemática del preparado empleado (esquemas inferiores). La línea blanca punteada delimita el CC. **A.** Rodaja de ME obtenida mediante cortes transversales. **B.** Rodaja de ME obtenida por cortes oblicuos. Notar que se logra una mayor apertura del canal respecto del corte transversal, lo cual facilita el acceso a los PAp en experimentos electrofisiológicos. **C.** Hemimédula obtenida por el método de tracción mecánica, que resulta en la obtención de dos hemimédulas, izquierda y derecha.

IV. Microscopía confocal y análisis de imágenes.

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas con un microscopio LSM ZEISS 800 AiryScan. Posteriormente a la adquisición se hicieron apilamientos en Z (0.2 μm), lo cual nos permitió luego realizar reconstrucciones tridimensionales de las células y las señales de interés. Esto también nos permitió estudiar la colocalización de las señales en los ejes X, Y y Z. El microscopio confocal que utilizamos para adquirir las señales cuenta con cuatro láseres de estimulación de longitudes de onda 405, 488, 561, y 640 nm. La tabla siguiente muestra los fluoróforos utilizados en este trabajo, la longitud de onda de su pico de excitación (λ_{EX}), la longitud de onda del láser utilizado para excitar el fluoróforo en nuestras condiciones experimentales (λ_{L}) y la longitud de onda del pico de emisión (λ_{EM}) (*spectrum viewer* de aatbio.com).

FLUORÓFORO	λ_{EX} (nm)	λ_{L} (nm)	λ_{EM} (nm)	d (nm)
GFP	489	488	508	221.3
DAPI	359	405	457	199.1
Alexa Flúor 633	631	640	650	283.2
Alexa Flúor 647	650	640	671	292.3

Para evaluar la colocalización de la señal GFP en los PAp con las señales obtenidas mediante IHQ, se analizaron las imágenes apiladas adquiridas por microscopía confocal. El análisis fue realizado con el *plugin* JACoP (Bolte & Cordelières, 2006) en FIJI (Schindelin et al., 2012), utilizando el abordaje de Costes descrito en Bolte & Cordelières, 2006. Brevemente, este abordaje involucra dos etapas. Primeramente, se realiza un cálculo automático del umbral para ambas señales con el fin de reducir el ruido y minimizar la probabilidad de obtener falsos positivos. Para ello, se analiza la intensidad de ambas señales en diferentes regiones de la imagen. Los valores límite se hallan partiendo de la intensidad máxima de cada canal y se van reduciendo progresivamente, al tiempo que se calcula el coeficiente de correlación de Pearson (CCP) para cada decremento. Los umbrales finales se establecen en los valores que minimizan la contribución del ruido (es decir, cuando el CCP por debajo del umbral es nulo o negativo). Cabe destacar que el CCP mide la correlación entre las intensidades de los píxeles en los dos canales de la imagen. La segunda etapa del análisis de colocalización con el método de Costes consiste en la aleatorización de las imágenes apiladas, y la comparación entre el CCP de las imágenes originales y aleatorizadas, para estimar la probabilidad de que la colocalización observada para ambas señales sea producto del azar (Costes et al., 2004). Es decir, se realiza la aleatorización para determinar la significancia estadística de la colocalización.

Este método resulta de particular utilidad para señales que presentan colocalización parcial, así como distintos niveles de intensidad en los canales comparados.

Los PAp donde se encontró colocalización con las señales obtenidas por IHQ fueron contados manualmente en las regiones ventral y dorsal, así como para los niveles espinales cervical, torácico y lumbar.

V. Cultivo de células HEK-GABA

Se cultivaron células HEK-293 (*human embryonic kidney*) genéticamente modificadas para expresar el GABA_AR en la membrana plasmática (HEK-GABA). Esta línea celular fue donada por el Dr. Hounsgaard de la Universidad de Copenhague y fue reacondicionada para nuestros experimentos. Los cultivos se realizaron según los lineamientos de ATCC (2023) y Synthego, s.f. Brevemente, utilizamos medio de cultivo estéril DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) completo con L-glutamina y bicarbonato sódico (3,7 g/L), adicionado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Anexo 1). Las células fueron incubadas a 37 °C, una concentración atmosférica de CO₂ del 5 %, y una humedad relativa entorno al 95 %.

La individualización de las células para los pasajes y para utilizarlas en experimentos electrofisiológicos consistió en una disgregación enzimática leve (5 minutos a temperatura ambiente). Se sembraron las células a una confluencia inicial del 20 al 30 %, lo cual corresponde a 1×10^4 a 4×10^4 células viables por cm². Cuando la confluencia alcanzó un 80 a 90 % (6×10^4 a 7×10^4 células/cm²) se realizaron subcultivos. Con excepción del SFB todas las soluciones y reactivos utilizados para los cultivos fueron termostatzados previamente a 37 °C en baño. Para manipular las células se utilizó una campana de flujo laminar vertical (bioseguridad nivel II).

Los cultivos de mantenimiento fueron realizados en botellas T25. Para los experimentos electrofisiológicos las células fueron sembradas en placas de 35 mm (8 cm²; 2,5 ml).

Para la criopreservación de la línea celular se utilizaron viales de 1 ml preparados para contener una suspensión celular (1×10^6 células /mL) en un medio de congelación compuesto por 90 % SFB y 10 % DMSO (dimetilsulfóxido).

Los cultivos celulares fueron inspeccionados periódicamente para asegurar el buen estado de las células y verificar la ausencia de contaminantes. Para descartar la contaminación de nuestros cultivos por micoplasma realizamos tinciones nucleares con verde metilo 2% (Prieto et al., 2014) y citoplasmáticas con eosina-faloidina (dilución 1/1000), y se observaron los preparados en el microscopio confocal (**figura suplementaria 2**).

VI. Experimentos electrofisiológicos.

A. Obtención de las rodajas de médula espinal.

Los animales fueron eutanasiados por decapitación luego de administrárseles anestesia inhalatoria (isoflurano, 400 μ l en un algodón, dentro de un recipiente de 250 ml de capacidad). Luego de eutanasiar al animal, se disecó la columna vertebral junto con una porción de la parrilla costal. Este preparado se fijó mediante alfileres con la porción ventral hacia arriba, al fondo de una placa de Petri recubierta con *sylgard*[®] y llena de solución de extracción fría (anexo 1). La disección de la ME se realizó con el preparado sumergido en dicha solución. Se realizó una laminectomía ventral para exponer la ME dentro del canal vertebral. Posteriormente se seccionaron los nervios espinales, se extrajo la ME del canal medular, las meninges fueron removidas y el preparado fue encastrado en agar de bajo punto de fusión para su corte en micrótomos. Se utilizaron rodajas de 300 μ m de espesor que fueron cortadas de manera transversal (**figura 5 A**) u oblicua (**figura 5 B**). Para estas últimas el encastre implicó la construcción de un bloque de agar con un ángulo de 45° sobre el cual se colocó la médula que fue luego cubierta por agar líquido a 34 °C. El preparado encastrado fue montado en un soporte para su corte en vibrátomo (MICROM HM 650 V) dentro de la solución de corte fría. Luego de cortadas, las rodajas fueron inmediatamente transferidas a un recipiente con solución extracelular (anexo 1) mantenida a 34°C con la ayuda de un baño maría (Grant SUB Aqua Pro) y barboteada con carbógeno medicinal (95% oxígeno, 5% CO₂) durante una hora previa a la obtención de registros electrofisiológicos. El pH y la osmolaridad de las soluciones utilizadas fue de 7,4 y 300 mOsm/L respectivamente.

B. Adquisición de registros electrofisiológicos en rodajas de médula espinal

Las rodajas de ME fueron transferidas a una cámara de registro donde fueron mantenidas a 34 °C (Luigs & Neumann Badcontroller V). Utilizamos una bomba peristáltica (PPS2 de Multichannel Systems) para mantener una perfusión continua de solución extracelular carbogeneada dentro de la cámara de registro. Las pipetas de vidrio fueron estiradas mediante calor con un estirador (PIP 6 de HEKA) para obtener electrodos de resistencia entre 7 (registros somáticos) y 12 (registros del PAp) M Ω .

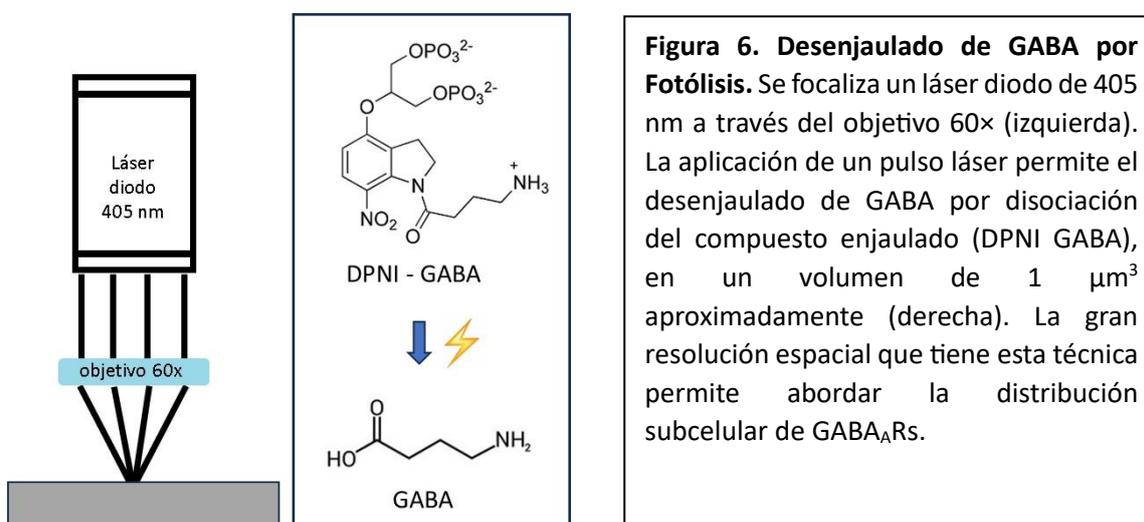
La adquisición de señales se realizó con un amplificador HEKA (EPC10 USB) con tarjeta convertora integrada y el programa Patchmaster. El análisis posterior se realizó con Igor Pro9 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) y macros para Igor: Taro Tools y Neuromatic. Para visualizar las señales fluorescentes de nuestro preparado durante el *patch* utilizamos LEDs controlados por un controlador Optoled (Cairn Research). Para la

iluminación de la GFP se utilizó un LED con un pico de emisión a 470 nm; para excitar el Alexa 594 se utilizó un LED blanco con un filtro de excitación 572 ± 35 nm. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara ANDOR iXon3 y el software Andor Solis.

C. Protocolo para el desenjaulado de GABA

El desenjaulado de 1 mM de GABA a partir del compuesto enjaulado DPNI-GABA (*nitroindoline-caged GABA*) (Trigo, Corrie, et al., 2009; Trigo, Papageorgiou, et al., 2009) (**figura 6**) se realizó con un láser diodo de 405 nm focalizado a través del objetivo 60 \times . Se utilizaron pulsos de luz de 0,3 a 1 ms de duración, y potencias de 1 a 3 mW a la salida del objetivo.

Para el desenjaulado de GABA en el PAp se realizaron registros de *patch* en modo célula entera (*WCR, Whole cell recording*) de CSFcNs en rodajas transversales de ME, con una solución interna de gluconato de K^+ ($n = 4$). Se aplicó 1 mM de DPNI-GABA por presión durante 30 segundos y se procedió al desenjaulado por fotólisis mediante la aplicación de un pulso láser de 1 ms de duración. En una célula se realizó este protocolo en presencia de gabazina (antagonista de los receptores GABAA) 3 μ M en el baño.



D. Protocolo para la caracterización de corrientes de calcio operadas por voltaje en las CSFcNs.

Se registraron las CSFcNs en fijación de voltaje en presencia de bloqueantes para conductancias activas de Na^+ y K^+ en el baño: tetrodotoxina (TTX) 0,4 μ M; tetraetilamonio (TEA) 4 mM; 4-aminopiridina (4AP) 2 mM. Además, para bloquear conductancias activas de K^+ utilizamos una solución interna de cloruro de cesio (ClCs, anexo 1). Para poner en evidencia la componente de tipo T (ICaT) se recurrió al bloqueo

específico de la misma con TTAP2 5 μ M en el baño. Las corrientes de Ca^{++} se registraron durante la aplicación de una familia de pulsos de voltaje (desde -60 hasta 20 mV con un incremento de 10 mV por pulso), precedidos por prepulsos de -60 o -90 mV.

E. Protocolo para caracterizar la sensibilidad de los *sniffers* de GABA.

Se caracterizó la respuesta de *sniffers* a GABA mediante desenjaulado de GABA en parches escindidos (*outside-out*) de membrana, así como por aplicación por presión de GABA en células enteras. El desenjaulado de GABA por fotólisis se realizó a distancias variables del parche de membrana (solución interna de KCl) mediante la aplicación de pulsos láser de 500 o 300 μ s de duración. Se caracterizó la relación corriente – voltaje (I-V) de la corriente GABAérgica en los *sniffers* (célula entera) usando una solución intracelular de gluconato de K^+ (anexo 1). En estas condiciones se aplicó GABA 10 mM por presión al tiempo que se variaba el potencial de mantenimiento en valores desde -90 hasta -40 mV.

F. Protocolo para evaluar la secreción de GABA mediante *sniffers*.

Se aplicó una suspensión de células HEK-GABA sobre una rodaja oblicua (**Figura 5 B**) en la cámara de registro. Brevemente, las células HEK plaqueadas fueron disociadas con 250 μ l de tripsina durante 5 minutos, y resuspendidas en DMEM + SFB 10%. La suspensión celular resultante fue centrifugada durante 5 min a 250 G. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 1 ml de solución extracelular carbogeneada a 34 °C. En la cámara de registro se detuvo la perfusión y se cargaron 300 μ l de suspensión celular encima de la rodaja de ME y se aguardaron 5 min para reanudar la perfusión. En estas condiciones las células HEK individualizadas se fueron depositando sobre la rodaja.

Se realizaron WCR simultáneos de una CSFcN con una solución intracelular de gluconato de K^+ y 10 mM de GABA; y una célula HEK con una solución interna de KCl. La concentración relativamente elevada de cloruro en la solución interna de KCl permitió registrar las corrientes GABAérgicas en los *sniffers* como corrientes entrantes. La inclusión de GABA en la solución interna de la CSFcN cumplió dos funciones críticas: prevenir falsos negativos por el lavado de GABA durante el registro y permitir la aplicación de GABA por presión directamente sobre el *sniffer* a modo de control al final del experimento.

Para registrar simultáneamente una CSFcN y un *sniffer* colocado junto a su PAp, primero se realizó el registro somático de la CSFcN en configuración de *cell-attached*. Luego, se procedió a registrar un *sniffer* y, manteniéndolo en configuración de *cell-attached*, se

desplazó cuidadosamente la célula en la punta de la pipeta hasta contactar directamente con el PAp de la CSFcN. Una vez asegurada la posición adecuada del *sniffer*, se aplicó presión negativa para transicionar a la configuración de WCR en ambas células. Se aplicó a la CSFcN un tren de estímulos: pulsos de voltaje despolarizantes, capaces de reclutar una respuesta activa. Simultáneamente se registró la célula HEK en fijación de voltaje a un potencial de membrana de -60 mV.

G. Obtención de registros de capacitancia de membrana en el proceso apical.

Se realizaron registros de célula entera del PAp. Esto es de por sí novedoso ya que no se ha reportado previamente en la literatura. Se evaluaron posibles cambios en la capacidad de membrana durante el reclutamiento de una corriente de Ca^{++} en las CSFcN mediante un protocolo que involucra la aplicación de una onda sinusoidal de voltaje (AC por *alternating current*) interrumpida por un pulso cuadrado despolarizante de voltaje (DC por *direct current*), en torno a un potencial de *holding* de -60 mV. Para esto utilizamos la rutina “DC + *sinewave*” del programa Patch Master, que calcula y grafica la CM en tiempo real durante el experimento. Brevemente, la CM se obtiene de la inyección de una onda sinusoidal de voltaje en fijación de voltaje, y la adquisición simultánea de la senoide de corriente resultante. A partir de las diferencias en amplitud y desplazamiento de fase de ambas sinusoides, se extrae el valor de la CM (Gillis, 1995).

Estos experimentos fueron realizados en presencia de bloqueantes de canales Na^+ y K^+ dependientes de voltaje en la solución de perfusión: TTX (0,4 μ M), TEA (3 mM). Además, se utilizó una solución intracelular de CICs, que contribuya al bloqueo de los canales de K^+ operados por voltaje.

VII. Estadística.

Para comparar la proporción de PAp VGAT+ en las distintas regiones de la ME realizamos pruebas estadísticas con Sigmaplot (Softonic). Comparamos la proporción de PAp VGAT+ en las distintas regiones mencionadas mediante un test de ANOVA (análisis de varianza) de dos vías utilizando como parámetros el nivel medular (cervical, torácico, lumbar, sacro) y región (dorsal o ventral). Nuestra muestra superó el test de normalidad de Shapiro-Wilk ($P = 0,248$). Para datos electrofisiológicos los test estadísticos realizados fueron tests de t para muestras pareadas, realizados con el software Sigmaplot. Utilizamos un nivel de significación estadística de $p < 0.05$. “N” representa el número de animales y “n” el número de experimentos individuales. Los valores de todas estas variables se especifican en cada pie de figura correspondiente.

RESULTADOS

I. Caracterización de la densidad de CSFcNs que expresan GFP en ratones GATA3.

En el presente trabajo se utilizaron animales transgénicos GATA3 que expresan GFP en las CSFcNs. Para comenzar con una caracterización de nuestro preparado experimental, realizamos una cuantificación de la densidad de PAp GFP+ en las regiones ventral y dorsal de hemimédulas procedentes de los niveles medulares cervical, torácico y lumbar (**figura 7**). El análisis estadístico realizado (ANOVA) no reveló diferencias significativas entre las regiones estudiadas.

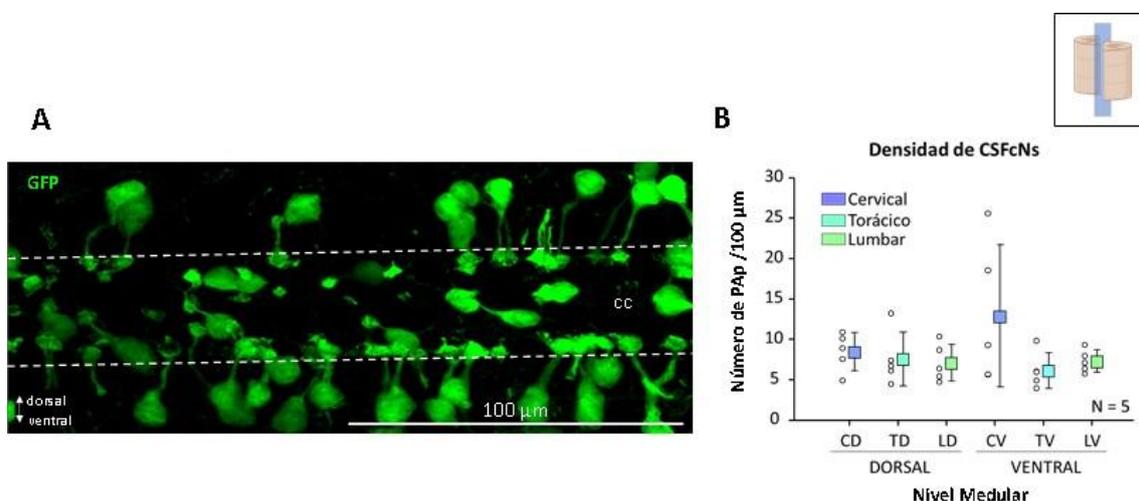


Figura 7. Densidad de PAp GFP+ en animales transgénicos GATA3. **A.** Proyección en Z de máxima intensidad de imágenes obtenidas por microscopía confocal de un preparado de hemimédula lumbar. En verde (GFP) las CSFcNs. Las líneas punteadas delimitan el canal medular central. **B.** Densidad de PAp contabilizados cada 100 μm lineales en las regiones ventral y dorsal (V, D) en los diferentes niveles medulares: cervical, torácico y lumbar (C, T, L). En esta figura los círculos vacíos representan el promedio contabilizado en cada animal y en cada región. Los símbolos cuadrados representan el promedio y las barras el desvío estándar. N = 5 animales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las regiones estudiadas (ANOVA).

II. Búsqueda de elementos ultraestructurales compatibles con la presencia de un aparato secretor en el proceso apical de las CSFcNs.

Para indagar respecto de la presencia de elementos ultraestructurales sugerentes de la existencia de un aparato secretor en los PAp, se obtuvieron imágenes de MET de dicho compartimento (**figura 8**). Para ello analizamos cortes ultrafinos de rodajas transversales de ME por MET. La presencia de un intrincado sistema de elementos vesiculares de apariencia aplanada en los PAp (**figura 8 C**) es compatible con la existencia de un sistema de secreción vesicular (Gray, 1969; Siksou et al., 2011).

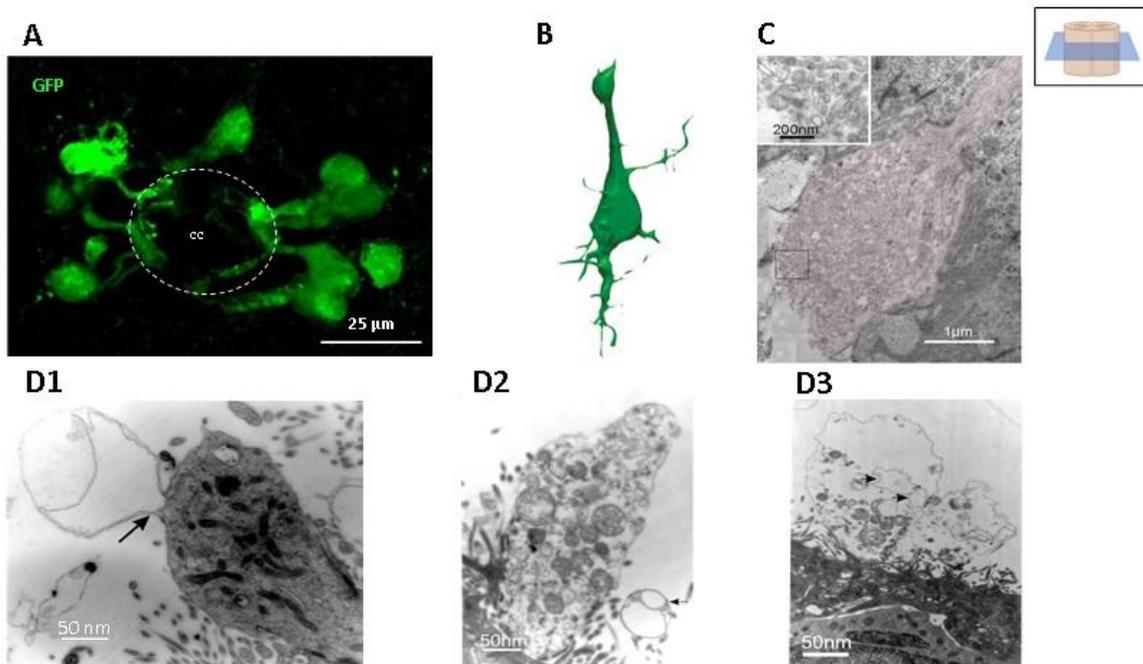


Figura 8. Ultraestructura del PAp. **A.** Proyección en Z de imágenes obtenidas por microscopía confocal de una rodaja transversal de ME. Las CSFcNs aparecen en verde (GFP). La línea blanca punteada delimita el CC. **B.** Reconstrucción tridimensional de una CSFcN donde se distingue el soma, el cono axonal y el PAp formado por una estructura en forma de “cuello” y una estructura en forma de bulbo que contacta el LCR. **C.** MET de un PAp típico fijado por perfusión intra cardíaca. El recuadro muestra la región encuadrada en negro a mayor aumento, donde puede observarse un sistema intrincado de túbulos y vesículas de aspecto aplanado. **D.** Ultraestructura de PAp obtenidos de rodajas transversales de ME lumbar incubadas en LCR artificial (control, **D1**) y LCR modificado para promover la excitotoxicidad dependiente de voltaje (alta concentración extracelular de K^+ : 62,4 mM, **D2** y **D3**). Las rodajas de tejido vivo fueron luego fijadas por inmersión en PFA al 4% + glutaraldehído al 2%, y preparadas para su observación por MET. Las flechas negras muestran las regiones que podrían corresponder a excrescencias de membrana.

En un intento de obtener evidencias ultraestructurales que reflejen los cambios dinámicos que ocurren en la membrana celular durante la secreción vesicular, realizamos el experimento cuyos resultados se ilustran en la **figura 8 D**. El mismo consistió en la disección de una ME *ex vivo* y la obtención de rodajas transversales que fueron incubadas en solución extracelular a 34°C durante 5 minutos (control, **figura 8 D1**) o bien en una solución modificada (alta concentración extracelular de K⁺: 62,4 mM, **figura 8 D1 y D2**). En estas condiciones ocurre una despolarización de las membranas celulares que se espera promueva la secreción vesicular. Luego del tratamiento se fijaron las rodajas por inmersión y se procedió a la obtención de preparados para observar mediante MET. Si bien se observaron algunas estructuras con apariencia de excresencias de membrana (indicadas en la **figura 8 D** con flechas negras), estas estructuras fueron halladas tanto en las rodajas tratadas como en condiciones control, por lo que es probable que esto sea consecuencia de la estrategia de fijado (el procedimiento habitual para la obtención de preparados para MET involucra la fijación intra-cardíaca de los tejidos). Así, las evidencias obtenidas mediante la realización de esta maniobra no permiten extraer conclusiones esclarecedoras, y lamentablemente no pudimos seguir con esta estrategia experimental porque el ME del IIBCE dejó de funcionar.

III. Búsqueda de receptores funcionales GABA_A en el proceso apical de las CSFcNs

Puesto que el PAp no recibe inervación sináptica, aquí hemos propuesto que el GABA secretado desde este compartimento podría volcarse al LCR. Sin embargo, para asignarle a este fenómeno un significado funcional, es necesario indagar respecto de las posibles dianas celulares para este mecanismo. Si bien se ha descrito la presencia de GABA_ARs en las CSFcNs del ratón, actualmente no hay trabajos publicados que aborden la distribución subcelular de los mismos. Este punto es clave, puesto que de demostrarse la secreción de GABA, la presencia de GABA_ARs en los PAp permitiría especular acerca de un mecanismo de señalización GABAérgica autócrina o parácrina.

A continuación, describiremos los principales resultados obtenidos a partir de experimentos preliminares que consideramos pertinentes para esclarecer este punto. Para explorar la expresión de receptores funcionales GABA_A localizados en el PAp de las CSFcNs desenjaulamos 1 mM DPNI-GABA, tanto en el PAp como así también en otros compartimientos neuronales y por fuera de la célula (**figura 9**).

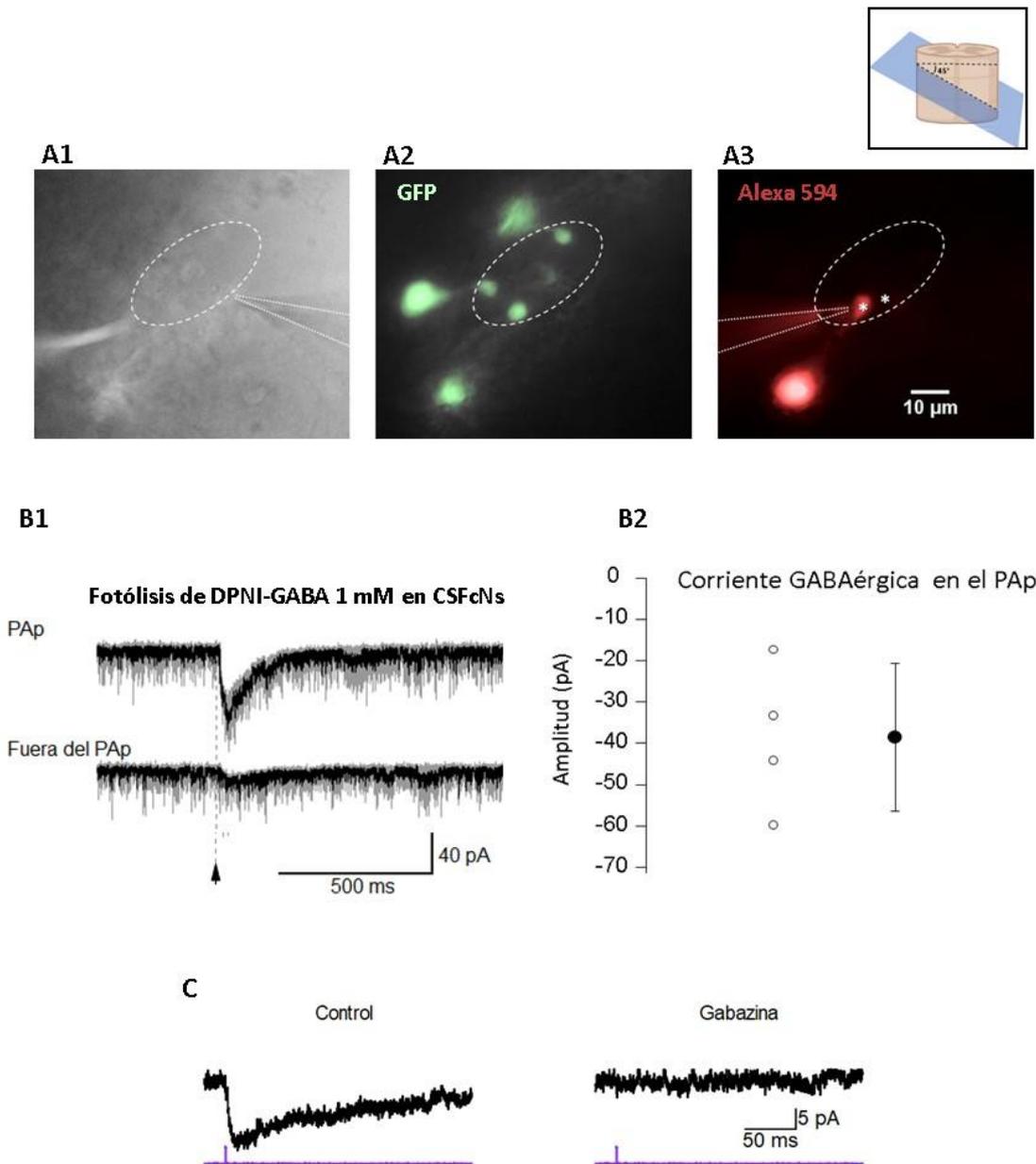


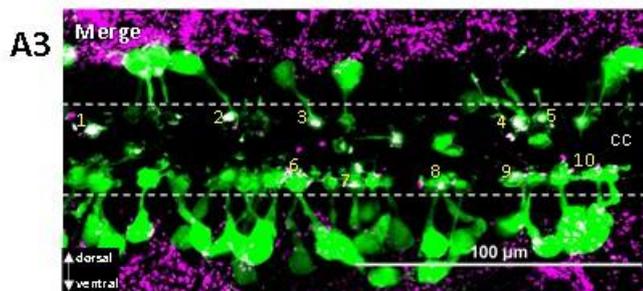
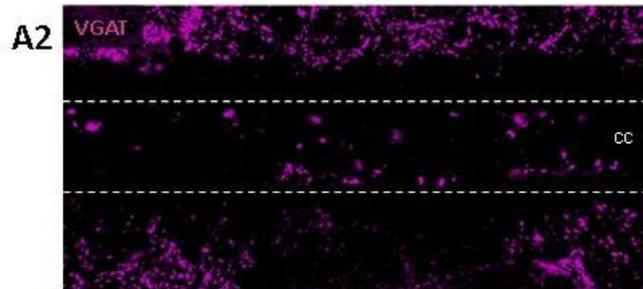
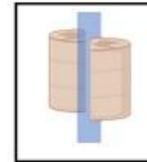
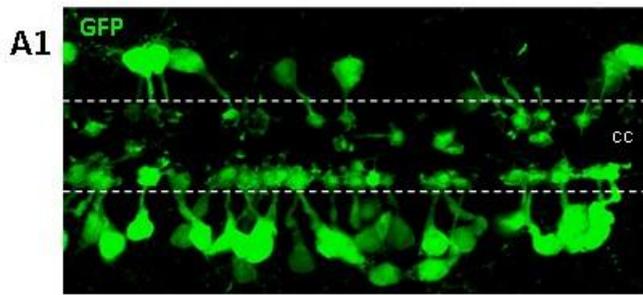
Figura 9. El PAP de las CSFcNs presenta receptores funcionales GABA-A. La figura muestra el desenjaulado de GABA a nivel del PAP de una CSFcN y a 4 μm del mismo. **A.** En rodajas oblicuas de ME se posicionó una pipeta para la aplicación por presión de DPNI-GABA (1 mM) (**A1**). Se identificaron las CSFcNs por fluorescencia (GFP, **A2**) y se realizó el registro en modalidad célula entera de una CSFcN con una pipeta rellena con una solución interna con Alexa 594 (**A3**). Se realizó la fotólisis de DPNI-GABA en 2 localizaciones diferentes: en el PAP y a 4 μm del mismo (**A3**, asteriscos). Las líneas punteadas delimitan el CC, así como las pipetas de registro y *puff*. **B1.** Registros de corriente de una célula representativa obtenidos cuando se desenjaula GABA en las localizaciones indicadas más arriba. La flecha indica el momento del desenjaulado. Los trazados de corriente en función del tiempo aparecen en gris, y el promedio de tres trazados consecutivos separados por un intervalo de 5 segundos se muestra en negro. **B2.** Amplitud de la corriente GABAérgica evocada por el desenjaulado de

GABA en el PAp. Los círculos blancos muestran la amplitud de la corriente GABAérgica (promedio en negro en B1) para células individuales (n = 4): el círculo negro representa el promedio y desvío estándar de dichos valores. Para estos experimentos se utilizaron 2 animales (N = 2) C. La corriente evocada por el desenjaulado de GABA en el PAp se bloquea en presencia de un bloqueante específico de los GABA_ARs, la gabazina (3 Mm).

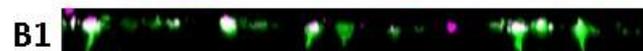
La **figura 9** muestra los resultados de estos experimentos. La parte A de la figura muestra la estructura de la neurona blanco, que aparece en rojo pues se llenó con Alexa 594. Las corrientes resultantes del desenjaulado de GABA en el PAp y a unas micras por fuera del mismo se muestran en **B1**, y los resultados de las 4 neuronas registradas en **B2**. Se registraron corrientes GABAérgicas en respuesta al desenjaulado de GABA en todos los PAp registrados (n = 4) (**figura 9 B**). En una de estas células se aplicó gabazina, bloqueante específico de GABA_ARs, para abolir la corriente mediada por desenjaulado de GABA en el PAp (**figura 9 C**). La fotólisis del compuesto enjaulado fuera del PAp no provocó corrientes GABAérgicas, demostrando la gran resolución espacial de esta técnica (**figura 9 B1**). Estos resultados experimentales permiten concluir que los PAp de las CSFcNs poseen receptores ionotrópicos funcionales para el GABA.

IV. Búsqueda de marcadores moleculares de secreción vesicular en el proceso apical de las CSFcNs.

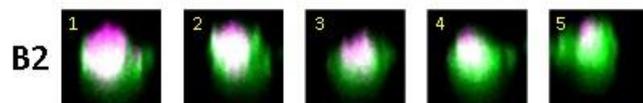
Una de las evidencias que podrían sugerir la liberación de GABA desde los PAp sería la presencia de la maquinaria molecular responsable de la liberación. Realizamos ensayos de IHQ para detectar varias proteínas que se consideran clásicamente como “sinápticas”. Una de las proteínas que buscamos fue el VGAT (transportador vesicular de GABA). Dicho transportador se encuentra presente en la membrana de vesículas sinápticas en las terminales GABAérgicas y es responsable del llenado vesicular (Blakely & Edwards, 2012; McIntire et al., 1997). Puesto que los ratones GATA3 expresan GFP en las CSFcNs, buscamos la coexistencia de la señal fluorescente verde (GFP) y la señal fluorescente VGAT (Alexa 647) en estos ensayos. Utilizamos el preparado de hemimédula para visualizar un plano transversal del canal medular, lo cual facilitó el conteo de PAp en sentido longitudinal. Un ejemplo de uno de estos experimentos se muestra en la **figura 10**. En la misma se muestra una imagen de microscopía confocal de un preparado de hemimédula donde se realizó una IHQ contra VGAT (**figura 10 A**). Se evaluó la coexistencia de la señal GFP y VGAT en los PAp y se cuantificó la proporción de PAp VGAT+ (es decir, PAp que muestran inmunoreactividad contra la proteína VGAT) en las regiones dorsal y ventral en los niveles cervical, torácico y lumbar de la ME (**figura 10 D**).



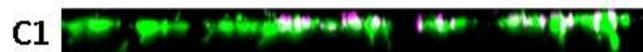
Proyecciones en Z de máxima intensidad



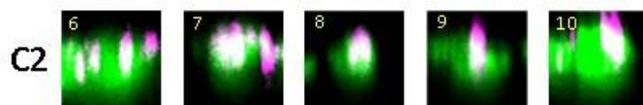
Proyección ortogonal



Imágenes de sección única en XY



Proyección ortogonal



Imágenes de sección única en XY

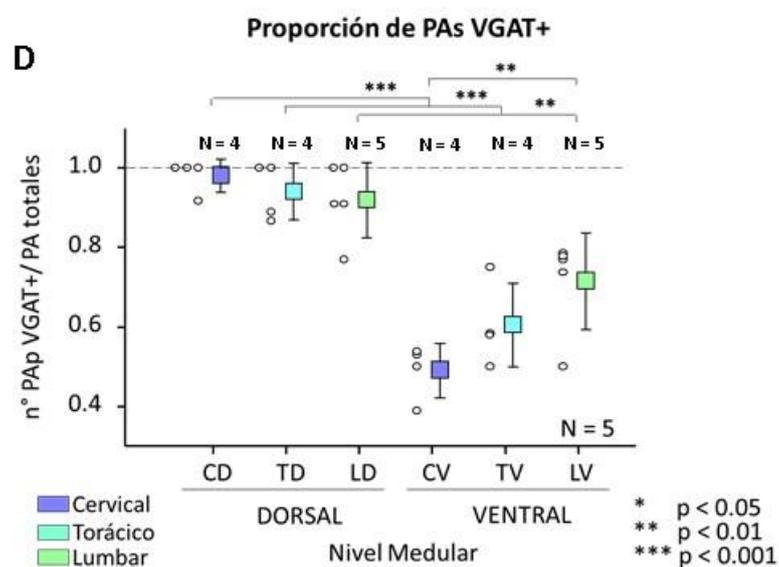


Figura 10. Detección de VGAT en los PAp de las CSFcNs. **A.** Proyecciones en Z de máxima intensidad de una imagen representativa de un experimento de IHQ contra VGAT en la ME torácica. La línea punteada marca los límites del CC. Las CSFcNs aparecen en verde (GFP; **A1**), el VGAT en magenta (**A2**), y la combinación de ambas señales en blanco (**A3**). **B.** PAp dorsales. **C.** PAp ventrales. **B1** y **C1** muestran las proyecciones en el plano ortogonal en la región de los PAp donde se puede apreciar la coincidencia de las señales de interés. **B2** y **C2** muestran imágenes en un único plano XY de los PAp numerados en amarillo en **A3**. **D.** Proporción de PAp VGAT+ respecto de los PAp totales para las regiones ventral (V) y dorsal (D) en los niveles cervical (C), torácico (T) y lumbar (L) de la ME. En esta figura los círculos vacíos representan el promedio contabilizado en cada animal y en cada región. Los símbolos cuadrados representan el promedio y las barras el desvío estándar. N = 5 animales. Se aplicó un test estadístico ANOVA. La significancia estadística se representa con asteriscos.

Encontramos que la correlación entre ambas señales fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en 14 de las 15 regiones analizadas, razón por la cual se procedió al conteo manual de los PAp VGAT+.

Nuestros resultados indican que existe una mayor proporción de PAp VGAT+ en la población dorsal de CSFcNs en comparación con la población de neuronas ventrales, a todos los niveles medulares. Además de constituir un resultado *per se*, esta cuantificación nos permitió orientarnos en los experimentos que serán presentados más adelante, donde buscamos evidencias electrofisiológicas de secreción de GABA. Asimismo, habitualmente notamos regiones puntuales donde coexisten las señales de VGAT y GFP a nivel del soma de las CSFcNs (anexo). Puesto que se han descrito proyecciones de CSFcNs sobre otras CSFcNs en regiones medulares más rostrales (Nakamura et al., 2023), especulamos que estos corresponden a contactos axo-somáticos GABAérgicos.

Para ampliar el conjunto de evidencias moleculares sugestivas de secreción vesicular de GABA se realizaron ensayos de IHQ contra otros sustratos moleculares del aparato secretor, las sinaptotagminas (syt) y la sintaxina 4 (Südhof & Rizo, 2011). Las Syt constituyen los sensores de Ca^{++} que participan del proceso de fusión vesicular en respuesta al incremento de la concentración intracelular del ion y participan de la secreción vesicular en compartimentos neuronales secretores típicos, como el axón. Así, realizamos ensayos de IHQ contra las isoformas 1 (N = 2) y 2 (N = 5) de la Syt, presentes en las vesículas sinápticas axonales (Dean et al., 2012) (**figura 11 B y C**).

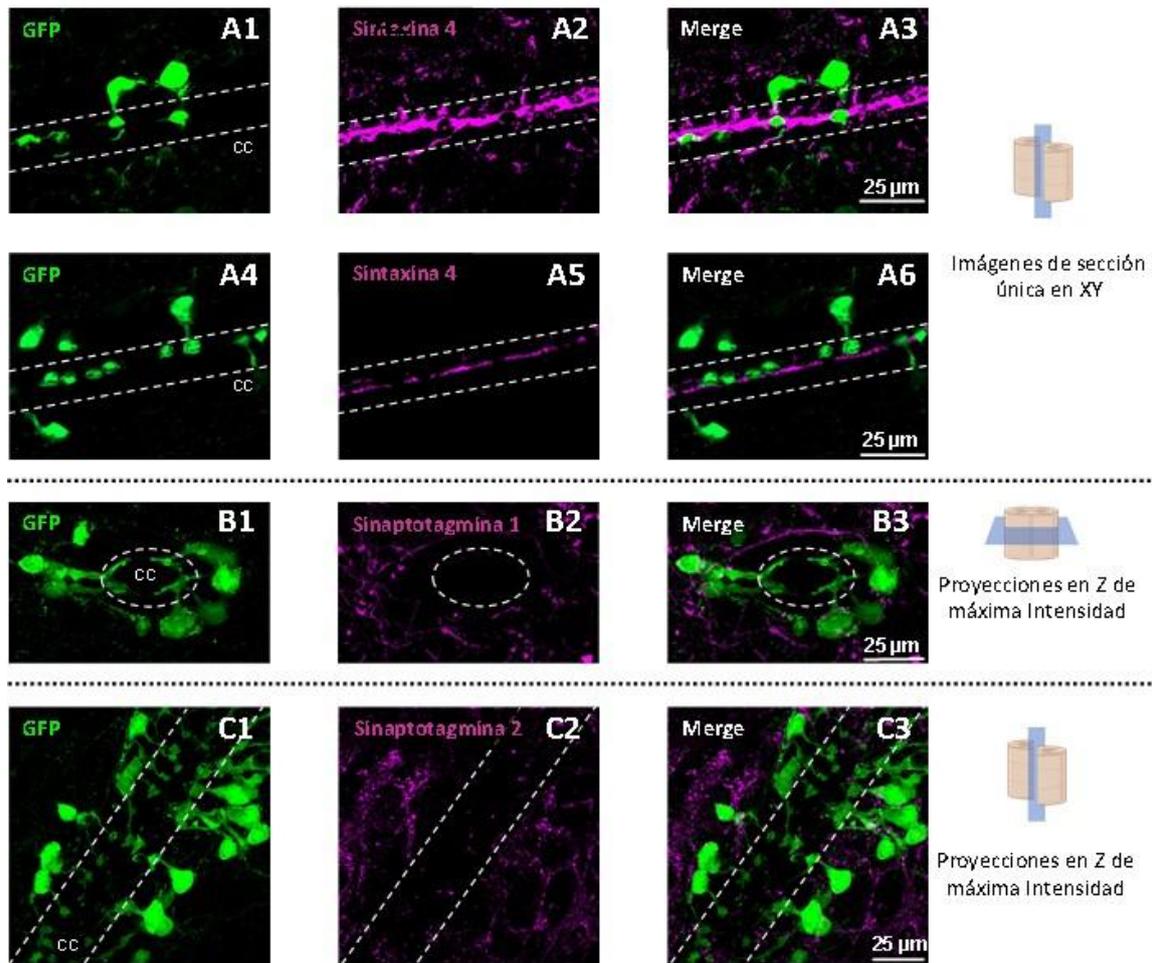


Figura 11. Búsqueda de marcadores moleculares de secreción vesicular. **A.** Imágenes de plano único XY de microscopía confocal. Las líneas punteadas delimitan el CC. Las CSFcNs aparecen en verde (GFP). **A2, A5.** IHQ contra sintaxina 4 en hemimédula. **A1, A4.** CSFcNs. **A3, A6.** Merge. **B.** Proyección en Z de máxima intensidad. IHQ contra Syt 1 (**B2**) en rodaja transversal. **B1.** CSFcNs. **B3.** Merge. **C.** Proyección en Z de máxima intensidad. IHQ contra Syt 2 (**C2**) en hemimédula. **C1.** CSFcNs. **C3.** Merge.

Además, puesto que el PAP es un compartimento dendrítico atípico, hemos explorado la presencia de una molécula que ha sido descrita como una isoforma presente en sinapsis dendro-dendríticas (Kennedy et al., 2010): la sintaxina 4. La **figura 11 A** muestra los experimentos de IHQ contra la isoforma 4 de la sintaxina (N = 3).

Ninguno de estos ensayos reveló la presencia de las proteínas buscadas en los PAP de las CSFcNs. Cabe destacar que la ME constituye en sí misma un control positivo para las técnicas ensayadas ya que en regiones medulares en torno a las CSFcNs aparece una señal puntillada compatible con el marcaje de terminales sinápticas. Curiosamente,

sintaxina 4 presenta un patrón de marcaje robusto tapizando las paredes del canal CC, y excluyendo a los PAp, lo que indica fuertemente que se expresa en los endodimocitos. Desconocemos hasta el momento el significado funcional de dicho hallazgo.

V. Caracterización de corrientes de calcio operadas por voltaje en las CSFcNs.

Las conductancias de Ca^{++} de alto umbral de activación median la exocitosis vesicular dependiente de voltaje en botones presinápticos. Si bien en la mayoría de las sinapsis esta función está mediada por conductancias del tipo Ca_v2 , como $\text{Ca}_v2.1$ (de tipo P/Q) y $\text{Ca}_v2.2$ (de tipo N), las conductancias de tipo L (como $\text{Ca}_v1.3$ y $\text{Ca}_v1.4$) parecen tener una particular importancia en sinapsis atípicas como la presinapsis de células ciliadas internas del sistema auditivo (Baig et al., 2011; Dolphin, 2021; Platzer et al., 2000). En el ratón, las CSFcNs presentan prominentes corrientes de Ca^{++} dependientes de voltaje, que podrían jugar un rol clave en la exocitosis vesicular (Johnson et al., 2023).

En este trabajo hemos registrado corrientes de Ca^{++} en las CSFcNs del ratón, discriminando dos componentes (**figuras 12 A3**) de distinto umbral de activación, de-inactivación y susceptibilidad al bloqueo por fármacos específicos. Realizamos registros de célula entera de CSFcNs en presencia de bloqueantes en el baño: TTX (0,4 μM), TEA (4mM) y 4-AP (2 mM) de modo de bloquear otras conductancias operadas por voltaje, más particularmente las conductancias activas de Na^+ y K^+ . Se aplicó una familia de pulsos despolarizantes de voltaje partiendo de un potencial de mantenimiento de -90 mV o -60 mV y se registraron las corrientes transmembrana resultantes (**figuras 12 A1 y A2**, respectivamente). Este procedimiento se realizó, además, en presencia y ausencia de un bloqueante específico de las ICaT (mediadas por conductancias Ca_v3): 5 μM TTAP2.

Se puso en evidencia la existencia de un componente de bajo umbral de activación, que presenta inactivación a valores cercanos al potencial de reposo (i.e. -60 mV) (**figura 12 A2**), y de-inactivación a potenciales hiperpolarizados (i.e. -90 mV) (**figura 12 A1**), y es bloqueada por TTAP2 (**figura 12 B1**). El curso temporal de esta corriente se muestra en la **figura 12 B2**, que consiste en la sustracción entre trazados de corriente aplicados desde un potencial de -90 mV en condiciones control y en presencia de TTAP2. Por otra parte, se evidenció un componente de alto umbral de activación, que no se encuentra inactivada -60mV (**figura 12 A2**) y es insensible a TTAP2 (**figura 12 B1**). El curso temporal de esta corriente se muestra en la **figuras 12 A2 y B1**.

En suma, nuestros hallazgos son compatibles con la existencia de dos componentes de ICa (**figura 12 B3**): una ICa de alto umbral y una ICaT (**figura 12 A3**).

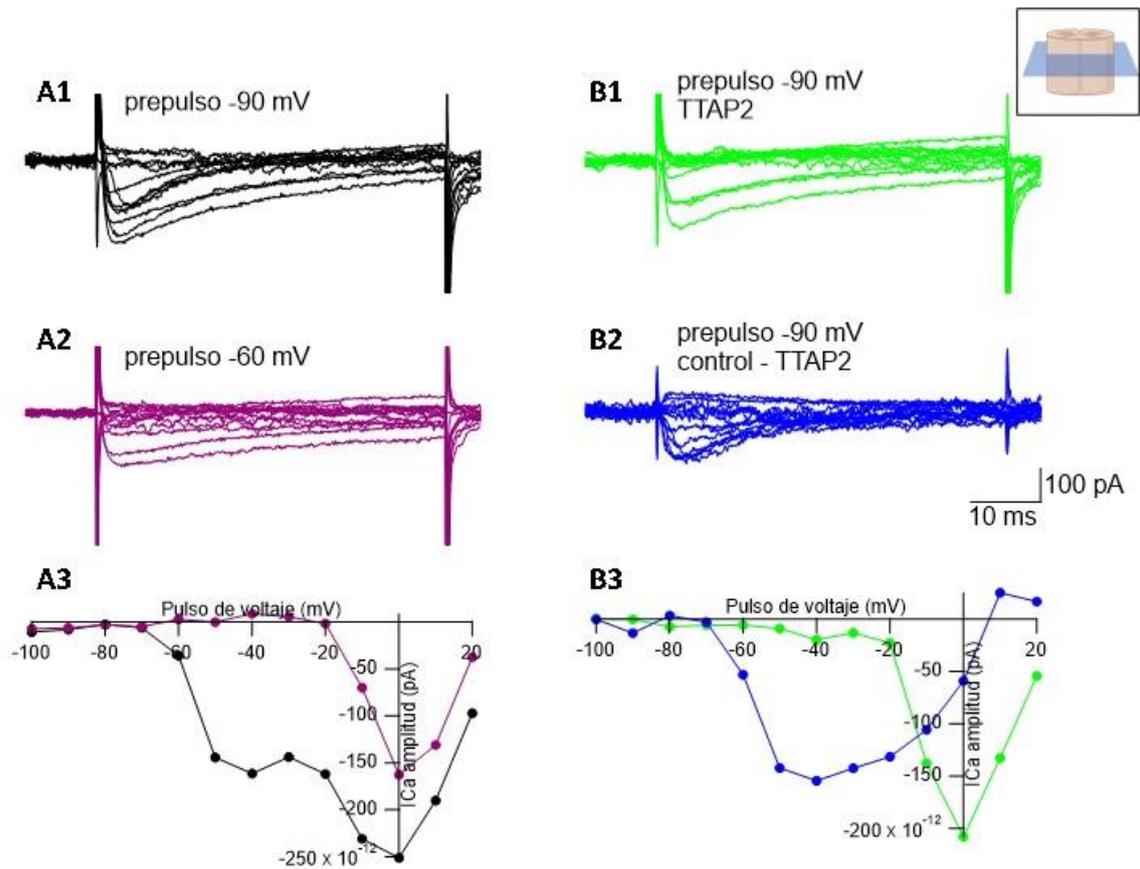


Figura 12. Las CSFCNs presentan corrientes de calcio de alto umbral, así como corrientes de calcio de tipo T. La figura muestra registros de corrientes de calcio (I_{Ca}) (**A1**, **A2**, **B1**, **B2**) de una CSFCN en presencia de los siguientes bloqueantes aplicados en el baño: TTX $0,4 \mu\text{M}$; TEA 4mM ; 4-AP 2mM . En fijación del voltaje se aplicó un prepulso de -60mV (**A2**) o -90mV (**A1**, **B1**) seguido por una familia de pulsos despolarizantes desde -100 a 20mV . **B1**. En presencia de TTAP2 $5 \mu\text{M}$, bloqueador específico de I_{CaT} . **B2**. Sustracción *offline* de los trazados en B1 a los trazados en A1. **A3**. Relación I/V de las corrientes en A1 y A2. **B3**. Relación I/V de las corrientes en B1 y B2.

VI. Búsqueda de evidencias funcionales directas de la secreción de GABA desde el PAp.

A. Utilización de *sniffers* para poner en evidencia la secreción de GABA.

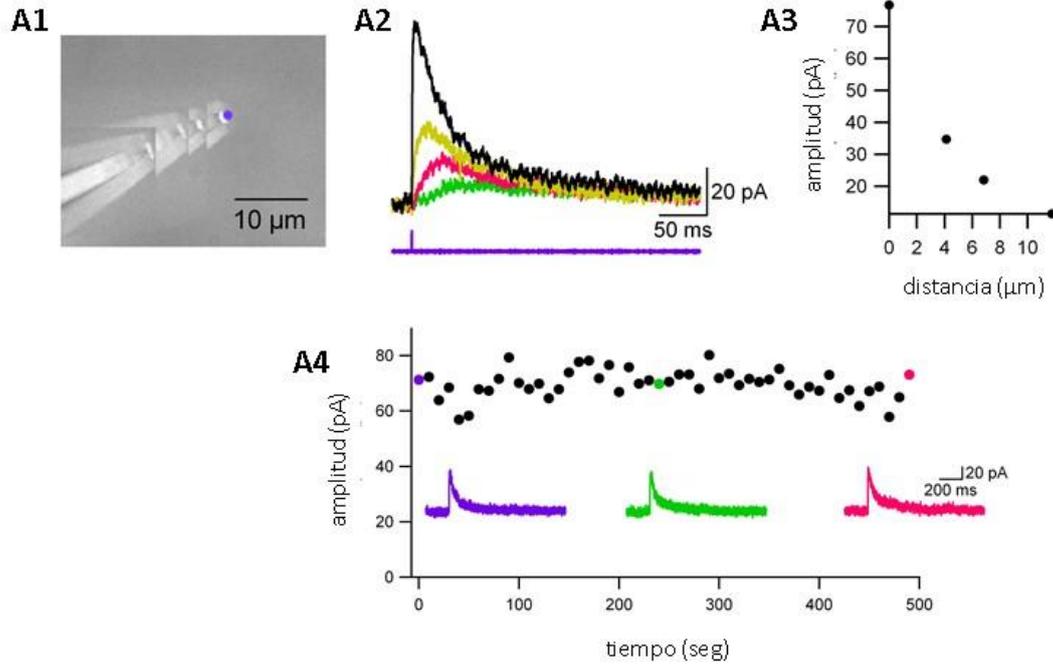
Obtener evidencias moleculares de la existencia de un aparato secretor de GABA en el PAp de las CSFcNs no es suficiente para demostrar el rol de dicho compartimento en la secreción de GABA. Para obtener evidencias funcionales directas de la secreción de GABA desde el PAp se requiere de la constatación de dicho fenómeno mediante un abordaje electrofisiológico. El abordaje clásico para demostrar la liberación de un neurotransmisor involucra la estimulación eléctrica de la célula presináptica, y el registro de corrientes evocadas en la célula postsináptica. Este procedimiento combinado con técnicas farmacológicas como la utilización de bloqueantes específicos, permite caracterizar el neurotransmisor secretado.

En el caso del PAp, sin embargo, no existe una estructura postsináptica evidente. Por el contrario, el PAp se encuentra en contacto con el LCR y presumimos que el contenido excitado podría volcarse al LCR como parte de un mecanismo neuroendócrino. Con el fin de obtener evidencias directas de la secreción de GABA desde los PAp, y dada la ausencia de una contraparte postsináptica, optamos por emplear *sniffers*. Esta técnica consiste en la utilización de células que expresen receptores específicos para el neurotransmisor que se desee detectar en el medio extracelular, creando de alguna manera la contraparte postsináptica de forma artificial. Mediante registros intracelulares de estas células enteras o parches de la membrana de las mismas, se puede verificar la liberación de la sustancia de interés en una región particular del preparado que se desee explorar. Aquí, hemos cultivado células HEK-GABA con el fin de utilizarlas como *sniffers* de GABA (Christensen et al., 2014).

Las células HEK-GABA fueron posicionadas en proximidad al compartimento de interés y registradas con una solución intracelular con alto cloruro (para aumentar la fuerza electromotriz a través de los GABA_AR) mientras se aplicaba un tren de pulsos despolarizantes en las CSFcNs. Mediante este abordaje experimental, la secreción de GABA desde un PAp en respuesta a despolarización debería ponerse en evidencia como una corriente GABAérgica entrante en el *sniffer*.

Para ensayar las técnicas de *patch* en *sniffers*, se colocó un cubreobjetos con una monocapa de células HEK-GABA dentro de la cámara de registro. En nuestros preparados la adhesión intercelular fue más fuerte que la adhesión al sustrato, por lo que al retirar la pipeta desde la configuración de WCR para obtener un registro con la modalidad de "outside-out" ocurrió frecuentemente el levantamiento de la monocapa celular completa.

Registro *outside-out* y fotólisis de DPNI-GABA 1 mM



**Registro de célula entera.
Puff de GABA 10 mM**

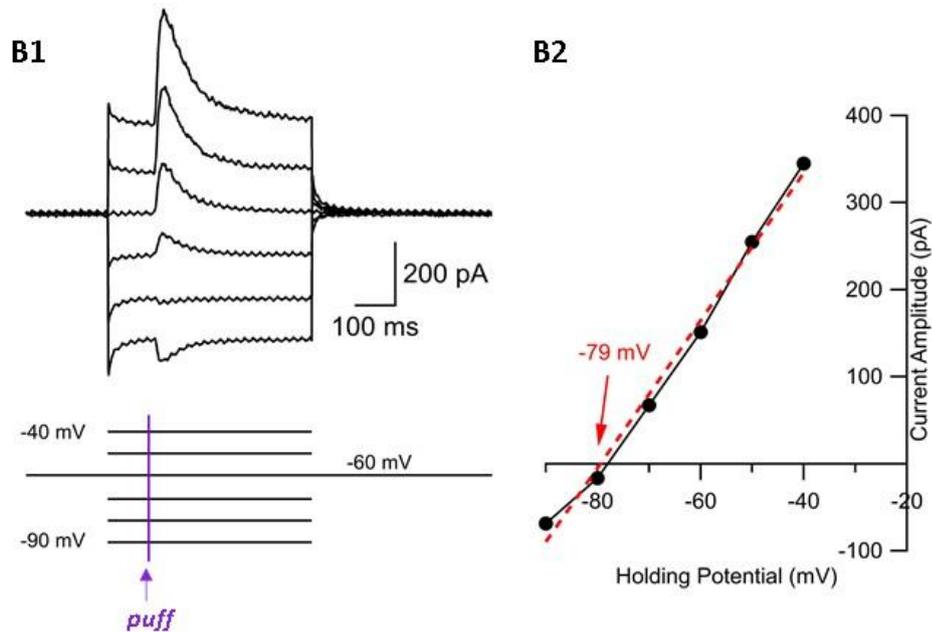


Figura 13. Registro de corriente GABAérgica en células HEK-GABA. A. Desenjaulado de DPNI-GABA 1 mM en parche de membrana (*outside-out*) de un *sniffer* de GABA registrado por clampeo de voltaje a un potencial de mantenimiento de -60mV. **A1.** Imagen de microscopía óptica de luz transmitida de un registro *outside-out*. El punto violeta representa el área de desenjaulado, que corresponde a la localización del *spot* láser (pulsos de 500 μ s). Se colocó la pipeta a distancias variables de la región de desenjaulado.

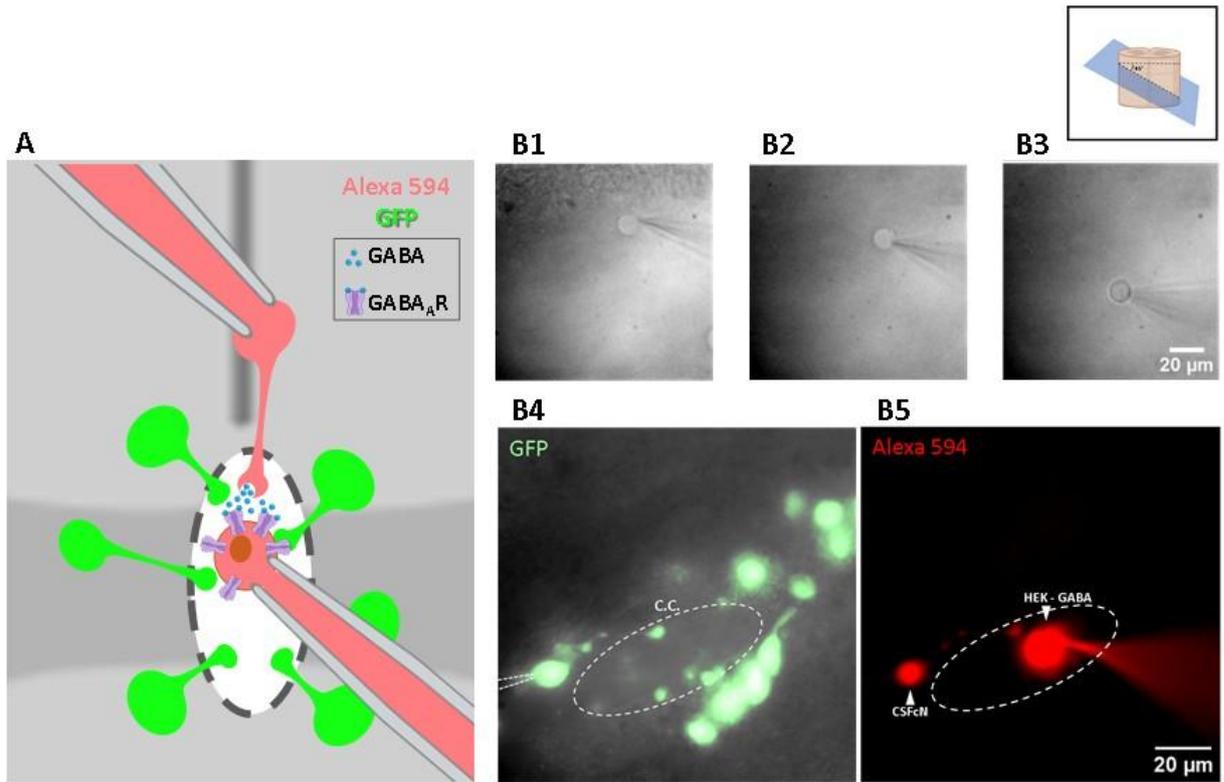
A2. Registro de corrientes GABAérgicas resultantes del protocolo ilustrado en A1 con una solución intracelular de KCl. **A3.** Amplitud de la corriente evocada por el desenjaulado versus la distancia a la región del mismo. **A4.** Amplitud de la corriente GABAérgica provocada por desenjaulados (puntos negros) en función del tiempo. Abajo, trazados de corriente para tres puntos representativos. **B.** *Puff* de GABA 10 mM y registro de corriente (WCR) de un *sniffer* de GABA. **B1.** Trazados de corriente resultantes de la aplicación de un *puff* de 10 mM GABA a distintos potenciales de *holding* en una neurona registrada con una solución intracelular de gluconato de potasio. El *puff* de GABA se indica con la línea vertical violeta. **B2.** Curva I/V de la corriente GABAérgica y su ajuste con una recta (línea roja punteada). La flecha roja señala el potencial de reversión de la corriente.

Sin embargo, en algunos casos fue posible obtener un registro de un parche de membrana en la configuración “*outside-out*”, como se muestra en la **figura 13 A**.

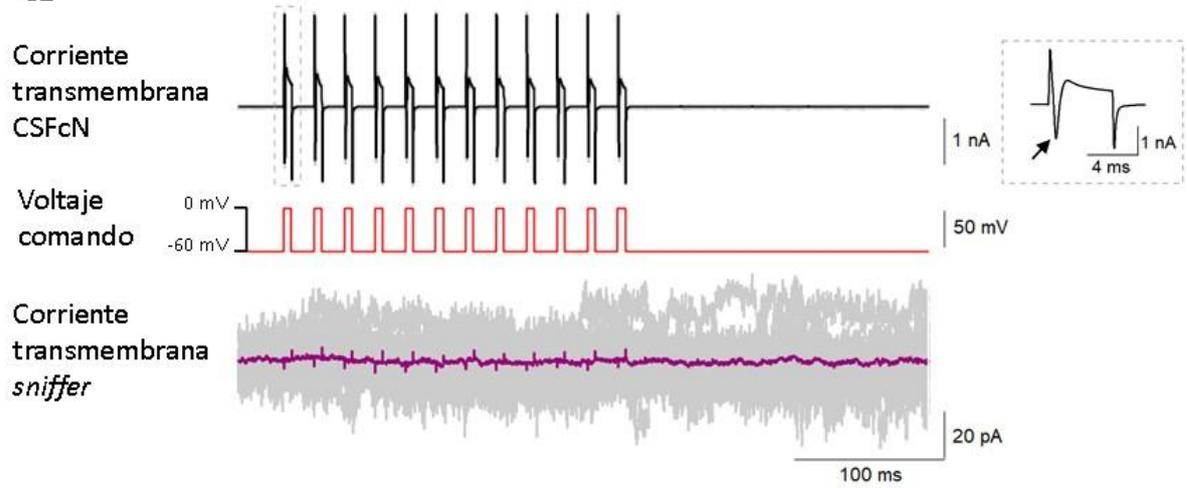
En dicha configuración se verificó la presencia de GABA_AR funcionales en la membrana celular de los *sniffers* mediante desenjaulado de GABA a partir del DPNI-GABA (1 mM) a distancias variables del parche de membrana (*outside-out*) (**figura 13 A1 a A3**). Constatamos que la magnitud de la respuesta a GABA disminuye rápidamente en función de la distancia del parche de membrana al foco de desenjaulado (**figura 13 A3**). Esto implica que para detectar la secreción de GABA desde los PAp utilizando *sniffers*, ambas estructuras deben posicionarse muy cercanas entre sí, y de ser posible en aposición directa. Asimismo, en la modalidad *outside-out* se realizaron desenjaulados sucesivos a lo largo del tiempo, poniendo en evidencia que la amplitud de la corriente GABAérgica registrada es sumamente estable (**figura 13 A4**).

Para obtener registros de *sniffers* de célula entera se preparó una suspensión de células individualizadas en LCR artificial que fue cargada en la cámara de registro. Mediante el registro de célula entera de un *sniffer* en fijación de voltaje aplicamos un *puff* de 10 mM GABA a distintos potenciales de mantenimiento (**figura 13 B**). A través de esta maniobra se puso en evidencia que, como cabía esperar, la corriente GABAérgica en los *sniffers* no presenta voltaje – dependencia (puesto que la curva I/V es lineal) y presenta un potencial de reversión de -79 mV que corresponde al potencial de reversión del ion Cl⁻ (considerando que se utilizó una solución intracelular de gluconato de K⁺) (**figura 13 B2**).

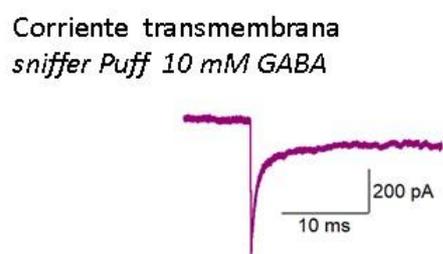
Para evaluar la secreción de GABA desde los PAp se cargó una suspensión de células HEK-GABA en la cámara de registro, bañando un preparado de ME previamente colocado dentro de la misma. De este modo se obtuvieron células HEK-GABA individualizadas en la vecindad de las CSFcNs. Luego de registrar una CSFcN, se registró un *sniffer* que fue desplazado en *cell-attached* hasta posicionarse junto al PAp correspondiente para luego entrar en WCR (**figura 14 A, B**).



C1



C2



D

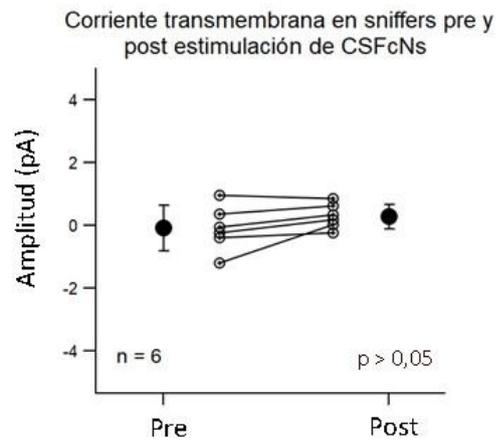


Figura 14. Ausencia de evidencia de secreción de GABA desde el PAp utilizando *sniffers*. A. Representación esquemática de la utilización de *sniffers* para verificar la secreción vesicular de GABA desde el PAp. **B1 a B3.** Fotografía en luz transmitida de la célula HEK durante el registro en fijación de voltaje. La célula HEK registrada se movió lentamente hasta colocarla en su posición final, junto al PAp de la CSFcN registrada. **B4.** Fotografía en luz transmitida y fluorescencia que muestra la CSFcN registrada (modo *cell-attached*) junto a otras CSFcN vecinas. **B5.** Fotografía de fluorescencia de ambas células registradas, la CSFcN y la célula HEK, durante el registro en modo célula entera. Ambas pipetas contenían Alexa 594 y por eso las células aparecen en rojo. **C1.** El trazo superior negro muestra la corriente registrada en la CSFcN producto de la estimulación con el protocolo que se muestra en el trazo medio (rojo). Se aplicaron 12 despolarizaciones desde -60 a 0 mV durante 5 ms, a una frecuencia de 50 Hz. El trazo inferior violeta muestra la corriente registrada simultáneamente en la célula HEK (trazos individuales en gris y promedio en lila). El inserto muestra la corriente registrada en la CSFcN producto del primer pulso de voltaje. Se aprecia la espiga de Na⁺ no clampeada (flecha negra). Se observa claramente que el protocolo de estimulación de la CSFcN no genera ninguna corriente en la célula HEK. **C2.** Corriente registrada en el *sniffer* ante el *puff* de 10 mM de GABA mediante un picospritzer. Se observa una corriente entrante, lo que demuestra la sensibilidad del *sniffer* al GABA. **D.** La corriente transmembrana en los *sniffers* antes y después del primer estímulo del tren aplicado a las CSFcNs. Los círculos blancos muestran el promedio de la corriente transmembrana para cada célula individual, y a la derecha en negro se muestra el promedio y desvío estándar de dichos valores. El test de t para muestras pareadas no reveló diferencias significativas entre ambas poblaciones de datos ($p = 0.09$).

Para optimizar el acceso de los *sniffers* a los PAp en el CC, utilizamos rodajas oblicuas de ME, en lugar de las rodajas transversales tradicionalmente utilizadas (**figura 5**).

En las rodajas transversales el diámetro del CC resulta demasiado pequeño para permitir el acceso de las células HEK-GABA, en tanto que en la hemimédula la acumulación de detritos celulares (probablemente debido a la tracción mecánica que se realiza durante la obtención del preparado) impide el establecimiento del contacto estrecho entre las estructuras de interés.

Puesto que nuestros ensayos de IHQ revelaron una mayor proporción de PAp VGAT⁺ en la región dorsal respecto de la ventral, orientamos la búsqueda de secreción de GABA con *sniffers* a los PAp posicionados dorsalmente en nuestras rodajas.

Una vez logradas estas condiciones “ideales”, registramos simultáneamente una CSFcN y una célula HEK-GABA que colocamos junto al PAp de la primera, como se muestra en la **figura 14 A, B**. Aplicamos un tren de pulsos cuadrados de voltaje despolarizantes

(**figura 14 C1**) en la CSFcN, que fueron capaces de inducir espigas no clampeadas en la CSFcN (**figura 14 C1**). En ningún caso registramos una corriente GABAérgica en los *sniffers* utilizados en estas condiciones (**figura 14 D**). En consecuencia, concluimos que esta técnica no arrojó resultados compatibles con la secreción vesicular de GABA desde los PAp de las CSFcNs.

B. Medidas de la capacidad de membrana en el proceso apical durante la estimulación de CSFcNs.

A pesar de no haber encontrado evidencias de la secreción de GABA usando *sniffers*, esto no excluye la posibilidad de la liberación de otros contenidos vesiculares. Para averiguarlo, hemos obtenido medidas de la capacidad de membrana. Cuando ocurre la liberación vesicular en las sinapsis químicas, la superficie de membrana de la terminal presináptica se incrementa, generando un aumento transitorio de la capacidad de membrana. Para evaluar esta alternativa realizamos registros directamente desde el PAp en fijación de voltaje, en presencia de bloqueadores de canales de Na⁺ y K⁺. En fijación de voltaje se aplicó una sinusoide de voltaje interrumpida por un pulso cuadrado despolarizante (DC) que resultó en el reclutamiento de una corriente de Ca⁺⁺ operada por voltaje (**Figura 15 A**).

Obtuvimos registros de CM para 6 neuronas y los promediamos para evaluar posibles cambios en CM como consecuencia del pulso DC. Estos valores individuales así como el promedio y desvío de los mismos para las condiciones pre y post pulso DC se grafican en la **figura 15 B**. Queda de manifiesto que en estos 6 PAp no se observó aumento de la capacidad de membrana como consecuencia de la aplicación de pulsos despolarizantes, lo que nos permite concluir que nuestro protocolo no es eficaz en inducir la fusión vesicular.

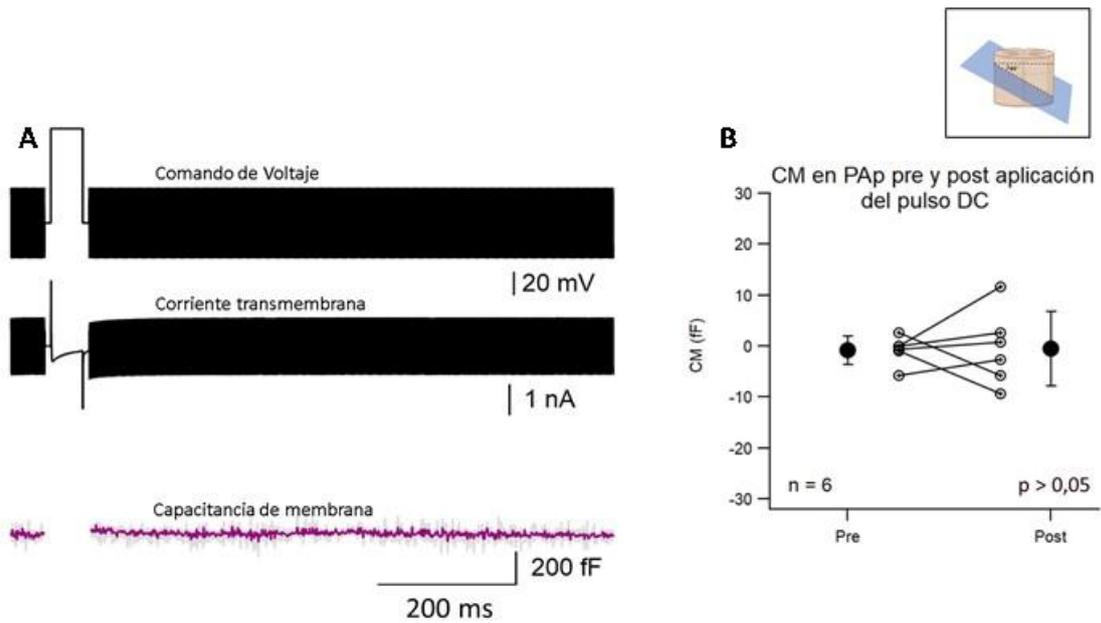


Figura 15. La CM en el PAp no se modifica cuando se induce una corriente de calcio por despolarización. **A.** Trazo superior: el comando de voltaje aplicado consiste en una onda sinusoidal de 30 mV de amplitud total (potencial de membrana $-80 \text{ mV} \pm 15 \text{ mV}$) y 1 kHz de frecuencia, interrumpida por un pulso cuadrado despolarizante de 80 mV de amplitud (llegando a un potencial de 0 mV) y 50 ms de duración. Trazo medio y trazo inferior: corriente y capacidad de membrana del PAp, respectivamente. **B.** CM promedio de cada célula individual (círculos) y promedio y desvío estándar de dichos datos (*box* negro) para las condiciones pre y post DC. El test de t para muestras pareadas no reveló diferencias significativas entre ambas poblaciones de datos ($p = 0.91$).

DISCUSIÓN

Las CSFcNs son células evolutivamente conservadas, que se han evidenciado en todas las especies de vertebrados estudiadas hasta el momento. Poseen un soma en una posición subependimal y proyectan un proceso dendrítico, el PAp, en dirección al CC de la ME, el cual está inmerso en el LCR. Dado que nuestro interés científico está centrado en entender la fisiología de neuronas individuales y de sus compartimientos, en este trabajo hemos indagado respecto del rol funcional del PAp en tanto compartimento subcelular. Puesto que el PAp es un compartimento relativamente grande (unas 2 a 3 μm de diámetro) y accesible, consideramos que su estudio mediante técnicas relativamente clásicas podía ser enriquecedor en el marco de este trabajo de maestría en particular y en el marco del interés más general del laboratorio, que busca entender la función de las CSFcNs.

Específicamente, en este trabajo planteamos como hipótesis que el PAp de las CSFcNs es un compartimento secretor vesicular. Esta surge de los siguientes 2 elementos: por un lado, trabajos preliminares de MET del Dr. Trujillo-Cenoz, que muestran evidencias ultraestructurales compatibles con mecanismos de secreción desde el PAp; por otro lado, que esta posibilidad ya había sido evocada insistentemente en la literatura (Djenoune & Wyart, 2017). Puesto que las CSFcNs son células GABAérgicas, exploramos en particular la posibilidad de que el PAp libere GABA hacia el LCR.

Dado que el PAp es una especialización dendrítica, de confirmarse nuestra hipótesis se estaría poniendo de manifiesto un fenómeno que ya se ha descrito innumerables veces en la literatura: la liberación dendrítica de un NT (Shepherd, 2009). La liberación del NT por parte de las dendritas es un mecanismo de control retrógrado por el cual la neurona postsináptica controla la actividad de la neurona presináptica, y es de importancia clave en mecanismos de plasticidad sináptica (Kennedy & Ehlers, 2011). Dado que en nuestro modelo el compartimento presináptico no existe como tal, planteamos la posibilidad de que la liberación de GABA por parte del PAp pudiese jugar un rol en el control de PAp vecinos (control parácrino) e incluso en el control del PAp que libera el GABA (control autócrino).

Para abordar desde el punto de vista experimental la hipótesis planteada en el párrafo anterior, durante esta tesis utilizamos técnicas histológicas, moleculares y electrofisiológicas. Mencionaremos a continuación los resultados experimentales más relevantes dividiéndolos en dos categorías arbitrarias: a) los resultados compatibles con nuestra hipótesis inicial; b) los resultados que no son compatibles con la misma. Posteriormente, pondremos en perspectiva las dos categorías de resultados y plantearemos experimentos que, consideramos, aún quedan por realizar para descartar completamente nuestra hipótesis inicial.

A. Resultados compatibles con la secreción vesicular (en particular de GABA).

Los resultados ultraestructurales obtenidos mediante MET, que muestran un prominente sistema de vesículas y túbulos en el PAp, son compatibles con la presencia de un aparato secretor desde dicho compartimento (**figura 8**). La presencia de estructuras sinápticas ha sido confirmada por un trabajo reciente, donde los autores también realizaron cortes seriados de MET del PAp (Nakamura et al., 2023). A pesar de que nos propusimos hacer una correlación entre ultraestructura y estimulación de los PAp, estos experimentos se vieron truncados porque el microscopio electrónico del IIBCE dejó de funcionar.

Desde el punto de vista molecular, pusimos en evidencia la expresión de VGAT en una importante proporción de los PAp estudiados (**figura 10**). La proteína VGAT es el sustrato molecular responsable del llenado de las vesículas sinápticas, por lo que este resultado sugiere fuertemente la liberación vesicular de GABA. Es interesante destacar que, en su estudio, Nakamura et al encontraron en el PAp vesículas sinápticas que expresan otra proteína presináptica, la sinaptofisina, de nuevo sugiriendo fuertemente la posibilidad de que el PAp se comporte como un compartimiento neuronal secretor.

Un resultado que surge de nuestros experimentos relativos a la expresión de VGAT es que encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la proporción de PAp VGAT+ en las regiones dorsal vs ventral a todos los niveles medulares (cervical, torácico y lumbar). Aunque desconocemos el significado funcional de esta diferencia, la misma podría reflejar la existencia de dos poblaciones funcionalmente heterogéneas de CSFcNs, tal como ocurre en la lamprea (Jalalvand et al., 2014).

Un resultado que no indica secreción de GABA por parte del PAp pero que sugiere fuertemente que los PAp podrían ser el blanco de las acciones parácrinas del GABA liberado por PAp vecinos, es la presencia de GABA_ARs en los PAp. En efecto, mediante el desenjaulado láser de GABA, que es una técnica que posee alta resolución espacial y temporal, demostramos la presencia de receptores ionotrópicos de GABA en el PAp (**figura 9**).

Típicamente, la exocitosis de neurotransmisores en las sinapsis químicas es dependiente del Ca⁺⁺ que ingresa al terminal a través de conductancias operadas por voltaje. La presencia de corrientes de Ca⁺⁺ operadas por voltaje, tal cual mostramos en este trabajo (**figura 12**), constituye otra evidencia indirecta que sustenta nuestra hipótesis. Si bien aquí se muestra la presencia de conductancias de Ca⁺⁺ de tipo T y una componente de alto umbral de activación en las CSFcNs cuando se realizan registros somáticos, haría falta abordar la presencia de dichas conductancias específicamente en el PAp aislado para establecer que las corrientes de calcio estén específicamente en esta estructura.

B. Resultados que no son compatibles con la secreción vesicular (en particular de GABA).

A pesar de que demostramos la presencia de la proteína VGAT en los PAp, no evidenciamos la presencia de otros sustratos moleculares implicados en la exocitosis de vesículas sinápticas como Syt1, Syt2 y syntaxina 4 en el PAp (**figura 11**). La syntaxina 4 era de particular interés ya que esta proteína muestra expresión en dendritas de neuronas donde se ha demostrado la liberación vesicular dendrítica (Kennedy et al., 2010). Curiosamente, obtuvimos marcaje de syntaxina 4 tapizando las paredes del CC, aunque excluyendo a los PAp. Aunque no tenemos confirmación, esto indicaría que la molécula podría localizarse en los endocitos. Aunque sería interesante estudiar la relevancia funcional de este hallazgo, el mismo excede los objetivos del presente trabajo.

Puesto que la presencia de sustratos moleculares como VGAT no implica que la secreción ocurra efectivamente, pusimos a punto múltiples abordajes electrofisiológicos para obtener evidencias funcionales de secreción vesicular.

Para obtener evidencias directas de la secreción de GABA desde el PAp utilizamos *sniffers* de GABA (**figura 14**). Estos *sniffers* fueron posicionados junto a un PAp y registrados por WCR, al tiempo que se estimuló eléctricamente la CSFcN correspondiente con el fin de provocar la exocitosis. A pesar de haber realizado este procedimiento en PAp dorsales, donde prácticamente todos los PAp expresan VGAT, no obtuvimos evidencias de secreción de GABA mediante este abordaje. Las células HEK que utilizamos como *sniffers* fueron sensibles al desenjaulado de 1 mM de GABA. Puesto que la concentración del GABA liberado en hendiduras sinápticas está en el entorno de 1 a 5 mM (Clements, 1996), de haberse alcanzado una concentración de similar magnitud entre un PAp y un *sniffer*, sería razonable esperar una respuesta de corriente constatable como resultado.

Además, realizamos mediciones de la CM en los PAp durante la estimulación eléctrica de las CSFcNs (**figura 15**). Puesto que la CM se incrementa como resultado del aumento transitorio de la superficie de membrana plasmática durante la exocitosis, utilizamos este parámetro para evaluar la posible secreción de un contenido diferente de GABA. Mediante este abordaje tampoco obtuvimos evidencias compatibles con la secreción de GABA desde el PAp.

La ausencia de evidencias funcionales para la secreción de GABA desde el PAp obliga a pensar en posibles limitaciones metodológicas de nuestro abordaje experimental, o bien a reinterpretar los hallazgos que sugieren un rol secretor del PAp de las CSFcNs. En primer lugar, resulta pertinente volver a notar que si bien las CSFcNs presentan conductancias de Ca^{++} dependientes de voltaje, aún no contamos con evidencias que sugieran la presencia de dichas conductancias en el PAp. Por lo tanto, la corriente de Ca^{++}

registrada desde un compartimento (soma o PAp) podría corresponder a la propagación electrofónica pasiva de una corriente localizada en otro compartimento, en este caso el soma. Para demostrar si el PAp posee conductancias de calcio operadas por voltaje, se podrían realizar 2 tipos de experimentos: registros de parches de membrana escindidos del PAp (*outside-out*) o registros en célula entera de PAp aislados, que aparecen en algunos preparados producto de la sección de la dendrita de la CSFcN durante el preparado de las rebanadas.

El PAp de las CSFcNs presenta, sin embargo, otro tipo de corrientes de Ca^{++} , independientes de voltaje que también podrían mediar la secreción vesicular: las mediadas por PKD2L1 (**figura 2**). Evidencias preliminares de nuestro grupo sugieren que la actividad espontánea de los canales PKD2L1 es un determinante importante de la concentración de calcio en el PAp, y que dicha concentración puede aumentar cuando la actividad de estos canales aumenta (por ejemplo, ante estímulos mecánicos o cambios del pH). Es posible entonces que la estimulación eléctrica no sea el estímulo más adecuado para provocar la exocitosis dependiente de Ca^{++} en el PAp, y en cambio sí lo sea un estímulo que propenda a incrementar la probabilidad de apertura de los canales PKD2L1. Actualmente estamos preparando experimentos para probar esta hipótesis.

EN SUMA.

El PAp es un compartimento dendrítico atípico, cuya funcionalidad es actualmente motivo de controversia. En el presente trabajo hemos abordado la hipótesis del rol secretor vesicular del PAp. Si bien las evidencias obtenidas en el curso de esta maestría no respaldan dicha hipótesis, consideramos que hace falta continuar investigando para descartarla por completo.

ANEXOS

ANEXO 1: Soluciones y reactivos

I. Sedantes, anestésicos y fijadores

- a. Diacepam 2 μ l/g (Unizepam, Unimedical)
- b. Xilacina 2% (Xilamic 2%, micro pet's)
- c. Ketamina 50 mg/ml (Ketonal 50 de Richmond)
- d. Paraformaldehído (PFA, SIGMA-ALDRICH, Ref # 1003550033)
- e. Glutaraldehído (SIGMA-ALDRICH, Ref# 354400)
- f. Isoflorano (ABBOTT S.p.A., Ref #9406)

II. Reactivos y soluciones para ensayos de Inmunohistoquímica

a. **PBS (Buffer Fosfato Salino) 1 x:**

Na_2HPO_4 (7,68 mM)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,67 mM)

NaCl (139,63 mM)

b. **PB (Buffer Fosfato)**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (42 mM)

Na_2HPO_4 (32 mM)

c. **Medio de encastre gelatina - albúmina:**

Seroalbúmina bovina al 45% (1ml).

Gelatina (1,5 g gelatina + 100ml PBS) (0,5ml).

Glutaraldehído (SIGMA-ALDRICH, Ref# 354400) (50 µl).

- d. Anticuerpo anti-VGAT polyclonal de conejo (Synaptic Systems, Ref #131 002)
- e. Anticuerpo de cabra anti - conejo conjugado con Alexa 647 (GAR – Alexa 647) (Invitrogen, Ref #A21244).
- f. Anticuerpo anti - Synaptotagmina 1 (Syt1), IgGA monoclonal de ratón (DSHB, Ref # AB 2295002).
- g. Anticuerpo cabra anti - ratón conjugado con Alexa 633 (Invitrogen, Ref #A21050).
- h. Anticuerpo anti - Synaptotagmina 2 (Syt2) (DSHB, Ref # AB 2315626).
- i. Anticuerpo anti Syntaxina 4 polyclonal de conejo (Synaptic Systems, Ref #110 043s).
- j. Dapi (Invitrogen, Ref #D1306)
- k. Fluoromount™ (SIGMA-ALDRICH, Ref #F4680).

III. Reactivos y soluciones para cultivos celulares

a. **Tripsina – EDTA estéril, 1 x.**

Invitrogen, Ref #T4299.

Por cada ml en Dulbecco's PBS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺, contiene:

- 500 unidades BAEE de tripsina porcina
- 180 µg EDTA

b. **SFB (Suero Fetal Bobino)**

Gibco™, Ref #12657029

c. **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo estéril:**

DMEM con L-glutamina y bicarbonato sódico (3,7 g/L)

Gibco™, Ref #11965092

d. DMSO (Dimetilsulfóxido)

SIGMA-ALDRICH, Ref #D4540

IV. Reactivos y soluciones para MET

a. Araldita

Para preparar Araldita utilizamos el pack durcupan ACM de SIGMA -ALDRICH incluyendo:

A- Resina Epoxi (Ref #44611)

B- 964 endurecedor (anhídrido de un ácido dicarboxílico con cadena lateral alifática)(Ref #44612)

C- 964 acelerador (derivado de fenol con grupo amino) (Ref# 44613)

D- plastificante (ftalato de dibutilo fulka) (Ref # 44614)

Para preparar la araldita se mezcló 51,4% A; 42.4% B; 2,4% C; 3,8% D.

b. Citrato de Plomo (fórmula de Reynold):

- 1,33 g NiPb
- 1,76 g Citrato de Na⁺
- 8ml NaOH 1N
- H2O mQ hasta enrazar a 50 ml

c. Osmio (SIGMA-ALDRICH tetróxido de osmio, Ref# 24505)

d. Membranas Polivinilformvar: 0.3%: solución de Formvar (SPI-CHEM, CAS# 63450-15-7) en cloroformo.

V. Soluciones y reactivos para electrofisiología

a. Solución Extracelular.

Sales	Concentración (mM)
NaCl	115
KCl	2.5
NaH ₂ PO ₄	1.3
NaHCO ₃	26
Glucosa	25
Na Piruvato	5
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1

b. Solución de disección.

Sales	Concentración (mM)
NaCl	101
KCl	3.8
MgSO ₄	1.3
KH ₂ PO ₄	1.2
HEPES	10
Glucosa	25
CaCl ₂	1
MgCl ₂	18.7

c. Solución intracelular de Gluconato de K⁺

Sales	Concentración (mM)
K-Gluconato	165
KCl	6
CaCl₂	0,1
MgCl₂	4,5
HEPES	10
EGTA	1
Na₂ ATP	4
Na₂ GTP	0,4
Alexa 594	0,002

d. Solución intracelular de Cloruro de Cesio + GABA

Sales	Concentración (mM)
CsCl	150
HEPES	10
EGTA	1
MgCl₂	4,6
CaCl₂	0,1
Na ATP	4
NaGTP	0,4
Alexa 594	0,002
GABA	10

a. Solución intracelular de cloruro de K⁺ + GABA

Sales	Concentración (mM)
KCl	155
HEPES acid	10
EGTA	1
MgCl₂	4,6
CaCl₂	0,1
Na ATP	4
NaGTP	0,4
Alexa 594	0,002
GABA	10

b. DPNI – Caged GABA.

TOCRIS (Ref # 2991).

c. Alexa fluor 594.

Invitrogen (Ref # A10438).

d. Tetrodotoxina (TTX)

Hello Bio (Ref # HB1035).

e. TTA-P2

Alomone labs (Ref # T-155)

f. Gabazina (TOCRIS, Ref #1262)

g. 4- AP (TOCRIS, Ref #0101/100)

h. TEA (TOCRIS, Ref # 3068)

i. Agar de bajo punto de fusión (GOLDBIO, Ref # A-204-100)

ANEXO 2: Figuras suplementarias

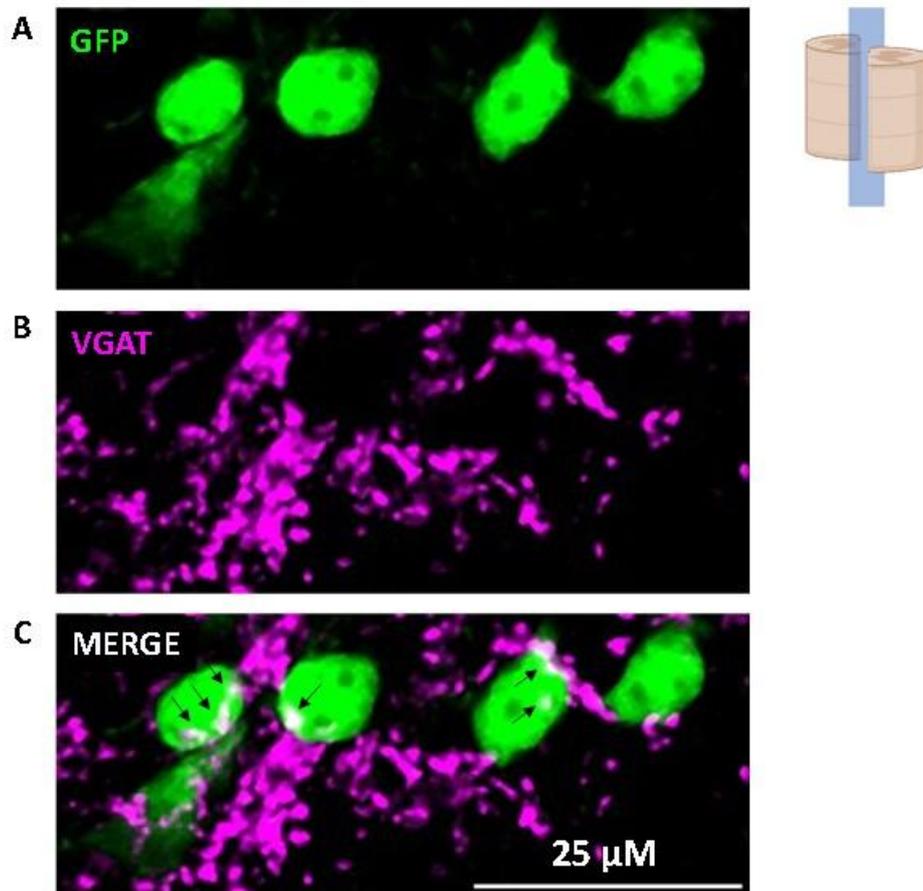


Figura suplementaria 1. Contactos GABAérgicos a nivel del soma en CSFcsNs. Imágenes de sección única obtenidas por microscopía confocal de un preparado longitudinal de ME cervical. **A.** Soma de CSFcsNs. **B.** IHQ contra VGAT. **C.** Merge de ambas señales. Las flechas negras indican las regiones donde se evidencian contactos GABAérgicos.

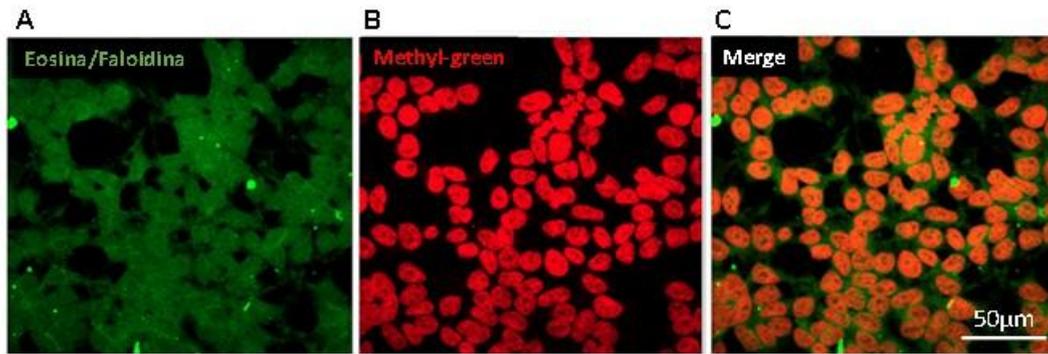


Figura suplementaria 2. Ausencia de contaminación por Mycoplasma cultivos de células HEK-GABA. A. Tinción citoplasmática con Eosina/Faloidina. **B.** Tinción nuclear con verde de metilo. **C. Merge.** Observar que no se observa marcación citoplasmática de ADN compatible con la presencia de bacterias del género Mycoplasma en las células HEK-GABA.

BIBLIOGRAFÍA

- Alibardi, L. (2019). Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the regenerating spinal cord of lizards and amphibians are likely mechanoreceptors. *Journal of Morphology*, 280(9), 1292-1308. <https://doi.org/10.1002/jmor.21031>
- Baig, S. M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M. J., & Brandt, N. (2011). Loss of Cav1. 3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nature neuroscience*, 14(1), 77-84.
- Blakely, R. D., & Edwards, R. H. (2012). Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(2), a005595.
- Böhm, U. L., Prendergast, A., Djenoune, L., Nunes Figueiredo, S., Gomez, J., Stokes, C., Kaiser, S., Suster, M., Kawakami, K., & Charpentier, M. (2016). CSF-contacting neurons regulate locomotion by relaying mechanical stimuli to spinal circuits. *Nature communications*, 7(1), 10866.
- Bolte, S., & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(3), 213-232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Casado, M., Molero, M., Sierra, C., García-Cazorla, A., Ormazabal, A., & Artuch, R. (2014). Analysis of cerebrospinal fluid γ -aminobutyric acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *ELECTROPHORESIS*, 35(8), 1181-1187. <https://doi.org/10.1002/elps.201300261>
- Chen, P., Wu, Y., Zhuang, J., Liu, X., Luo, Q., Wang, Q., Jiang, Z., He, A., Chen, S., Chen, X., Qiu, J., Li, Y., Yang, Y., Yu, K., & Zhuang, J. (2022). Gata3 Silencing Is Involved in Neuronal Differentiation and Its Abnormal Expression Impedes Neural Activity in Adult Retinal

- Neurocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), Article 5.
<https://doi.org/10.3390/ijms23052495>
- Chen, X.-Z., Vassilev, P. M., Basora, N., Peng, J.-B., Nomura, H., Segal, Y., Brown, E. M., Reeders, S. T., Hediger, M. A., & Zhou, J. (1999). Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature*, 401(6751), 383-386.
- Christensen, R. K., Petersen, A. V., Schmitt, N., & Perrier, J.-F. (2014). Fast detection of extrasynaptic GABA with a whole-cell sniffer. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 133.
- Ciriacks Klinker, C., & Bowser, M. T. (2007). 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a Fluorogenic Labeling Reagent for the in Vivo Analysis of Amino Acid Neurotransmitters Using Online Microdialysis–Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 79(22), 8747-8754. <https://doi.org/10.1021/ac071433o>
- Costes, S. V., Daelemans, D., Cho, E. H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., & Lockett, S. (2004). Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical journal*, 86(6), 3993-4003.
- Damkier, H. H., Brown, P. D., & Praetorius, J. (2013). Cerebrospinal Fluid Secretion by the Choroid Plexus. *Physiological Reviews*, 93(4), 1847-1892.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2013>
- Dean, C., Dunning, F. M., Liu, H., Bomba-Warczak, E., Martens, H., Bharat, V., Ahmed, S., & Chapman, E. R. (2012). Axonal and dendritic synaptotagmin isoforms revealed by a pHluorin-syt functional screen. *Molecular Biology of the Cell*, 23(9), 1715-1727.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e11-08-0707>
- DeCaen, P. G., Delling, M., & Clapham, D. E. (2014). Direct recording and molecular identification of the calcium channel of primary cilia. *Biophysical Journal*, 106(2), 638a.
- DeCaen, P. G., Liu, X., Abiria, S., & Clapham, D. E. (2016). Atypical calcium regulation of the PKD2-L1 polycystin ion channel. *Elife*, 5, e13413.

- Delling, M., DeCaen, P. G., Doerner, J. F., Febvay, S., & Clapham, D. E. (2013). Primary cilia are specialized calcium signalling organelles. *Nature*, *504*(7479), 311-314.
- Djenoune, L., Khabou, H., Joubert, F., Quan, F. B., Nunes Figueiredo, S., Bodineau, L., Del Bene, F., Burcklé, C., Tostivint, H., & Wyart, C. (2014). Investigation of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons expressing PKD2L1: Evidence for a conserved system from fish to primates. *Frontiers in neuroanatomy*, *8*, 26.
- Djenoune, L., & Wyart, C. (2017). Light on a sensory interface linking the cerebrospinal fluid to motor circuits in vertebrates. *Journal of Neurogenetics*, *31*(3), 113-127. <https://doi.org/10.1080/01677063.2017.1359833>
- Dolphin, A. C. (2021). Functions of presynaptic voltage-gated calcium channels. *Function*, *2*(1), zqaa027.
- Fidelin, K., Djenoune, L., Stokes, C., Prendergast, A., Gomez, J., Baradel, A., Del Bene, F., & Wyart, C. (2015). State-dependent modulation of locomotion by GABAergic spinal sensory neurons. *Current Biology*, *25*(23), 3035-3047.
- Gerstmann, K., Jurčić, N., Blasco, E., Kunz, S., de Almeida Sassi, F., Wanaverbecq, N., & Zampieri, N. (2022). The role of intraspinal sensory neurons in the control of quadrupedal locomotion. *Current Biology*, *32*(11), 2442-2453.
- Gillis, K. D. (1995). Techniques for Membrane Capacitance Measurements. En B. Sakmann & E. Neher (Eds.), *Single-Channel Recording* (pp. 155-198). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1229-9_7
- Gray, E. G. (1969). Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses: A brief review. *Progress in brain research*, *31*, 141-155.
- Higuchi, T., Shimizu, T., Fujii, T., Nilius, B., & Sakai, H. (2014). Gating modulation by heat of the polycystin transient receptor potential channel PKD2L1 (TRPP3). *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *466*(10), 1933-1940. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1439-1>

- Huang, A. L., Chen, X., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Guo, W., Tränkner, D., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*, *442*(7105), 934-938.
- Hubbard, J. M., Böhm, U. L., Prendergast, A., Tseng, P.-E. B., Newman, M., Stokes, C., & Wyart, C. (2016). Intraspinal sensory neurons provide powerful inhibition to motor circuits ensuring postural control during locomotion. *Current Biology*, *26*(21), 2841-2853.
- Hulse, R. E., Li, Z., Huang, R. K., Zhang, J., & Clapham, D. E. (2018). Cryo-EM structure of the polycystin 2-11 ion channel. *Elife*, *7*, e36931.
- Humphrey, T. (1947). Sensory ganglion cells within the central canal of the embryonic human spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, *86*(1), 1-35.
<https://doi.org/10.1002/cne.900860102>
- Inada, H., Kawabata, F., Ishimaru, Y., Fushiki, T., Matsunami, H., & Tominaga, M. (2008). Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3–PKD2L1. *EMBO Reports*, *9*(7), 690-697. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.89>
- Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M., & Matsunami, H. (2006). Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(33), 12569-12574.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602702103>
- Jalalvand, E., Robertson, B., Tostivint, H., Löw, P., Wallén, P., & Grillner, S. (2018). Cerebrospinal fluid-contacting neurons sense pH changes and motion in the hypothalamus. *Journal of Neuroscience*, *38*(35), 7713-7724.
- Jalalvand, E., Robertson, B., Tostivint, H., Wallén, P., & Grillner, S. (2016). The spinal cord has an intrinsic system for the control of pH. *Current Biology*, *26*(10), 1346-1351.
- Jalalvand, E., Robertson, B., Wallén, P., & Grillner, S. (2016). Ciliated neurons lining the central canal sense both fluid movement and pH through ASIC3. *Nature communications*, *7*(1), 10002.

- Jalalvand, E., Robertson, B., Wallén, P., Hill, R. H., & Grillner, S. (2014). Laterally projecting cerebrospinal fluid-contacting cells in the lamprey spinal cord are of two distinct types. *Journal of Comparative Neurology*, 522(8), 1753-1768. <https://doi.org/10.1002/cne.23542>
- Johnson, E., Clark, M., Oncul, M., Pantiru, A., MacLean, C., Deuchars, J., Deuchars, S. A., & Johnston, J. (2023). Graded spikes differentially signal neurotransmitter input in cerebrospinal fluid contacting neurons of the mouse spinal cord. *Isience*, 26(1). [https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042\(22\)02187-3](https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042(22)02187-3)
- Jurčić, N., Michelle, C., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., & Kastner, A. (2021). Evidence for PKD2L1-positive neurons distant from the central canal in the ventromedial spinal cord and medulla of the adult mouse. *European Journal of Neuroscience*, 54(3), 4781-4803. <https://doi.org/10.1111/ejn.15342>
- Kennedy, M. J., Davison, I. G., Robinson, C. G., & Ehlers, M. D. (2010). Syntaxin-4 defines a domain for activity-dependent exocytosis in dendritic spines. *Cell*, 141(3), 524-535.
- Kennedy, M. J., & Ehlers, M. D. (2011). Mechanisms and function of dendritic exocytosis. *Neuron*, 69(5), 856-875.
- Kiehn, O. (2016). Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. *Nature Reviews Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.9>
- Liu, X., Rich, K., Nasser, S. M., Li, G., Hjäresen, S., Finsen, B., Scherberger, H., Svenningsen, Å., & Zhang, M. (2023). A Comparison of PKD2L1-Expressing Cerebrospinal Fluid Contacting Neurons in Spinal Cords of Rodents, Carnivores, and Primates. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13582.
- Marder, E., & Bucher, D. (2001). Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Current biology*, 11(23), R986-R996.

- Marichal, N., García, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O., & Russo, R. E. (2009). Enigmatic central canal contacting cells: Immature neurons in “standby mode”? *Journal of Neuroscience*, *29*(32), 10010-10024.
- Masse, I., Barbolat-Boutrand, L., Kharbili, M. E., Berthier-Vergnes, O., Aubert, D., & Lamartine, J. (2014). GATA3 inhibits proliferation and induces expression of both early and late differentiation markers in keratinocytes of the human epidermis. *Archives of Dermatological Research*, *306*(2), 201-208. <https://doi.org/10.1007/s00403-013-1435-5>
- McIntire, S. L., Reimer, R. J., Schuske, K., Edwards, R. H., & Jorgensen, E. M. (1997). Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*, *389*(6653), 870-876.
- Nakamura, Y., Kurabe, M., Matsumoto, M., Sato, T., Miyashita, S., Hoshina, K., Kamiya, Y., Tainaka, K., Matsuzawa, H., & Ohno, N. (2023). Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord. *Elife*, *12*, e83108.
- Orts-Del’Imagine, A., Kastner, A., Tillement, V., Tardivel, C., Trouslard, J., & Wanaverbecq, N. (2014). Morphology, distribution and phenotype of polycystin kidney disease 2-like 1-positive cerebrospinal fluid contacting neurons in the brainstem of adult mice. *PLoS one*, *9*(2), e87748.
- Orts-Del’Imagine, A., Seddik, R., Tell, F., Airault, C., Er-Raoui, G., Najimi, M., Trouslard, J., & Wanaverbecq, N. (2016). A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem. *Neuropharmacology*, *101*, 549-565.
- Orts-Del’Imagine, A., Wanaverbecq, N., Tardivel, C., Tillement, V., Dallaporta, M., & Trouslard, J. (2012). Properties of subependymal cerebrospinal fluid contacting neurones in the dorsal vagal complex of the mouse brainstem. *The Journal of Physiology*, *590*(16), 3719-3741. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.227959>

- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., & Striessnig, J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell*, *102*(1), 89-97.
- Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P. E., & Zolessi, F. R. (2014). A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and Cell Biology*, *142*(3), 335-345. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1215-0>
- Rada, P., Tucci, S., Teneud, L., Paez, X., Perez, J., Alba, G., Garcia, Y., Sacchettoni, S., Del Corral, J., & Hernandez, L. (1999). Monitoring γ -aminobutyric acid in human brain and plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, *735*(1), 1-10.
- Riondel, P., Jurčić, N., Mounien, L., Ibrahim, S., Ramirez-Franco, J., Stefanovic, S., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., & Seddik, R. (2024). Evidence for Two Subpopulations of Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons with Opposite GABAergic Signaling in Adult Mouse Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *44*(22), e2289222024. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2289-22.2024>
- Russo, R. E., Fernández, A., Reali, C., Radmilovich, M., & Trujillo-Cenóz, O. (2004). Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurones in the turtle spinal cord. *The Journal of Physiology*, *560*(3), 831-838. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.072405>
- Sauvinet, V., Parrot, S., Benturquia, N., Bravo-Moratón, E., Renaud, B., & Denoroy, L. (2003). ***In vivo*** simultaneous monitoring of γ -aminobutyric acid, glutamate, and L -aspartate using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: Analytical developments and ***in vitro/in vivo*** validations. *ELECTROPHORESIS*, *24*(18), 3187-3196. <https://doi.org/10.1002/elps.200305565>

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., & Schmid, B. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 676-682.
- Shepherd, G. M. (2009). Dendrodendritic synapses: Past, present and future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1170*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819211/>
- Shimizu, T., Higuchi, T., Fujii, T., Nilius, B., & Sakai, H. (2011). Bimodal effect of alkalization on the polycystin transient receptor potential channel, PKD2L1. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *461*(5), 507-513. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-0934-5>
- Siksou, L., Triller, A., & Marty, S. (2011). Ultrastructural organization of presynaptic terminals. *Current opinion in neurobiology*, *21*(2), 261-268.
- Spector, R., Snodgrass, S. R., & Johanson, C. E. (2015). A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Experimental neurology*, *273*, 57-68.
- Sternberg, J. R., Prendergast, A. E., Brosse, L., Cantaut-Belarif, Y., Thouvenin, O., Orts-Del'Immagine, A., Castillo, L., Djenoune, L., Kurisu, S., & McDearmid, J. R. (2018). Pkd2l1 is required for mechanoreception in cerebrospinal fluid-contacting neurons and maintenance of spine curvature. *Nature communications*, *9*(1), 3804.
- Stoeckel, M., Uhl-Bronner, S., Hugel, S., Veinante, P., Klein, M., Mutterer, J., Freund-Mercier, M., & Schlichter, R. (2003). Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a γ -aminobutyric acidergic system expressing the P2X₂ subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities: Light and electron microscopic study. *Journal of Comparative Neurology*, *457*(2), 159-174. <https://doi.org/10.1002/cne.10565>
- Südhof, T. C., & Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *3*(12), a005637.

- Tindemans, I., Serafini, N., Di Santo, J. P., & Hendriks, R. W. (2014). GATA-3 Function in Innate and Adaptive Immunity. *Immunity*, 41(2), 191-206. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.006>
- Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., & Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47(6), 803-815.
- Trigo, F. F., Corrie, J. E., & Ogden, D. (2009). Laser photolysis of caged compounds at 405 nm: Photochemical advantages, localisation, phototoxicity and methods for calibration. *Journal of neuroscience methods*, 180(1), 9-21.
- Trigo, F. F., Papageorgiou, G., Corrie, J. E., & Ogden, D. (2009). Laser photolysis of DPNI-GABA, a tool for investigating the properties and distribution of GABA receptors and for silencing neurons in situ. *Journal of neuroscience methods*, 181(2), 159-169.
- Trujillo-Cenóz, O., Fernández, A., Radmilovich, M., Reali, C., & Russo, R. E. (2007). Cytological organization of the central gelatinosa in the turtle spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, 502(2), 291-308. <https://doi.org/10.1002/cne.21306>
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 387-417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Vien, T. N., Ta, M. C., Kimura, L. F., Onay, T., & DeCaen, P. G. (2023). Primary cilia TRP channel regulates hippocampal excitability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(22), e2219686120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2219686120>
- Vigh, B., & Vigh-Teichmann, I. (1998). Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Microscopy Research and Technique*, 41(1), 57-83. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980401\)41:1<57::AID-JEMT6>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<57::AID-JEMT6>3.0.CO;2-R)
- Wyart, C., Bene, F. D., Warp, E., Scott, E. K., Trauner, D., Baier, H., & Isacoff, E. Y. (2009). Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature*, 461(7262), 407-410.

Wyart, C., Carbo-Tano, M., Cantaut-Belarif, Y., Orts-Del'Immagine, A., & Böhm, U. L. (2023).

Cerebrospinal fluid-contacting neurons: Multimodal cells with diverse roles in the CNS.

Nature Reviews Neuroscience, 24(9), 540-556.

Zagoraïou, L., Akay, T., Martin, J. F., Brownstone, R. M., Jessell, T. M., & Miles, G. B. (2009). A

cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity.

Neuron, 64(5), 645-662.