

Nicolás Marichal

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas Subárea Neurociencia Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas-PEDECIBA Universidad de la República Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas Subárea Neurociencia

Heterogeneidad funcional en un nicho de células madre en la médula espinal: Implicancias para la reparación endógena

Lic. Nicolás Marichal

Orientador: Dr. Raúl E. Russo Laboratorio de ejecución: Neurofisiología Celular y Molecular Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

> Tribunal: Presidente: Dr. Luis Barbeito Vocales: Dra. Antonia Marín-Burgin Dr. Flavio Zolessi

> > Fecha: 10 de Abril de 2015

Agradecimientos

Quiero agradecer a Raúl Russo, quien me abrió las puertas de su laboratorio hace ya muchos años. Encontré en él a un orientador siempre dispuesto a escucharme, intercambiar ideas y apoyarme. Además de todo lo aprendido a su lado, ha sido un referente que me ha hecho crecer en esta carrera.

Agradecer a Omar Trujillo, quien ha sido para mí como un segundo orientador. Es invalorable todo lo que aprendí a su lado, además de las innumerables y enriquecedoras charlas diarias. Por otra parte, ha contribuido directamente realizando los experimentos de microscopía electrónica de esta Tesis.

A Luis Barbeito, Antonia Marín-Burgin y Flavio Zolessi por aceptar formar parte del tribunal de esta tesis y realizar importantes comentarios para mejorarla.

Especialmente a Gabriela García, Milka Radmilovich y Gabriela Fabbiani por su directa contribución mediante la realización de los experimentos de inmunohistoquímica que se describen en esta Tesis. Además por su invalorable aporte en la discusión de estos resultados.

A Julio Velluti, Daniel Lorenzo y Omar Macadar por sus enseñanzas y apoyo.

A Cecilia Reali, que ha su lado aprendí mucho y además me enseño gran parte de las técnicas que hoy manejo.

Al resto de los compañeros del Departamento con quienes he interactuado diariamente: Maria Ines Rehermann, Adrián Valentín, Carína Aldecoséa, Agustina Frechou. Siempre han estado dispuestos a darme una mano.

A Anabel Fernandez, Juan Carlos Rosillo y Doña Carmen, que siempre me han ayudado cuando lo he necesitado.

A todos los integrantes de la Unidad de Bases Neurales de la Conducta ("los peces"). Es innumerable la cantidad de ocasiones en que me han ayudado siempre con la mejor disposición

A todos los laboratorios y plataformas del IIBCE que en algún momento he pedido algo y siempre me han ayudado.

A todos mis amigos de la facultad ("la 2001") que han estado desde el nacimiento de todo esto.

A mis amigos de la vida.

A Alicia por todo su apoyo y cariño.

A mis padres y familia, sin su apoyo no hubiese sido nada.....

Esta tesis fue realizada gracias al PEDECIBA y al apoyo financiero de la ANII.





Índice

Resumen	6
Abreviaturas	7
Introducción General	8
Progenitores durante el desarrollo embrionario y en los nichos neurogénicos del	
cerebro	10
El CC como nicho de células madre latentes y su respuesta ante la lesión	12
Neurogénesis post-natal en la médula espinal: ¿neuronas inmaduras en el CC?	14
Propiedades fisiológicas de las células progenitoras	17
Regulación de células progenitoras mediada por neurotransmisores	19
Hipótesis de trabajo	21
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
Métodos	23
Animales de experimentación	23
Inmunohistoquímica	23
Detección de la proliferación celular	25
Electrofisiología	25
Obtención de rodajas de la médula espinal de rata	25
Visualización de las rodaias	26
Obtención de registros de "patch" en modo "whole cell"	26
Drogas	
Identificación morfológica de las células registradas	28
Análisis inmunohistoquímico de las células registradas	28
Aplicación local de sustancias por presión	
Obtención de registros de "patch" perforado	
Imagenología de Ca^{2+}	30
Microscopía electrónica de transmisión (MET)	
Capitulo I:Neuronas inmaduras en contacto con el CC	
Introducción	
Antecedentes específicos	31
Objetivo específico	
Resultados	
Propiedades funcionales de las neuronas del CC.	
Señalización GABAérgica en las neuronas en contacto con el CC.	
Inmadurez en el CC en ratas juveniles.	
Respuestas a cambios en el pH	
Nacimiento de las neuronas del CC	
Discusión	
Neuronas inmaduras en contacto con el CC: ¿aprendiendo a disparar?	
Señalización GABAérgica en el CC	
Nacimiento tardío de las neuronas en contacto con el CC	57

Capitulo II: Organización funcional de los progenitores ependimarios	. 59
Introducción	. 59
Antecedentes específicos	. 60
Objetivo específico	. 63
Resultados	. 63
Progenitores alrededor del CC: claves moleculares	. 63
Propiedades funcionales de los progenitores del CC	. 64
Ultraestructura de los progenitores en los dominios mediales del CC	. 75
Proliferación diferencial en los distintos dominios del CC	. 78
Progenitores en el CC juvenil y adulto	. 79
Discusión	. 81
Claves estructurales y moleculares de un nicho de células madres espinal	. 81
Diversidad funcional en los progenitores del CC	. 84
Capítulo III: Señalización purinérgica en el CC	. 86
Introducción	. 86
Objetivo específico	. 87
Resultados	. 87
Respuestas al ATP en las neuronas del CC	. 87
Respuestas al ATP en los progenitores del CC	. 88
Inmunohistoquímica para receptores P2X7 en la región ependimaria	. 91
Ondas de Ca ²⁺ inducidas por activación de receptores P2X ₇ en las GRs del CC	. 92
Compartimentos formados por endomembranas en las GR del CC como posibles	
reservorios del Ca ²⁺ intracelular	. 97
Ondas de Ca ²⁺ en los dominios laterales del CC	. 99
Discusión	100
Evidencias funcionales de los receptores P2X ₇ en la región del CC	100
Ondas de Ca ²⁺ en los progenitores del CC	102
Rol de la señalización purinérgica en el CC	103
Conclusiones y perspectivas	106
¿Neuronas inmaduras en "modo de espera"?	106
Progenitores heterogéneos en dos dominios espaciales	108
Señalización purinérgica en los progenitores del CC y su implicancia para la	
reparación endógena	111
Referencias	113

Resumen

El canal central (CC) o epéndimo de la médula espinal se considera actualmente como un nicho latente de células madre. Esta región deriva de la parte ventral del tubo neural y se presenta como una zona plástica y dinámica. De hecho, las células que tapizan al CC reaccionan frente a una lesión proliferando, migrando y diferenciándose en fenotipos gliales en el sitio lesionado. Este fenómeno resulta fundamental para evitar una expansión secundaria del daño y obtener cierto grado de reparación en los mamíferos. Por lo tanto, para desarrollar futuras terapias de reemplazo efectivas y seguras frente a lesiones de la médula espinal, resulta crítico comprender mejor la biología de las células de este nicho latente de células madre. En particular, es esencial entender los mecanismos que podrían regular la proliferación y subsiguiente diferenciación de éstas células.

En esta Tesis, utilizamos una aproximación multi-técnica que combinó registros electrofisiológicos de "patch clamp", la inmunohistoquímica para diversos marcadores celulares e imagenología de Ca²⁺ para explorar las propiedades de las células del CC en ratas neonatales (P0-P5). Además, debido a que la concentración de ATP aumenta notablemente alrededor del epicentro de una lesión espinal, analizamos la señalización purinérgica en el CC como posible mecanismo de regulación de la respuesta de este nicho ante la lesión. Demostramos que el CC presenta células con características moleculares y funcionales típicas de neuronas inmaduras, similares a las descritas en los neuroblastos de los nichos neurogénicos adultos del cerebro. Aunque son generadas durante el desarrollo embrionario, el hecho que estas células continúen expresando moléculas que participan en la migración y la plasticidad neuronal (como la doblecortina) sugiere que se encuentran en "modo de espera" y bajo ciertas circunstancias (ej. lesión) completen su desarrollo, migrando e integrándose a los circuitos neuronales va existentes. Por otra parte, hemos revelado una heterogeneidad funcional de los progenitores que contactan el CC organizados en dominios espaciales. En los cuadrantes laterales, las células combinan características de ependimocitos y glías radiales (GRs) con respuestas pasivas al pasaje de corriente y un extenso acoplamiento a través de conexina 43. En los polos dorsal y ventral del CC, persisten GRs que no se encontraron acopladas y exhibieron conspicuas corrientes generadas por canales de K^{\dagger} voltaje-dependientes. Estos canales podrían ser importantes reguladores de la proliferación celular, como ocurre en otras células progenitoras y glías. Además, encontramos que las células ependimarias expresan el receptor ionotrópico purinérgico P2X7. La activación de este receptor genera corrientes entrantes en la mayoría de las GRs y ondas de Ca2+ capaces de propagarse por toda la célula. Este aumento de Ca²⁺ intracelular podría ser un mecanismo epigenético para regular las propiedades de estos progenitores en respuesta al ATP liberado por una lesión. En conjunto, los resultados de esta Tesis aportan información novedosa sobre la complejidad funcional en este nicho de células madre latente de la médula espinal, abriendo nuevas avenidas para el futuro desarrollo de estrategias terapéuticas para alcanzar una reparación endógena luego de una lesión.

Abreviaturas

- 2-MeS-ADP: 2-Methylthio-ADP
- 4-AP: 4-aminopiridina
- ATP: adenosina trifosfato
- BBG: "brillant blue G"
- BLBP: brain lípid binding protein"
- BrdU: 5-bromo-2'-desoxiuridina
- BSA: seroalbumina
- BzATP: 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)ATP
- CC: canal central
- Cx43: conexina 43
- DAB: 3,3'-diaminobencidina
- DCX: doblecortina
- DMSO: dimetilsulfóxido
- G: conductancia
- GABA: ácido gamma-aminobutírico
- GFAP: "glial fibrillary acidic protein"
- GR: glía radial
- GRs: glias radiales
- I_{KD} : corriente de K⁺ de rectificación retardada
- I_{KD} : corriente de K⁺ de tipo A
- I_{Na} : corriente de Na⁺
- MET: microscopía electrónica de transmisión
- NeuN: antígeno nuclear neuronal
- PAF: paraformaldehido
- PB: solución tampón fosfato de sodio
- PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación
- PDGFRα: receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas α
- pH3: fosfohistona H3
- PKD2L1: "polycystic kidney disease 2-like 1"
- PSA-NCAM: molécula polisialilada de adhesión celular neural
- ROIs: regiones de interés
- SNC: sistema nervioso central
- TEA: tetraetilamonio
- TTX: tetrodotoxina
- V_h: potencial de membrana de activación/inactivación media
- ZSG: zona subgranular
- ZSV: zona subventricular

Introducción General

El daño causado por una lesión traumática del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos, generalmente resulta en una recuperación limitada a nivel anatómico y funcional. Durante décadas, la exploración de posibles estrategias terapéuticas para la reparación se focalizó en el transplante de células exógenas en el sito de lesión que puedan reemplazar a las células perdidas (Emsley y col., 2004). Sin embargo, el descubrimiento de células progenitoras endógenas capaces de generar distintos tipos celulares -incluidas las neuronas- sugiere nuevas avenidas para la reparación. La potencial manipulación de las propiedades de las células madre neurales o células progenitoras se plantea actualmente como una estrategia terapéutica frente a lesiones traumáticas del SNC. La aceptación de la generación y adición de nuevas neuronas luego del nacimiento a partir de células madre intrínsecas ha sido un proceso lento. Por más de 100 años se pensó que en los mamíferos la neurogénesis ocurría exclusivamente durante la vida embrionaria. Para el final del siglo XIX, la idea de que el cerebro de los animales adultos permanecía estructuralmente constante era afirmada universalmente por reconocidas figuras de la época como Ramón y Cajal (1913-1914), Koelliker (1896) y His (1904). La posibilidad de un pensamiento a favor de la adición de nuevas neuronas luego del nacimiento era poco probable. Durante la primera mitad del siglo XX, algunos estudios ocasionales (ver revisión de Gross, 2000) reportaron la existencia de células "indiferentes" y figuras mitóticas en el cerebro (especialmente en la zona ventricular) sugiriendo la posibilidad de neurogénesis post-natal en mamíferos. Sin embargo, dichos estudios no fueron considerados suficientes para oponerse a dogmas de gran autoridad en la época como el dictado por Santiago Ramón y Cajal (1913-1914) según el cual: "Preciso es reconocer que, en los centros adultos, las vías nerviosas son algo fijo, acabado, inmutable. Todo puede morir, nada renacer. Toca á la ciencia del porvenir casar, si ello es posible, la ardua sentencia..." A partir de la segunda mitad del siglo XX, utilizando la técnica de autorradiografía con timidina tritiada para marcar células proliferantes y la

combinación con microscopía electrónica se comenzaron a generar sólidas evidencias a favor de la formación de nuevas neuronas en animales post-natales (Altman, 1962, 1963, Altman y Das, 1965, Kaplan y col., 1977, Goldman y Nottebohm, 1984, Stanfield y Trice, 1988). Otro importante avance en el tema fue la introducción del análogo sintético de la timidina denominado BrdU (5bromo-2-desoxiuridina) como método alternativo para marcar células en división (Nowakowski y col., 1989). La detección inmunohistoquímica de este compuesto junto al desarrollo de marcadores celulares específicos capaces de identificar neuronas y glías, llevó a una revolución en el concepto de la neurogénesis y la plasticidad en los mamíferos adultos (Kuhn y col., 1996, Kempermann y col., 1997, Kornack y Rakic, 1999). Actualmente, está bien caracterizada la existencia de células progenitoras capaces de generar nuevas neuronas en dos áreas específicas del cerebro: la zona subventricular (ZSV) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (Lledo y col., 2006, Fuentealba y col., 2012). Estas regiones se conocen como nichos neurogénicos activos donde las nuevas neuronas generadas se integran funcionalmente a los circuitos ya existentes (van Praag y col., 2002; Carleton y col., 2003).

A pesar de los importantes avances realizados en el conocimiento de estas regiones del cerebro, la plasticidad en la médula espinal ha sido mucho menos estudiada. La presencia de neurogénesis post-natal en esta región del SNC no ha sido claramente evidenciada en condiciones normales. Sin embargo, el canal central (CC) o epéndimo en la médula espinal parece ser una estructura plástica y dinámica. Las células que tapizan el CC derivan de la parte ventral del tubo neural (Fu y col., 2003) y mantienen potencialidad proliferativa luego del nacimiento. De hecho, las células ependimarias reaccionan frente a la lesión proliferando y migrando hacia el sitio lesionado donde se diferencian principalmente en astrocitos y oligodendrocitos (Johansson y col., 1999; Meletis y col., 2008). Esta respuesta es fundamental para restringir la propagación secundaria de la muerte celular y axonal en la zona lesionada, contribuyendo a la sobrevida neuronal en regiones adyacentes (Sabelström y col., 2013). Por lo tanto, resulta fundamental entender mejor la biología de las células de esta

9

región que se presenta como un nicho de células madre latente (Göritz y Frisén, 2012), capaz de activarse luego de una lesión. Dentro de este marco conceptual, esta tesis estuvo dirigida a profundizar en este aspecto fundamental para la biomedicina actual.

Progenitores durante el desarrollo embrionario y en los nichos neurogénicos del cerebro

Durante el desarrollo de la corteza cerebral de los mamíferos, se ha identificado a la glía radial (GR) cómo la célula progenitora responsable de la neurogénesis (Noctor y col., 2001, Fishell y Kriegstein, 2003). Estas células forman unidades funcionales con una organización radial gracias al acople eléctrico y metabólico a través de uniones tipo "gap junction" (Noctor y col. 2001). El acople resulta crítico para el mantenimiento de este fenotipo celular y de su capacidad proliferativa (Bruzzone y Dermietzel, 2006). Una vez completado el desarrollo, las glias radiales (GRs) se diferencian en astrocitos (Kriegstein y Götz, 2003), oligodendrocitos (Rowitch, 2004) o células ependimarias (Spassky y col., 2005) desapareciendo de la mayor parte del SNC. En la ZSV, las células madre presentan mayormente propiedades de astrocitos (ej. expresan la "glial fibrillary acidic protein", GFAP) y contactan al ventrículo por intermedio de un proceso apical que presenta un único cilio (Figura 1, Wang y Bordey, 2008, Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Su replicación es lenta y generan una progenie de células amplificadoras de división rápida que a su vez, se encargan de generar precursores neuronales. Estos precursores -denominados neuroblastos- migran hacia el bulbo olfatorio a través de una zona llamada corriente migratoria rostral en un número aproximado de más de 30.000 por día (Alvarez-Buylla y col., 2001). Una vez que llegan al bulbo olfatorio, maduran en dos tipos de interneuronas inhibitorias en capas de la corteza olfatoria: neuronas granulares o periglomerulares (Lledo y col., 2006).



Figura 1. Esquema de los componentes del nicho neurogénico en la ZSV del cerebro adulto de roedores. Las células madre en la pared de los ventrículos laterales corresponden a astrocitos (también denominadas células B). Estas células retienen propiedades de células neuroepiteliales, como la extensión de un proceso apical delgado que termina en el ventrículo y un proceso basal en contacto con la lámina basal de los vasos sanguíneos. Estas células dan lugar a células amplificadoras (células C) que se encargan de generar neuroblastos (células A). Las células B también generan oligodendrocitos a través de progenitores intermedios. Tomado de Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009.

En la ZSG, las células madre son denominadas astrocitos radiales (Kempermann y col., 2004) que también presentan una polaridad muy marcada al igual que las células B en la ZSV y que las GRs en el embrión (Figura 2). Estos progenitores dan lugar a células amplificadoras intermedias que terminan generando un número cercano a 9.000 neuroblastos por día en ratas juveniles (Cameron y McKay, 2001). Estos neuroblastos se diferencian en neuronas maduras denominadas granos del giro dentado que envían sus axones a la zona CA3, mientras reciben contactos sinápticos en sus árboles dendríticos localizados en la capa molecular (Lledo y col., 2006, Fuentealba y col., 2012).



Figura 2. Esquema de la composición celular de la ZSG del giro dentado del hipocampo en los roedores. Las células madre son astrocitos radiales (RA) que dan lugar a células amplificadoras intermedias (IPC), que progresivamente se diferencian en células granulares inmaduras (IGC) para luego generar granos maduros (GC). Tomado y modificado de Fuentealba y col., 2012.

El CC como nicho de células madre latentes y su respuesta ante la lesión

Las GRs que actúan como progenitores durante el desarrollo se encuentran organizadas en diferentes dominios dorso-ventrales en el tubo neural (Jessell, 2000, Briscoe y col., 2000), generando los diversos tipos de neuronas y células gliales que forman la médula espinal. Durante las primeras semanas de vida post-natal, la mayor parte de estos progenitores se convierten en astrocitos (Ramón y Cajal, 1909, Kriegstein y Götz, 2003). Sin embargo, algunas células en contacto con el CC retienen ciertas propiedades de los progenitores del neuroepitelio ventral (Fu y col., 2003) y han sido consideradas como un conjunto de células ciliadas con una morfología cuboide característica que forman un epitelio simple recubriendo al epéndimo (Del Bigio, 2010). En contraposición a esta supuesta simplicidad, diversos estudios han establecido que las células ependimarias en condiciones "*in vitro*" presentan potencialidad de células madre neurales, pudiéndose diferenciar en astrocitos, oligodendrocitos o incluso

neuronas (Figura 3, Meletis y col., 2008, Sabourin y col., 2009, Barnabé-Heider y col., 2010; Pfenninger y col., 2011).



Figura 3. A-B, Esquema representativo de la distribución de las células ependimarias (verde), astrocitos (rojo) y progenitores de oligodendrocitos (azul) en la médula espinal intacta (A), y de su progenie en el animal adulto de 4 meses (B). C, Representación esquemática que muestra el destino de la progenie de las distintas estirpes celulares en la médula espinal intacta. D, El potencial de células madre neurales *in vitro* en la médula espinal adulta se limita a la población de células ependimarias. Sólo éstas células son multipotentes y generan neurosferas que pueden auto-renovarse y generar diversos fenotipos celulares. Tomado de Sabelström y col., 2013.

Esta potencialidad de las células ependimarias parece activarse al producirse una lesión espinal. Un daño en la región dorsal de la médula espinal de roedores es capaz de inducir una respuesta en las células que tapizan al CC llevando a que estas proliferen, migren hacia el sitio de lesión y se diferencien en distintos tipos de glías (Figura 4, Mothe y Tator., 2005, Horky y col., 2006, Meletis y col., 2008). En un reciente trabajo, Sabelström y col. (2013) demostraron que esta respuesta resulta fundamental para restringir los daños generados por la lesión. Utilizando ingeniería genética demostraron que al impedir la reacción proliferativa de las células ependimarias en respuesta a una lesión, el daño secundario y la muerte axonal es mucho mayor. Además, las células ependimarias reactivas y su progenie liberan factores tróficos necesarios para la sobrevida neuronal en regiones adyacentes a la lesión. Estos datos convierten al CC en un nicho de células madre latente (Göritz y Frisén, 2012) y a las células que lo integran, en principales protagonistas de la reacción endógena de la médula espinal frente a la lesión.



Figura 4. A, Distribución de la progenie de células ependimarias (verde), astrocitos (rojo), progenitores de oligodendrocitos (azul) y pericitos (naranja) inducida por una lesión en funículo dorsal de la médula espinal. B, Origen de nuevos astrocitos (A), oligodendrocitos (O) y células del estroma (SC) 4 meses después de la lesión. Los colores de las barras indican el destino celular de acuerdo con la combinación de colores en C. C, Representación esquemática que muestra el destino de la progenie de las células ependimarias, astrocitos, precursores de oligodendrocitos y pericitos en la médula espinal lesionada. Tomado de Sabelström y col., 2013.

Neurogénesis post-natal en la médula espinal: ¿neuronas inmaduras en el CC?

A diferencia de lo que ocurre en el cerebro donde los nichos neurogénicos están bíen caracterizados, la posibilidad de plasticidad neuronal post-natal en la médula espinal y sus posibles mecanismos de control han sido mucho menos explorados. En los mamíferos, estudios pioneros realizados en la médula espinal de ratas mostraron que las neuronas en esta región del SNC son únicamente generadas durante el período que va entre los 11 y 16 días de gestación (Nornes y Das, 1972, 1974). Estos datos contribuyeron al concepto de la médula post-natal de los mamíferos como un órgano estático de células nerviosas. Si bien existen algunos reportes recientes de neurogénesis en condiciones normales (Shechter y col., 2007, 2011), actualmente la idea dominante es que los diferentes típos de célula glial en la médula espinal adulta están restringidos a una auto-replicación limitada, sin la capacidad de diferenciarse en otros fenotipos celulares (Barnabé-Heider y col., 2010).

Sin embargo, en la médula espinal de otros vertebrados tales como los peces y anfibios, estudios realizados sobre neurogénesis mostraron que el número de neuronas aumenta a lo largo de la vida de estos animales (Birse y col., 1980; Clorfene y Pollack, 1994). Mediante la aplicación de un enfoque multi-técnico que combinó inmunohistoquímica, electrofisiología y microscopía electrónica nuestro grupo ha caracterizado las células que tapizan el CC en tortugas juveniles de agua dulce (Russo y col., 2004, 2008, Trujillo-Cenoz y col., 2007). Esta zona mantiene una alta capacidad proliferativa, generando nuevas neuronas y glías (Fernandez y col., 2002). El potencial de esta región neurogénica surge de la presencia de progenitores ubicados en los aspectos laterales del CC que expresan "brain lípid binding protein" (BLBP) y Pax6, y están eléctrica y metabólicamente acoplados a través de conexina 43 (Cx43) (Russo y col., 2008). Intercaladas entre estos progenitores se reveló la presencia de células con características similares a las de los neuroblastos de los nichos neurogénicos del cerebro adulto (Russo y col., 2004). Estás células expresaron el marcador neuronal temprano HuC/D y presentaron la capacidad de generar potenciales de acción breves y sensibles a tetrodotoxina (TTX), lo que indica que son mediadas por canales de Na⁺ operados por voltaje (Figura 5).</sup>

15



Figura 5. A, Propiedades electrofisiológicas de una célula en el CC de la tortuga que es capaz de generar un único potencial de acción en respuesta a una despolarización. B, Otras células generan potenciales de acción de forma repetitiva (a). Esta célula mostró una pequeña atenuación en la amplitud de la espiga frente a una despolarización sostenida (5 s, b) y mostró una morfología simple (c). C, Diferencias entre los potenciales de acción de la célula con descarga única (a) y descarga repetitiva (b). D, Los potenciales de acción (a) fueron bloqueados con TTX (b). E, Imagen de una célula registrada en contacto con el CC (a, punta de flecha) que descargó potenciales de acción (inserto). Esta célula expresó el marcador neuronal temprano HuC/D (b-d, punta de flecha). Tomado de Russo y col., 2004.

La presencia de células con características de neuronas en esta zona en contacto con el CC fue propuesta por estudios realizados a principios de siglo (Vigh-Teichmann y Vigh. 1983). Por su peculiar ubicación, fueron asociadas a funciones sensoriales y/o neurosecretoras y se denominaron neuronas que contactan el líquido cefalorraquídeo (CSFcNs, del inglés Cerebrospinal Fluid Contacting Neurons). En los mamíferos, si bien se conocen algunas de las características morfológicas e inmunohistoquímicas (Stoeckel y col. 2003) de estas neuronas putativas que formarían parte del nicho ependimario, es escasa la información sobre sus propiedades fisiológicas.

Propiedades fisiológicas de las células progenitoras

La expresión de canales iónicos y sus propiedades funcionales son moduladas durante el proceso de diferenciación de las células nerviosas (Ribera, 1999; Spitzer y col., 2000). La activación de estos canales participa en la regulación de esta diferenciación (Ben-Ari, 2002). A su vez, la proliferación también es regulada por la actividad de estos canales. Por ejemplo, diferentes trabajos sugieren que en particular el ion K^+ y la expresión de canales de K^+ voltaje dependientes juegan un rol fundamental en la señalización que lleva a la proliferación en diferentes tipos celulares (Boonstra y col., 1981; Dubois y Rouzaire-Dubois, 1993). Concretamente, un trabajo reciente muestra que las células precursoras neurales humanas presentan dos tipos de corrientes salientes de K⁺: un componente transitorio típico de las corrientes generadas por canales de rápida inactivación de tipo A (I_A) y un componente lento sin inactivación, típico de los canales de rectificación lenta (I_{KD}). A su vez, este trabajo sugiere a la I_A como esencial para regular la proliferación de estas células (Schaarschmidt y col., 2009). Corrientes similares han sido descritas también en progenitores de oligodendrocitos (Chittajallu y col., 2004; Lytle y col., 2009). Sin embargo, la función general de estos canales en la regulación del ciclo celular aún no es clara y parece variar en diferentes tipos celulares. Por ejemplo, la proliferación en células inmunitarias activas es reprimida cuando un subtipo de canal de K⁺ (Kv 1.3) es bloqueado (Beeton y col., 2005). Por otra parte, un efecto contrario de aumento en la proliferación es observado en células progenitoras neurales de rata ante el bloqueo del mismo canal (Liebau y col., 2006). Por lo tanto, el estudio de los canales iónicos es un aspecto trascendente de la biología de las células precursoras a ser explorado.

Las propiedades fisiológicas de los progenitores durante el desarrollo embrionario y en los nichos neurogénicos son heterogéneas. Las GRs en el embrión presentan respuestas pasivas frente al pasaje de corriente debido a la ausencia de canales operados por voltaje (Figura 6, Noctor y col., 2002). En la ZSG de ratones, algunos progenitores presentan propiedades pasivas de membrana. Sin embargo, otros presentan una I_{KD} y pequeñas corrientes

17

entrantes (Filippov y col., 2003). En la ZSV, los progenitores también presentan corrientes salientes generadas por canales de K⁺ operados por voltaje (Liu y col., 2006). Sin embargo, las propiedades funcionales de las células de tipo precursor en contacto con el CC en la médula post-natal no han sido caracterizadas y permanecen desconocidas.



Figura 6. A, Respuesta típica de un progenitor durante el desarrollo embrionario de la corteza cerebral a una serie de escalones de voltaje. B, La relación corriente-voltaje de la respuesta en A es lineal entre -90 mV y 10 mV. C, Respuestas de un progenitor embrionario a una serie de escalones de corriente registrados en modo de fijación de corriente. D, La substracción de la corriente de pérdida del registro en A demuestra la ausencia de conductancias operadas por voltaje. E, Ejemplos de diferentes progenitores registrados en diferentes días embrionarios (E12, E15, E16, E18). Todos mostraron la morfología típica de GR. Escala en E, 10 µm. Tomado de Noctor y col., 2002.

Regulación de células progenitoras mediada por neurotransmisores

Dentro de los variados mecanismos de regulación que actúan sobre los progenitores durante el desarrollo y en los nichos neurogénicos adultos (Hsieh y Schneider., 2008; Kemperman., 2008; Lucassen y col., 2008; Jang y col., 2008), uno de los más destacados es la regulación llevada a cabo por determinados neurotransmisores. Por ejemplo, en la ZSV la señalización mediada por el ácido gamma-aminobutírico (GABA) se encuentra directamente implicada en la regulación de la proliferación. El grupo de Bordey ha demostrado que los progenitores en esta zona tienen receptores GABAA que son activados por GABA (Wang y col., 2003) liberado por los neuroblastos de la vecindad (Liu y col., 2005). La activación de los receptores GABA_A en los progenitores inhibe la proliferación de los mismos, configurando un mecanismo de retroalimentación negativa por el cual, un aumento en la producción de neuroblastos llevaría a una disminución compensatoria de la proliferación de progenitores (Liu y col., 2005). Un neurotransmisor candidato para contrarrestar el efecto del GABA en la proliferación de los progenitores es el glutamato. Estudios recientes muestran que ciertos receptores glutamatérgicos se expresan tanto en los neuroblastos como en las células progenitoras de la SVZ y participarían junto con el GABA en la regulación homeostática de la neurogénesis (Platel y col., 2007).

Una de las señalizaciones más relevantes durante el desarrollo es la mediada por adenosina trifosfato (ATP). Esta señalización purinérgica está presente en etapas tempranas de la embriogénesis y se encuentra involucrada en procesos de proliferación, diferenciación y migración (Figura 7, Zimmermann, 2006, Majmuder y col., 2007). Los receptores que responden al ATP se encuentran divididos en dos grandes familias: receptores ionotrópicos P2X (P2X₁₋₇) y receptores metabotrópicos asociados a proteína G denominados P2Y (P2Y₁₋₁₄). La principal función de estos receptores es elevar la concentración intracelular de Ca²⁺ generando así cascadas de señalización. El grupo de Arnold Kriegstein ha demostrado que las ondas de Ca²⁺ generadas por la liberación de ATP y la consecuente activación de receptores P2Y₁ acompañan la proliferación y la neurogénesis en las GRs durante el desarrollo de la corteza cerebral (Weissman

y col., 2004). Además, esta señalización también parece estar presente en los nichos neurogénicos adultos. En un reciente trabajo, Genzen y col. (2009) mostraron que las células ependimarias en la ZSV expresan receptores funcionales purinérgicos del tipo P2X₇ que responden al ATP. Las señales purinérgicas juegan además un rol importante en la respuesta a la inflamación, la isquemia y los mecanismos de injuria celular (Franke y col., 2006). Por lo tanto, la activación de este tipo de receptores podría estar involucrada en las respuestas de las células ependimarias frente a la lesión o la inflamación. Sin embargo, no existe información sobre la señalización purinérgica en el CC. Entender esta señalización podría ser relevante para dilucidar los mecanismos de respuesta de estas células ante traumatismos espinales.



Figura 7. Visión general de los diversos mecanismos de regulación en los que se encuentran involucrados los nucleótidos como el ATP durante el desarrollo del sistema nervioso. Tomado de Zimmermann, 2006.

Hipótesis de trabajo

Nuestra hipótesis de trabajo -basada en los datos anteriormente mencionados- plantea que en contacto con el CC de la médula espinal de la rata post-natal existen células con características de progenitores y células pertenecientes al linaje neuronal, con propiedades similares a las de los neuroblastos en los nichos neurogénicos. Además, planteamos que el ATP podría señalizar sobre estas células, siendo un posible mecanismo de regulación de la respuesta ante la lesión. Algunas de las interrogantes iniciales sobre las células que tapizan al CC fueron: 1) ¿son las propiedades funcionales de las neuronas putativas que contactan al CC de mamíferos similares a las reportadas en tortugas? 2) ¿es posible reconocer la existencia de células progenitoras en el epéndimo de la médula espinal de los mamíferos, en base a sus fenotipos morfológicos, moleculares y funcionales?; 3) ¿son las células progenitoras identificables, como ocurre en el cerebro anterior, con astrocitos especializados o con GRs como ocurre durante el desarrollo?; 4) ¿cómo son las características de estos precursores comparados con aquellos del embrión? 5) ¿es importante la señalización purinérgica en el epéndimo de la médula espinal como lo es durante el desarrollo y en los nichos neurogénicos del cerebro?

Objetivo general

El objetivo general que motivó esta tesis fue aportar nuevos conocimientos sobre la biología de las células que contactan el CC de la médula espinal de la rata. Creemos que para desarrollar futuras terapias de reemplazo efectivas y seguras frente a enfermedades neurodegenerativas o accidentes traumáticos en la médula espinal, primero resulta fundamental ampliar nuestros conocimientos referentes a la fisiología de las células progenitoras del CC y sus mecanismos de regulación.

Objetivos específicos

1- Identificar, a través de las características morfológicas, moleculares y electrofisiológicas a la posible existencia de células de estirpe neuronal en el epéndimo de la médula espinal de ratas neonatas.

2- Identificar y caracterizar las eventuales células progenitoras en el epéndimo de la médula espinal de ratas neonatales en base a sus propiedades electrofisiológicas y la expresión de marcadores moleculares típicos de células madre neurales.

3- Analizar la señalización purinérgica en el CC como nicho putativo de células progenitoras.

Métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley en los primeros días de vida postnatal (P0-P5) provenientes del bioterio del IIBCE. Para algunos experimentos fueron utilizados también ratas juveniles (P15-P18) y adultas (P>21). Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo las pautas del comité de Bioética del IIBCE.

Inmunohistoquímica

Las ratas anestesiadas (pentobarbital sódico, 50 mg/kg i.p.) fueron fijadas mediante perfusión intracardíaca con paraformaldehido (PAF) al 4%. La médula espinal fue disecada e incluida para obtener cortes transversales de 50-60 µm utilizando un vibrátomo (Leica VT1000S). Se utilizó el siguiente protocolo básico: 1) incubación con anticuerpo primario y Triton X-100 al 0.3 %. Las concentraciones y los tiempos de incubación fueron puestos a punto de acuerdo al anticuerpo utilizado; 2) lavados en solución tampón (pH=7.4) fosfato de sodio (PB, 0.1 M); 3) incubación con anticuerpos secundarios conjugados con un fluoróforo o con peroxidada de rábano; 4) lavados finales y montaje de los preparados para su observación utilizando un microscopio confocal (FV 300; Olympus, Tokyo, Japan). La lista de anticuerpos primarios utilizados se incluye en la Tabla 1. Para la detección del anticuerpo anti-HuC/D en algunos casos se utilizó el kit "Zenon® Antibody Labeling" (Invitrogen). Para la combinación de los anticuerpos anti-3CB2 y anti-Nestina, se aplicó un procedimiento secuencial de inmunofluorescencia utilizando secundarios anti-IgG1 de ratón Alexa 488 y anti-IgM Cy3 de ratón. La peroxidasa de rábano fue revelada con 3,3diaminobencidina (Sigma-Aldrich). Para el marcaje de los núcleos celulares en algunos casos se utilizó Syto 64 (Invitrogen).

Los experimentos inmuhohistoquímicos descritos en el los Capítulos I y II fueron realizados por Gabriela García y Milka Radmilovich, mientras que los del Capítulo III por Gabriela Fabbiani. La obtención y el análisis de los resultados fueron realizados en conjunto.

23

Nombre	Especie	Referencia	Distribuidor	Dilución
anti-HuC/D	Ratón	A-21276	Invitrogen	1:50
NeuN	Ratón	MAB377	Millipore	1:200
PSA-NCAM	Ratón	5A5	Iowa Hybridoma Bank	1:10
Doblecortina	Cabra	C-18	Santa Cruz Biotechnology	1:200
BrdU	Conejo	BP40250	Megabase Research	1:10000
BrdU	Ratón	M0744	Dako Cytomation	1 :500
S100β	Conejo	S2644	Sigma-Aldrich	1:500
Vimentina	Ratón IgM	40E-C	Iowa Hybridoma Bank	1:10
Nestina	Ratón	clone rat-401	Iowa Hybridoma Bank	1:10
3CB2	Ratón IgM	3CB2	lowa Hybridoma Bank	1:10
BLBP	Conejo	ABN14	Chemicon	1:1000
GFAP	Conejo	G9269	Sigma-Aldrich	1:500
Cx43	Conejo		Donado por el Dr. J. C. Sáez, Departamento de Fisiología, Pontificia Universidad Católica de Chile	1:3000
PDGFRα	Conejo		Donado por el Dr. W. B. Stallcup, , Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, CA., USA	1:1000
NG2	Conejo		Donado por el Dr. W. B. Stallcup, , Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, CA., USA	1:1000
pericentrin	Conejo		Donado por el Dr. S. Doxsey, University of Massachusetts Medical School, USA	1:500
PCNA	Conejo	sc-7907	Santa Cruz Biotechnology	1:200
pH3	Conejo	sc-8656	Santa Cruz Biotechnology	1:200
P2X ₂	Conejo	APR-003	Alomone labs.	1:200
P2X ₇	Conejo	AB5246	Millipore	1:200

 Tabla 1: Lista de anticuerpos primarios utilizados.

Detección de la proliferación celular

Para detectar la proliferación celular se realizaron protocolos de inyección de BrdU (50-100 mg/kg i.p.). El BrdU es captado durante la fase S de la mitosis y es así un marcador de células que están proliferando y de su progenie. Posteriormente se realizó la detección del BrdU con el protocolo inmunohistoquímico ya descrito, con el agregado de un tratamiento con HCl 2N previo a la incubación con el anticuerpo anti-BrdU.

Electrofisiología

Obtención de rodajas de la médula espinal de rata

Se trabajó en un preparado "in vitro" de rodajas transversales de la médula espinal de ratas neonatales (P0-P5). La utilización de rodajas nos permitió un correcto abordaje de las células que rodean al CC ya que nos brindó un acceso directo a la visualización de dicha zona. Las ratas fueron anestesiadas (Isofluorano, Abbot), decapitadas y luego de una laminectomía ventral se disecó el ensanchamiento cervical de la médula espinal. A continuación, se obtuvieron rodajas transversales de 300 µm utilizando un vibrátomo (Microm HM650V). Todo este procedimiento se realizó utilizando una solución de Ringer extracelular mantenida a una temperatura cercana a los 4°C y de la siguiente composición (en mM): 101 NaCl, 3.8 KCl, 1.3 MgSO₄, 1.25 HEPES, 1.2 KH₂PO₄, 1 CaCl₂, 18.7 MgCl₂ y 25 glucosa. Además, durante todos los experimentos el Ringer fue burbujeado con carbógeno (O₂ 95%, CO₂ 5%). A medida que se obtuvieron los cortes, las rodajas fueron depositadas en otra solución de Ringer (en mM): 124 NaCl, 2.4 KCl, 1.3 MgSO₄, 1.25 HEPES, 1.2 KH₂PO₄, 2.4 CaCl₂, 26 NaHCO₃ y 10 glucosa, también burbujeado con carbógeno (pH= 7.4). Luego se dejaron las rodajas aproximadamente una hora a temperatura ambiente (20 a 25°C) para lograr la recuperación metabólica del tejido antes de comenzar con los registros.

Visualización de las rodajas

La visualización de las células en las rodajas se realizó con un microscopio Leica DM LFS utilizando contraste de interferencia diferencial (DIC) combinada con iluminación infrarroja. Las rodajas fueron colocadas en una cámara de registro y bañadas en solución de Ringer a una velocidad de 1 ml/min. Para su estabilidad mecánica, las rodajas fueron sujetadas con una pequeña herradura conteniendo dos microfibras de nylon paralelas de tal manera que la zona del CC quedase enmarcada entre las mismas. Una vez colocadas en posición, la región que rodea al CC fue localizada primero con un objetivo de 5X en tanto que las células individuales se identificaron con uno de inmersión en agua 40X (0.8 de apertura numérica). La imagen fue detectada con una cámara de video sensible a la luz infrarroja y visualizada en un monitor de video.

Obtención de registros de "patch" en modo "whole cell"

Para la obtención de los registros de "patch" se utilizaron pipetas de vidrio construidas a partir de tubos de borosilicato con un estirador horizontal programable (Sutter P-87). Para todos los experimentos, se utilizaron electrodos de baja resistencia (entre 5 y 10 M Ω). Las pipetas fueron llenadas por capilaridad con pequeñas cantidades de solución de patch compuesta por (en mM): 122 gluconato de K, 5 Na₂-ATP, 2.5 MgCl₂, 0.3 CaCl₂, 5.6 gluconato de Mg, 1 EGTA, 5 K-Hepes, 5 H-Hepes, 1 KOH, pH 7,4 y 10 biocitina para permitir una posterior identificación morfológica de la célula registrada. En la mayoría de los casos, se utilizó además un fluoróforo en la pipeta (Alexa Fluor 488 o 594) además de la biocitina. Los sellos obtenidos variaron entre 4 y 18 G Ω .

Los registros se realizaron con un amplificador Multiclamp 700B (Axon Instruments, Molecular Devices). Los protocolos de estimulación tanto en fijación de voltaje como de corriente fueron generados con el programa pClamp 10. La resistencia de acceso durante todo el proceso de obtención de los registros de patch fue monitorizada utilizando la rutina "membrane test" del pClamp 10. El pClamp 10 también nos permitió grabar las señales para su posterior análisis. El

potencial de unión fue calculado y corregido luego de los registros. Los resultados se expresan como los valores promedio ± el error estándar.

La caracterización fisiológica de la célula registrada se realizó utilizando la técnica de fijación de corriente. Esto implicó el estudio del potencial de reposo y de las respuestas a pulsos (500 ms) de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes. Estos mismos pulsos, alternados a diferentes potenciales de membrana (a través de una inyección de corriente continua) y con diferentes intensidades sirvieron para evaluar la posible presencia de distintas respuestas activas de membrana. En las células que generaron potenciales de acción, la duración media de la espiga fue medida a la mitad de la amplitud total de la misma.

La caracterización de las diferentes corrientes fue realizada en fijación de voltaje mediante la aplicación de protocolos de estimulación adecuados y usando bloqueadores selectivos para canales. Las corrientes de fuga fueron eliminadas usando el protocolo P-N4 con el programa pClamp 10. Analizamos la dependencia de voltaje de la activación de las corrientes de K⁺ calculando la conductancia (G) en función del potencial de membrana (V_m) utilizando la siguiente fórmula: G=I/(V_m-V_{reversión}), donde / fue el pico máximo de la corriente para cada V_m y V_{reversión} fue asumido como el potencial de reversión del K⁺ calculado con la Ecuación de Nernst (-102 mV). La dependencia de voltaje de la inactivación se caracterizó aplicando escalones de voltaje condicionantes partiendo de un potencial de mantenimiento de -70 mV hacia potenciales de -100 mV hasta 10 mV en pasos de 10 mV. Luego el potencial de membrana fue llevado a 30 mV y el pico máximo de la corriente observada fue medido, normalizado contra su máximo valor y graficado en función de los voltajes condicionantes. Tanto las curvas de activación como de inactivación fueron ajustadas a una relación de Boltzmann. El potencial de membrana de activación/inactivación media (V_h) fue obtenido de estos ajustes. La cinética de inactivación de las corrientes fue analizada ajustando una o más exponenciales con Clampfit. La densidad de corriente fue estimada mediante la división de la amplitud pico de la corriente sobre la capacidad de membrana de la célula. El

27

valor estadístico de los datos fue estimado aplicando métodos estadísticos noparamétricos.

Drogas

Las siguientes drogas o iones fueron adicionadas al Ringer en los diferentes experimentos: TTX (1 μ M; Alomone Labs) para el bloqueo de los canales de Na⁺, Mn²⁺ (3mM) para el bloqueo de los canales de Ca²⁺, Ni²⁺ (300 μ M) para el bloqueo de los canales de Ca²⁺ de tipo T, tetraetilamonio (TEA, 10 mM; Sigma-Aldrich) para el bloqueo de los canales de K⁺, 4-aminopiridina (4-AP, 1–2 mM; Sigma-Aldrich) para el bloqueo de los canales de K⁺ de tipo A, gabazina (10 μ M, Tocris) para el bloqueo de los receptores GABA_A, carbenoxolona (100 μ M, Sigma-Aldrich) bloqueante de uniones "gap", "brillant blue G" (BBG, 10 μ M, Sigma-Aldrich) antagonista de los receptores P2X₇, dantrolene (40 μ M, disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO, Tocris) como inhibidor de receptores de rianodina.

Identificación morfológica de las células registradas

Las imágenes de las células registradas visualizadas directamente en las rodajas por intermedio de la inyección del fluoróforo fueron adquiridas con una tarjeta de video (FG7, Scion Instruments, Frederick, MD). Para realizar el revelado de la biocitina, las rodajas fueron fijadas por inmersión en PAF al 4% en PB durante 12-24 horas. Luego de ser lavadas en PB durante toda una noche para remover el fijador, las rodajas fueron colocadas en seroalbumina 0.5% en PB durante 1 hora. Por último, se incubaron en una solución conteniendo Triton X-100 al 0.3 % y el complejo avidina-fluoróforo (avidina-Alexa 488 o 633) durante 2 horas. Una vez terminado el proceso, las rodajas fueron montadas en glicerol o PB y examinadas utilizando microscopia confocal.

Análisis inmunohistoquímico de las células registradas

En algunos casos, se realizaron experimentos de inmunohistoquímica para identificar el fenotipo molecular de las células registradas y reveladas con biocitina. Para esto se combinaron diferentes anticuerpos (Tabla 1) de diferentes huéspedes conjugados con diferentes fluoróforos. Los anticuerpos se

seleccionaron de acuerdo a las características fisiológicas y morfológicas de la célula registrada. El análisis de doble marcado se realizó utilizando la microscopía confocal.

Aplicación local de sustancias por presión

Las diferentes sustancias (GABA y ATP de Sigma-Aldrich) o agonistas GABAérgicos y purinégicos (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)ATP (BzATP) y 2-Methylthio-ADP, (2-MeS-ADP) de Tocris) utilizadas en los diferentes experimentos fueron diluidas en solución de Ringer y aplicadas por presión desde pipetas con una punta de 2 µm de diámetro utilizando un Picospritzer III (Parker Instrumentation) controlado por el pClamp 10. Las respuestas a la aplicación local fueron registradas a diferentes potenciales de mantenimiento. Se realizaron relaciones corriente-voltaje a partir de las medidas hechas para analizar el potencial de reversión de las respuestas. La aplicación por presión de Ringer sin sustancias se utilizó como control.

Obtención de registros de "patch" perforado

Para evitar cambios en la concentración de Cl⁻ intracelular ([Cl⁻]_i), se utilizó la técnica de registro de "patch" perforado utilizando gramicidina (Myers y Haydon, 1972, Kyrozis y Reichling, 1995). A la solución intrapipeta normal se le agregó gramicidina en una concentración final de 5 μ g/ml (solución madre de 5 mg/ml disuelta en DMSO). Cada solución fue utilizada hasta 2 horas luego de su preparación. Para facilitar la formación del sello y la posterior identificación de la célula registrada, la punta de la pipeta fue llenada con solución intrapipeta sin gramicidina que contenía Alexa 488 (250 μ m). Luego de terminado el experimento, rompimos mecánicamente la membrana aplicando succión para marcar la célula registrada con biocitina y/o fluoróforo. El potencial de unión fue corregido posteriormente en el análisis de los datos. De esta manera, se evaluó el potencial de reversión real de las respuestas al GABA.

Imagenología de Ca²⁺

Las células fueron llenadas a través de la pipeta de registro con el indicador de Ca^{2+} Fluo-4 (250 µM). En estos experimentos, se utilizaron soluciones intrapipetas sin EGTA y sin CaCl₂. Los videos fueron adquiridos a 2-4 Hz con una cámara de alta sensibilidad (EMCCD LucaR, Andor Technology) controlada por el programa Imaging Workbench 6.0 (INDEC BioSystems). Los cambios en la fluorescencia (Δ F/Fo) en las regiones de interés (ROIs) seleccionadas fueron analizadas con el mismo programa.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las médulas espinales se fijaron por perfusión intracardíaca con una mezcla de aldehídos que consiste en 4% de PAF y 2% glutaraldehido disuelto en PB. Luego fueron cortadas en porciones de 1 mm de espesor, se lavaron varias veces en el PB y se post-fijaron con OsO₄ (1% en PB). La deshidratación se llevó a cabo en una serie graduada de alcoholes y las piezas fueron finalmente incluidas en resina epóxica. Los cortes ultrafinos se montaron sobre rejillas de ranura (2x1mm) recubiertos con Formvar y contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las rodajas en las que se llevó a cabo la detección inmunohistoquímica de nestina o que contenían células registradas y llenadas con biocitina, se fijaron por inmersión en PAF al 4% y posteriormente fueron tratadas con 3,3'-diaminobencidina (DAB) y sulfato de níquel (para revelar la nestina o la biocitina). Los cortes se observaron en un microscopio de luz convencional para seleccionar las zonas de interés. Luego, se post-fijaron con OsO_4 (1% en PB), se deshidrataron e incluyeron para luego ser tratadas como ya fue mencionado. Los datos de MET fueron obtenidos por el Dr. Omar Trujillo-Cenóz.

Capitulo I

Neuronas inmaduras en contacto con el CC

Introducción

En los nichos neurogénicos del cerebro adulto de los mamíferos, nuevas neuronas son generadas a lo largo de toda la vida postnatal (ver Figuras 1 y 2). Durante su diferenciación, estas células expresan inicialmente moléculas típicas de neuroblastos migrantes (Kuhn y Peterson, 2008) como la doblecortina (DCX) y la molécula polisialilada de adhesión celular neural (PSA-NCAM) (Seki y Arai, 1993, Seri y col., 2004). A medida que se integran a los circuitos neuronales existentes, los neuroblastos dejan de expresar DCX y PSA-NCAM y comienzan a expresar marcadores moleculares de neuronas maduras como el antígeno nuclear neuronal (NeuN) (Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002). Al mismo tiempo, comienzan a mostrar propiedades electrofisiológicas de neuronas maduras (van Praag y col., 2002).

En la médula espinal de los mamíferos adultos persisten células ependimarias con capacidad proliferativa (ver Figura 3, Johansson y col, 1999; Meletis y col., 2008), pero su diferenciación hacia el linaje neuronal parece estar inhibida (Horner y col., 2000). Sin embargo, datos anatómicos (Vigh y Vigh-Teichmann, 1998) e inmunohistoquímicos (Alonso, 1999, Stoeckel y col., 2003) sugieren que hay células pertenecientes al linaje neuronal dentro del epéndimo, que expresan proteínas típicas de los neuroblastos en los nichos neurogénicos (Alonso, 1999; Stoeckel y col., 2003; Shechter y col., 2007). Estas células podrían ser similares a las neuronas inmaduras que contactan al CC en la tortuga (ver Figura 5, Russo y col., 2004). Sin embargo, las características electrofisiológicas de estas células son desconocidas.

Antecedentes específicos

Resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo mostraron que algunas células en el epéndimo de ratas neonatales fueron positivas para el marcador

neuronal temprano HuC/D (Figura 8 1,3, flechas). Sin embargo, estas células fueron negativas para marcadores de neuronas maduras como el NeuN (Figura 8 2,3). Las células HuC/D positivas resultaron negativas para un marcador típico de células ependimarias como el S100ß (Spassky y col., 2005) (Figura 9 1-3, puntas de flecha). Estos resultados sugieren que, a pesar de estar en la región ependimaria, estas células son de naturaleza diferente a la de la mayoría de las células que tapizan el CC.



Figura 8. Neuronas inmaduras en el CC. Células positivas para HuC/D (1 y 3, flechas) contactando el CC. Sin embargo, estas células no expresan el marcador de neurona madura NeuN (2 y 3). Las células que están por fuera del epéndimo sí expresan ambos marcadores (2 y 3, punta de flecha). Modificado de Marichal y col., 2009.



Figura 9. Neuronas inmaduras inmersas entre las células ependimarias. La mayoría de las células que tapizan el CC expresan el marcador de célula ependimaria S100ß (1 y 3). Sin embargo, algunos perfiles celulares negativos para este marcador (asteriscos en 1) expresan el marcador neuronal HuC/D (punta de flecha en 2 y 3). Modificado de Marichal y col., 2009.

La presencia de fenotipos moleculares de neuronas inmaduras en algunas células contactando al CC llevó a analizar la expresión de marcadores típicos de neuroblastos en los nichos neurogénicos como la DCX y el PSA-NCAM. Encontramos que la mayoría de las células que expresaron HuC/D en el CC coexpresaron DCX (104 de 105 células, 10 cortes, *n*=3 ratas) y PSA-NCAM (38 de 46 células analizadas, 10 cortes, *n*=3 ratas) (Figura 10 A, B y C).



Figura 10. Expresión de proteínas características de los neuroblastos de los nichos neurogénicos en las neuronas del CC. A, La mayoría de las células HuC/D positivas con un proceso apical hacia el lumen del CC (punta de flecha llena, 1) también co-expresan DCX (flechas llenas, 1-3). Algunas sólo expresaron HuC/D o muy poca DCX (punta de flecha vacía, 1-3) y otras sólo DCX (flecha vacía, 1-3). B, Las células HuC/D positivas también co-expresaron PSA-NCAM (1-3). Nótese la expresión característica del PSA-NCAM en la membrana de la célula (punta de flecha, 2-3). C, Además, las células DCX positivas también co-expresaron PSA-NCAM (1-3, flecha). Estas células también mostraron un robusto proceso apical hacia la luz del CC (punta de flecha, 1-3). Modificado de Marichal y col, 2009.

Teniendo en cuenta que estas células que contactan al CC expresaron marcadores moleculares similares a las de los neuroblastos en los nichos neurogenicos adultos (Lledo y col., 2006), nos planteamos la posibilidad de que fueran generadas luego del nacimiento. Para responder esta interrogante, invectamos BrdU (100 mg/kg, i.p. 1 invección diaria) en ratas durante los primeros 5 días de nacidas (9 ratas), dejando sobrevivir los animales diferentes tiempos luego de la última inyección (Figura 11 A). No encontramos colocalización entre el BrdU y distintos marcadores neuronales (DCX y HuC/D) que También expresan estas células (Figura 11 B). realizamos la inmunohistoguímica para el PCNA (proteína endógena expresada durante todas las fases del ciclo celular) y DCX, pero tampoco observamos células que fueran positivas para PCNA y DCX (Figura 11 C). Sin embargo, invectando BrdU durante el período embrionario en una amplia ventana temporal (desde el día 7 al 17 de la gestación, 4 ratas), hallamos co-localización entre marcadores neuronales y BrdU, lo que demuestra que estas células nacen durante la vida embrionaria (Figura 11 D y E).



Figura 11. Nacimiento de las neuronas inmaduras del CC I. A, Esquema del protocolo de inyecciones de BrdU (100 mg/kg, i.p. cada inyección) para analizar la generación post-natal de las neuronas en contacto con el CC. B, Inmunohistoquímica para HuC/D y BrdU en una rata P15. Aunque muchas células en el CC resultaron positivas para BrdU (punta de flecha) no encontramos co-localización con células HuC/D+ (flecha). C, Algunas células ependimarias fueron positivas para PCNA (flecha), pero no expresaron DCX (punta de flecha). D, Esquema del protocolo de invecciones de BrdU (100 mg/kg, i.p. cada inyección) para analizar la generación embrionaria de las neuronas en el CC. E, En ratas invectadas durante el periodo embrionario y sacrificadas entre P0-P5 se encontraron células HuC/D+ que incorporaron BrdU (flecha en panel principal). Modificado de Marichal y col., 2009.

Basándonos en estos datos, nuestra hipótesis de trabajo fue que algunas células que contactan al CC en la rata son similares a los neuroblastos de los nichos neurogénicos adultos.

Objetivo específico

Caracterizar las células que expresan propiedades neuronales en contacto con el CC de la médula espinal de ratas en los primeros días de vida post-natal (P0-P5).

Resultados

Propiedades funcionales de las neuronas del CC

Los datos inmunohistoquímicos obtenidos por nuestro grupo de trabajo sugirieron la presencia de células en contacto con el líquido cefalorraquídeo con características similares a las de los neuroblastos presentes en los nichos neurogénicos del cerebro (Lledo y col., 2006). Sin embargo, la expresión de marcadores como DCX y PSA-NCAM por si solos no implican que estas células sean de naturaleza neuronal ya que ocasionalmente han sido reportados en otros tipos celulares como progenitores y células gliales (Kuhn and Peterson, 2008). Teniendo en cuenta que los análisis funcionales han sido relevantes para el entendimiento de la naturaleza de las células en los nichos neurogénicos (van Praag y col., 2002), realizamos el análisis de los fenotipos electrofisiológicos de estas células en rodajas transversales de médula espinal.

Los resultados mostraron diferentes patrones de respuestas activas de estas células ante una despolarización sostenida, destacándose tres grandes fenotipos electrofisiológicos:

1) Una sub-población presentó resistencias de entradas altas (5.63 ± 0.87 G Ω , *n*=19), una respuesta activa lenta ante la inyección de corriente despolarizante (Figura 12 A1, punta de flecha) y mostró actividad sináptica espontánea (Figura 12 A1, flechas). Esta respuesta lenta se generó de un modo "todo-o-nada" ante la aplicación de un pulso corto de corriente despolarizante (Figura 12 A2) y también pudo ser desencadenada por una ráfaga de potenciales sinápticos (Figura 12 A3). Estás células presentaron un cuerpo celular redondeado con un proceso apical corto contactando el lumen del CC (Figura 12 A4). La respuesta lenta se mantuvo en presencia de TTX (1uM), pero fue bloqueada por Mn²⁺ (3
mM) demostrando que fue mediada por una conductancia de Ca²⁺ (Figura 12 B1,2). Sin embargo, un pequeño componente temprano de la respuesta (Figura 12 B1, flecha) fue bloqueado por TTX, lo que sugiere una pequeña contribución de canales de Na⁺ voltaje-dependientes en la primera parte de la misma. También observamos en estas mismas células la presencia de una despolarización lenta luego de la aplicación de un pulso hiperpolarizante (Figura 12, C1). Éste fenómeno es típico de una corriente generada por canales de Ca²⁺ de tipo T, los cuales se encuentran inactivados al potencial de reposo de la célula, se des-inactivan cuando la membrana es hiperpolarizada, para activarse seguidamente por una despolarización (Jhansen y Llinás, 1984). En efecto, la despolarización lenta no fue abolida por la aplicación de TTX pero fue bloqueada por Ni²⁺, el cual a bajas concentraciones afecta selectivamente a los canales de Ca²⁺ de tipo T (Russo y Hounsgaard, 1996) (Figura 12 C2).



Figura 12. Propiedades funcionales de las neuronas del CC: electrogénesis de Ca²⁺. A, Respuestas al pasaje de corriente en una célula en contacto con el CC (1). Un pulso despolarizante produce un potencial lento (1, punta de flecha). Nótese la presencia de actividad sináptica espontánea (1, flechas). El potencial lento puede ser generado por un pulso breve de corriente (2) o por un barrido de potenciales sinápticos espontáneos (3, flecha). La inyección de Alexa 488 en la célula registrada reveló que presenta un proceso apical único contactando al CC (4, flecha). B1-2, El potencial lento es resistente al TTX (1 µM), pero es bloqueado con Mn²⁺ (3 mM). C, Respuesta lenta inducida por una hiperpolarización transitoria (1). Esta respuesta presenta un umbral cercano a los -50 mV. Este efecto fue bloqueado con bajas concentraciones de Ni²⁺ (300 µM) y no con la aplicación de TTX (1 µM) (2). Modificado de Marichal y col., 2009.

2) Otra sub-población se caracterizó por presentar una espiga única rápida en respuesta a la inyección de pulsos despolarizantes (n=94, Figura 13, A1, B1). Por este motivo las llamamos células de descarga única. Presentaron además un potencial de membrana en reposo de alrededor de -60 mV (-61.4 ± 1.49 mV, n=85) y una resistencia de entrada promedio de 3.95 ± 0.29 GΩ (n=85). La amplitud de la espiga rápida fue de ~38 mV (38.27 ±1.52 mV, n=77) y presentó una duración aproximada de 6 ms (6.21 ± 0.55 ms, n=77). En algunos casos (49

de 94 células), un pulso corto de corriente despolarizante generó la descarga de una espiga rápida seguida de una despolarización lenta (Figura 13 A2) similar a la descrita en el grupo celular anterior. En otros casos, el mismo pulso corto generó una espiga con una rápida fase de repolarización (Figura 13 B2). Sin embargo, las espigas rápidas no presentaron una posterior hiperpolarización lenta, como se observa típicamente en neuronas espinales (Russo y Hounsgaard, 1999). En la mayoría de las células, la aplicación de un pulso de corriente despolarizante aplicado desde potenciales de membrana hiperpolarizados, generó una despolarización tardía que bloqueó la generación del potencial de acción (Figura 13 C). Esto sugiere la activación de un canal de K^+ de tipo A (I_A) (Connor y Stevens, 1971).

La espiga rápida fue bloqueada por la aplicación de TTX mostrando así que es mediada por canales de Na⁺ voltaje-dependientes (Figura 13 D1-2). La morfología de estas células mostró cierta variabilidad (Figura 13 A3, B3), pero básicamente presentaron un proceso apical contactando la luz del CC y procesos basales que variaron entre las células registradas (Figura 14). Combinando la inyección intracelular de biocitina con inmunohistoquímica, confirmamos que estas células de descarga única pertenecen a la población celular que expresan HuC/D (Figura 13, E1-3).



Figura 13. Células en contacto con el CC de descarga única. A, Respuesta de una célula en el epéndimo a una serie de pulsos de corriente. Un pulso de corriente despolarizante de 500 ms de duración aplicado al potencial de membrana en reposo produjo una pequeña espiga rápida seguida de oscilaciones del potencial de membrana (1). En esta célula, un pulso de corriente despolarizarte breve aplicado a un potencial de membrana hiperpolarizado generó una espiga única rápida seguida de una despolarización lenta (2). 3, Imagen de la célula a la que pertenecen los registros en 1 y 2. Nótese el cuerpo celular conectado al CC por un único proceso y varias neuritas cortas derivadas del polo basal. B. Célula de descarga única (1) con un potencial de acción con una fase de repolarización sin posterior hiperpolarización lenta (2). Esta célula presentó un pequeño cuerpo celular que contactó directamente con el lumen del CC y procesos muy cortos (3). C, respuesta al mismo pulso de corriente despolarizante aplicado a dos potenciales de membrana diferentes. La despolarización tardía generada cuando la célula se vio estimulada desde un potencial de membrana más hiperpolarizado bloqueó la generación del potencial de acción (trazado rojo). D. El potencial de acción (1) fue blogueado por 1 µM de TTX (2). E, Célula registrada de descarga única en contacto con el CC (1) que expresó el marcador HuC/D (2-3). Tomado de Marichal y col., 2009.



Figura 14. Diferentes morfologías de las neuronas en contacto con el CC. A, Neurona con un proceso apical pequeño en contacto con el CC y un único proceso basal que se ramifica. B, Célula con un proceso relativamente largo que proyecta hacia el CC y con un par de neuritas que proyectan desde el soma. C, Al igual que la célula en A, esta neurona presentó un proceso basal pequeño pero mostró finas neuritas proyectando en diferentes direcciones. D, Otra neurona que mostró un proceso apical largo. Luego del revelado de la biocitina, se observó que también presentaba finos procesos proyectando desde el soma (inserto). Tomado de Marichal y col., 2009.

3) Una última sub-población presentó la capacidad de generar una serie de potenciales de acción ante la aplicación de pulsos despolarizantes (Figura 15, A1, *n*=52), por lo que fueron denominadas como células de descarga repetitiva. Estás células presentaron un potencial de membrana en reposo cercano a los - 70 mV (-71.11 ± 2 mV, *n*=42) y una resistencia de entrada promedio de 4.25 ± 0.3 G Ω , que no fue significativamente distinta a la de las células de descarga única (p> 0.05, prueba U de Mann-Whitney). Sin embargo, la amplitud (56.38 ± 2.1 mV, *n*=46 mV) y la duración media (3.77 ± 0.35 ms, *n*=44) de la espiga fueron significativamente mayor y más breve respectivamente que en las células de descarga única (p< 0.05, prueba U de Mann-Whitney). La robustez en la descarga de estas células fue variable (Figura 15, A1 y D1). Algunas células

espiga fue creciendo considerablemente entre la primera espiga y las siguientes (Figura 15 A2) y no presentaron una posterior hiperpolarización lenta (Figura 15 A2). Otras células mostraron una descarga de potenciales de acción más uniformes en sus propiedades (Figura 15 D1) y con una posterior hiperpolarización lenta (Figura 15 D2, flecha). La adición de TTX bloqueó estos potenciales rápidos (Figura 15, C1-2) demostrando aquí también la mediación de la respuesta por canales de Na⁺ voltaje-dependientes. Una minoría de estas células (19 de 52) también mostró una pequeña despolarización lenta insensible a TTX (Figura 15 C2).

Las células dentro de esta sub-población presentaron un mayor desarrollo en su morfología (Figura 15, A3 y D3), principalmente en sus prolongaciones basales que generalmente tuvieron una extensión mayor a 30 µm (Figura 15 B). Sin embargo, también presentaron un proceso único apical bien desarrollado hacia la luz del CC (Figura 15, A3, D3 y E1). Pese a presentar fenotipos electrofisiológicos y morfologías más desarrolladas que las células de descarga única, no expresaron el marcador de neuronas maduras NeuN (Figura 15 E1-3). Todos estos fenotipos electrofisiológicos se encontraron en las diferentes edades dentro de la ventana temporal analizada (P0-P5), sugiriendo que no hay ninguna relación directa entre los fenotipos encontrados y las edades analizadas.



Figura 15. Células que contactan el CC con descarga repetitiva. A, Respuestas al pasaje de corriente en una célula en contacto con el CC capaz de generar potenciales de acción en forma repetitiva (1). Nótese la aparición de eventos sinápticos espontáneos. El primer (rojo), segundo (verde) y tercer (azul) potencial de acción durante el tren de descarga se muestran superpuestos en 2 (panel superior). Nótese el aumento en la duración media de la espiga. El potencial de acción producido por un pulso de corriente breve carece de una posterior hiperpolarización lenta (2, panel inferior). La célula mostró un proceso único que proyectó a la luz del CC terminando en forma de pie (3. circulo). Al observar a mayor aumento este pie terminal (3. inserto) se observa una prolongación más fina (probablemente un cilio, 3, flecha). B, Dibujo en cámara lucida de la célula registrada en A. Nótese la presencia de largas (> a 30 µm) prolongaciones nacientes desde el cuerpo celular. C, La aplicación de TTX (1 µM) bloqueó las espigas rápidas (1-2). Sin embargo, en algunas células una pequeña despolarización lenta se mantuvo (flecha en 2). D, Célula con descarga repetitiva (1) más robusta que la mostrada en A. El primer (rojo), segundo (verde) y tercer (azul) potencial de acción se muestran superpuestos en 2 (panel superior. En este caso, los cambios en la amplitud y duración fueron menores. El potencial de acción en esta célula mostró una posterior hiperpolarización lenta bien desarrollada (2, panel inferior flecha). Nótese que esta célula aunque se encontraba alejada del CC (3) presentó una larga prolongación apical que contacta con éste (flecha en 3). E, Ejemplo de otra célula (1, flecha) de descarga repetitiva (1, inserto, calibración: 20 mV, 10 pA y 100 ms) que sin embargo no expresó el marcador de neurona madura NeuN (2-3). Otras neuronas con sus núcleos positivos para NeuN aparecen por fuera de la región del CC (2-3, puntas de flechas). Modificado de Marichal y col., 2009.

Los datos obtenidos en fijación de corriente sugirieron que las neuronas en el CC se encuentran en diferentes estadios de diferenciación, similar a lo que ocurre durante el desarrollo neuronal en la médula espinal de *Xenopus* (Spitzer y col., 2000). Para entender los mecanismos que subyacen a la excitabilidad en las células de descarga única y repetitiva, realizamos la exploración de las bases iónicas de estos dos fenotipos electrofisiológicos. Para esto, en modo de fijación de voltaje se llevó a cabo un análisis de las corrientes de Na⁺ y K⁺ voltaje-dependientes. Los resultados mostraron que tanto las células de descarga única como repetitiva presentaron corrientes entrantes rápidas sensibles a TTX y corrientes saliente lentas ante la aplicación de la corriente de Na⁺ (I_{Na}) – estimada como pA/pF- en las células de descarga única fue significativamente inferior a la encontrada en las de descarga repetitiva (-22 ± 5.9 vs 53.9 ± 8.6 pA/pF, potencial de membrana = 0 mV, p< 0.05, prueba U de Mann-Whitney, *n*=7 células, Figura 16, B).



Figura 16. Corrientes de Na⁺ en las células de descarga única y repetitiva. A, Corrientes obtenidas en células de descarga única (1) y repetitiva (2) durante la aplicación de igual serie de escalones de voltaje despolarizantes. La corriente entrante rápida fue bloqueada con TTX (1 μ M) (esquina superior derecha en 1). B, Comparación de la densidad de I_{Na} en función del voltaje en células de descarga única y repetitiva. Modificado de Marichal y col., 2009.

Las corrientes salientes fueron analizadas utilizando diferentes protocolos de fijación de voltaje. En las células de descarga única, escalones de voltaje despolarizantes desde -90 mV revelaron una corriente con un componente de inactivación rápida y otro de inactivacion lenta (Figura 17, A1). Para separar estos componentes, aplicamos un protocolo similar al anterior pero partiendo desde -30 mV. En estas condiciones, sólo se observó una corriente que no

presentó inactivación durante los 100 ms que duró el escalón de voltaje, sugiriendo la participación de una corriente generada por canales de K^+ de rectificación retardada (I_{KD} , Hodgkin y Huxley, 1952) (Figura 17, A2). Sustrayendo esta I_{KD} de la corriente total aislamos el componente de inactivación rápida (Figura 17, A3). La inactivación de esta corriente presentó una gran dependencia al voltaje, una característica típica de las corrientes generadas por canales de K^{\dagger} de tipo A (Figura 17, B). La aplicación de los mismos protocolos en las células de descarga repetitiva mostró resultados similares (Figura 17, C y D). En ambos tipos celulares, la aplicación de TEA (10 mM) bloqueó la I_{KD}, mientras que el componente con inactivación fue bloqueado con 4-AP (2 mM), un bloqueante selectivo para los canales de K^{+} de tipo A (Figura 17, E). Siguiendo con este análisis, encontramos que la I_A difiere entre las células de descarga única y repetitiva. El tiempo de inactivación fue significativamente diferente (p< 0.01, U de Mann-Whitney, n=10) presentando una constante de tiempo (T) de 28.76 ± 2.3 ms en las células de descarga única y 12.7 ± 1.3 ms en las de descarga repetitiva (Figura 17, F1,2). La densidad de corriente de la I_A a diferentes potenciales de membrana fue significativamente mayor (105.8 ± 19.2 vs 40.2 ± 9.6 pA/pF, potencial de membrana = 40 mV, p< 0.05, prueba U de Mann-Whitney, n=6) en las células de descarga única (Figura 17, G). Sin embargo, las curvas de activación (Vh descarga única= 21.45 ± 1.3 mV, Vh descarga repetitiva= 26.67 ± 0.66 mV, *n*=6) e inactivación (Vh descarga única= -66.96 ± 1.52 mV, Vh descarga repetitiva= -65.7 ± 1.95 mV, n= 6) fueron similares (Figura 17 H). La densidad de corriente (Fig 17 I) y la curva de activación de la I_{KD} (Figura 17 J, Vh descarga única= 8.44 ± 0.86 mV, y Vh descarga repetitiva = 19.46 ± 1.74 , *n*=6) resultaron similares entre los dos grupos celulares.



Figura 17. Corrientes de K⁺ **en las células de descarga única y repetitiva.** A, Corrientes salientes obtenidas en una célula de descarga única en respuesta a escalones de voltaje despolarizantes de 10 mV, partiendo desde un potencial de membrana de -90 mV (1). 2, Corriente obtenida con un protocolo similar al anterior pero partiendo de -30 mV. Se observó solamente una corriente que no presentó inactivación (I_{KD}). 3, La diferencia entre 1 y 2 muestra una corriente con inactivación rápida (I_A). B, Protocolo que muestra la dependencia al voltaje de la inactivación de la I_A. C1-3 y D, Los mismos protocolos que A1-3 y B respectivamente, pero en una célula de descarga repetitiva. E, La I_A no es bloqueada con TEA (10 mM, 1-2) pero sí con 4-AP (2 mM, 3). F, Diferencias en el tiempo de inactivación de la I_A entre las células de descarga única (1) y repetitiva (2). Las curvas fueron ajustadas a una función exponencial de primer orden. G, Densidad de corriente de I_A en función del voltaje en células de descarga única (DU) y descarga repetitiva (DR). H, Curvas de activación e inactivación de I_A en los dos grupos celulares. I-J, Comparación de la densidad de I_{KD} (I) y curva de activación (J) en células de descarga única (DU) y repetitiva (DR). Modificado de Marichal y col., 2009.

Señalización GABAérgica en las neuronas en contacto con el CC

Durante el desarrollo embrionario, el GABA juega un rol fundamental como principal fuente de excitación para la maduración neuronal (Owens & Kriegstein, 2002). La despolarización mediada por GABA puede generar potenciales de acción y activar canales de Ca²⁺ (Owens y Kriegstein, 2002; Ben-Ari, 2002). El aumento del Ca²⁺ citosólico inducido por GABA sería la señal para la expresión de diferentes tipos de proteínas relacionadas con el proceso de maduración. Si las neuronas que contactan el CC se encuentran en diferentes estadios de diferenciación, la señalización GABAérgica podría tener efectos excitatorios sobre ellas. Por este motivo, analizamos las respuestas al GABA en estas neuronas mediante la aplicación local de este neurotransmisor. El GABA produjo corrientes que revirtieron cerca del potencial de equilibrio del Cl⁻ esperado (4 de 4 células, Figura 18 A1,2) teniendo en cuenta que la concentración de Cl⁻ intracelular ([Cl_i]) es impuesta por la solución intrapipeta. La adición de un antagonista específico para los receptores GABA_A (gabazina, 10 µM) bloqueó las corrientes producidas por GABA (3 de 3 células, Figura 18, A3). Para no alterar la [Cl_i] y revelar la verdadera naturaleza (excitatoria o inhibitoria) del GABA en las neuronas del CC, realizamos registros con la técnica de "patch perforado" con gramicidina. Este antibiótico genera poros en la membrana que son permeables sólo a cationes monovalentes y pequeñas moléculas sin carga, por lo que deja el Cl⁻ intracelular inalterado. De esta manera se evaluó el potencial de reversión real de las respuestas al GABA. En algunas células (6 de 12), el GABA presentó una acción inhibitoria generando una hiperpolarización de la membrana (Figura 18 B1-3). La corriente inducida mostró un potencial de reversión de entre -60 y -80 mV (-67.78 ± 3.32 mV, n=6). Para confirmar que efectivamente los registros fueron realizados en modo "patch perforado", excitamos el fluoroforo colocado en la pipeta y no observamos difusión del fluoróforo dentro de la célula registrada (Figura 18 B4 imagen superior). Una vez finalizado el registro, aplicando presión negativa rompimos el parche de membrana pasando a la configuración "whole-cell" convencional, observando el llenado de la célula con el fluoróforo y demostrando su contacto con el CC

(Figura 18 B4 imagen inferior). Sin embargo en otros casos (6 de 12), el GABA produjo una despolarización de la membrana que logró evocar la generación de un potencial de acción (2 de 6, Figura 18 C y D). En este grupo, el potencial de reversión de la corriente fue mucho más despolarizado y varió entre -43 y -55 mV (-46.7 \pm 1.9 mV, *n*=6). Estos experimentos demostraron que el GABA produce diferentes efectos sobre las neuronas que contactan al CC, apoyando la hipótesis de que se encuentran en diferentes estadios de maduración.



Figura 18. Respuesta al GABA en las neuronas inmaduras del CC. A, Respuestas a la aplicación (10 ms) de GABA (100 μ M) a diferentes potenciales de membrana en una neurona en contacto con el CC (1). En modo "whole cell" convencional, la corriente inducida por GABA revierte al potencial de equilibrio del Cl⁻ impuesto por la solución intrapipeta (2). La adición de gabazina (100 μ M), antagonista especifico de los receptores GABA_A bloqueó la respuesta (3). B, respuesta en fijación de corriente inducida por la misma aplicación de GABA en otra célula bajo condiciones de "patch perforado" (1). La corriente inducida (2) revierte a un potencial de -62 mV (3). La excitación del fluoróforo contenido en la pipeta de registro confirma la configuración de "patch perforado" ya que el mismo no pasa al interior de la célula (4, panel superior). Al final del registro, la ruptura del parche y el pasaje a la configuración "whole-cell" convencional (4, panel inferior) revela que la célula registrada presenta un proceso hacia el CC (4, flecha) y varias prolongaciones basales (4, punta de flecha). C, En algunas células, el GABA generó despolarización (1), revirtiendo la corriente subyacente a potenciales más despolarizados (2). D, En algunos casos la despolarización fue capaz de alcanzar el umbral de generación de un potencial de acción (1), revirtiendo a –43 mV (2). Modificado de Marichal y col. 2009.

Inmadurez en el CC en ratas juveniles

Colectivamente, estos resultados demuestran la presencia de neuronas inmaduras en el epéndimo de la médula espinal de ratas neonatales, probablemente en diferentes estadios de maduración. Es posible que a medida que el animal continúa con su desarrollo hacia el adulto, estás células adquieran un fenotípo molecular y funcional similar al de las neuronas maduras del resto de la médula. Para explorar esta posibilidad, realizamos registros de "patch" de estas células en ratas de 15 a 18 días de vida (P15-18), ya que durante las dos primeras semanas postnatales, los roedores presentan un rápida maduración de las neuronas espinales y los animales ya presentan patrones locomotores adultos (Vinay y col., 2000). Encontramos que aún en animales juveniles las neuronas que contactan al CC presentan fenotipos morfológicos y electrofisiológicos similares a los de neuronas inmaduras, siendo capaces de generar un único potencial de acción (n=4, Figura 19 A1-3) o una descarga repetitiva de potenciales de acción (n=3, datos no ilustrados) en respuesta a la inyección de pulsos despolarizantes. Además, las neuronas en contacto con el CC de ratas adultas siguen sin expresar NeuN, mientras que expresan marcadores de neuronas inmaduras como el PSA-NCAM (Figura 19 B-C). Estos datos sugieren que las neuronas que contactan al CC permanecen con fenotipos moleculares y funcionales de neuronas inmaduras, aún luego de las primeras etapas de la vida postnatal.



Figura 19. Neuronas inmaduras en el CC de animales juveniles. Α, Registro de una célula contactando al CC en una rata de 17 dias (P17). Nótese la generación de un único potencial de acción en respuesta a la inyección de un pulso de corriente despolarizante (1). Un pulso de corriente corto aplicado desde potenciales de membrana más hiperpolarizados genera una pequeña espiga rápida seguida de una respuesta lenta (2). Esta célula presentó una morfología similar a las registradas en animales neonatales con un

proceso único contactando al CC (3, flecha). B. Expresión de NeuN en una rata de 21 diás (P21). No se observan neuronas positivas en la región ependimaria. C, La expresión de PSA-NCAM persiste en células en contactacto con el CC aún en animales adultos de 40 días (P40).

Respuestas a cambios en el pH

Estudios previos han demostrado que las neuronas que contactan al CC expresan el canal iónico PKD2L1 (del ingles "polycystic kidney disease 2-like 1") que pertenece al conjunto de canales implicado en detectar cambios en el pH (Huang y col., 2006). Por lo tanto, evaluamos la hipótesis de que estas células cumplen un rol principalmente sensorial como "centinelas" de la concentración de H⁺ en el líquido cefalorraquídeo. Si esto fuese así, deberían responder con una sensibilidad diferencial a cambios en el pH. Para abordar este punto, realizamos la aplicación local por presión de una solución de Ringer extracelular amortiguada a un pH=6. Los resultados mostraron que se produce una fuerte excitación en las neuronas que contactan al CC generada por una corriente entrante con una duración de hasta 3 segundos (n=12, Figura 20 A). Sin embargo, cuando aplicamos el mismo protocolo en neuronas espinales maduras del asta ventral o dorsal se observó el mismo patrón de respuesta (Figura 20 B), por lo que la respuesta a los protones no parece ser distinta a las del resto de las neuronas espinales.



Figura 20. Respuestas a cambios en el pH en las neuronas inmaduras del CC. A, Registro de una célula de descarga única (1). La célula respondió con una robusta excitación a la aplicación local (100 ms) de Ringer amortiguado a pH=6 (2). 3, Corrientes inducidas por la aplicación de Ringer a pH=6. La inyeccion de Alexa 488 confirmó que esta celula contacta al CC (4). B, El mismo protocolo aplicado en una neurona con descarga repetitiva (1) ubicada lejos del CC (4) generó una respuesta (2-3) similar a la obtenida en A. Modificado de Marichal y col., 2009.

Nacimiento de las neuronas del CC

Dadas sus características de inmadurez en la vida post-natal, nos planteamos si estas neuronas podrían ser generadas durante una "ola" tardía de neurogénesis embrionaria. Para determinar el momento exacto de su nacimiento, inyectamos BrdU (2 dosis diarias, 50 mg/kg cada una, i.p) a ratas preñadas en diferentes tiempos durante la última etapa del desarrollo embrionario (E12, E14, E16, E18 y E20, Figura 21 A). Las crías de cada rata preñada inyectada con BrdU en los distintos tiempos fueron analizadas para la detección inmunohistoquímica de DCX y BrdU. Encontramos células DCX+/BrdU+ en el CC en todos los tiempos analizados a excepción de E20 (Figura 21 B-C). El número de células DCX+/BrdU+ encontradas en animales que recibieron BrdU en E12 (0.44 \pm 0.11 células/corte, 36 cortes, *n*=2 crías) fue menor que en los inyectados en E14, donde se dio el pico máximo (0.9 \pm 0.13 células/corte, 40 cortes, *n*=2 crías). El número de células decreció en animales inyectados en E16 (0.41 \pm 0.08 células/corte, 39 cortes, *n*=3 crías). Por lo tanto, estos datos sugieren que las

neuronas que contactan al CC son generadas en distintos momentos durante la última etapa del desarrollo embrionario.



Figura 21. Nacimiento de las neuronas que contactan el CC II. A, Esquema de los protocolos de inyección de BrdU utilizados para determinar el momento exacto del nacimiento de las neuronas que contactan el CC. B, Células DCX+/BrdU+ en el CC de una rata neonatal inyectada con BrdU en E12 (flecha en 1) y otra en E16 (flecha en 2). C, Número de células DCX+/BrdU+ por sección en el CC de ratas neonatales inyectadas en los distintos tiempos embrionarios (media ± SEM).

Discusión

Nuestros resultados demuestran que el epéndimo de la médula espinal de la rata presenta células con características moleculares y funcionales típicas de neuronas inmaduras, similares a las descritas en los neuroblastos de los nichos neurogénicos adultos (Lledo y col., 2006). Los diferentes fenotipos electrofisiológicos y los efectos del GABA encontrados en estas células sugieren que se encuentran en diversas etapas de diferenciación neuronal. Aunque son generadas durante el desarrollo embrionario, la expresión de PSA-NCAM y DCX sugiere que se mantienen como una población neuronal con una alta plasticidad estructural.

Neuronas inmaduras en contacto con el CC: ¿aprendiendo a disparar?

Los diversos fenotipos electrofisiológicos descritos en este estudio sugieren diferentes etapas de maduración neuronal, similares a la secuencia de desarrollo de las neuronas de la médula espinal en Xenopus (Spitzer y col., 2002). De hecho, el subgrupo de neuronas en contacto con el CC dominadas por una electrogénesis de Ca²⁺ se asemeja sorprendentemente a los primeros pasos de la diferenciación de las neuronas espinales de *Xenopus* que también generan potenciales de acción de Ca²⁺ de larga duración (Spitzer y Lamborghini, 1976). La electrogénesis de Ca²⁺ es crítica para la diferenciación de las diversas características neuronales tales como la expresión de los canales activados por voltaje, especificación del neurotransmisor y el crecimiento de las neuritas (Spitzer y col., 2004). Curiosamente, una espiga de bajo umbral similar a la que observamos en la primera subpoblación de neuronas que contactan el CC juega un papel importante en la diferenciación temprana durante la neurogénesis adulta mediante la amplificación de pequeñas despolarizaciones (Schmidt-Hieber y col., 2004).

Al igual que durante la diferenciación de las neuronas en Xenopus (Spitzer y Lamborghini, 1976), las neuronas en contacto con el CC podrían pasar de la generación de un potencial lento de Ca²⁺ a generar potenciales de acción rápidos dependientes de Na⁺, como las neuronas de descarga única. En etapas

más avanzadas de maduración, aparecería la capacidad de descargar potenciales de acción de forma repetitiva. Algunas de las células de descarga repetitiva mostraron una hiperpolarización lenta luego de la espiga que no se encontró en las células de descarga única. Durante el desarrollo embrionario de las neuronas espinales (Spitzer y col., 2000), la descarga repetitiva es causada por el desarrollo de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ que generan la posterior hiperpolarización lenta necesaria para des-inactivar los canales de Na⁺ (Russo y Hounsgaard, 1999).

La maduración en la configuración temporal de la descarga de espigas se implementa a través de la regulación de canales voltaje-dependientes en la membrana plasmática (Spitzer y Ribera, 1998). Un aumento en la densidad de canales de Na⁺ es una estrategia común durante la maduración de la excitabilidad en el embrión (Gao y Ziskind-Conhaim, 1998) y en los nichos neurogénicos adultos (Carleton y col., 2003). En nuestro estudio, las células con descarga repetitiva presentaron una mayor densidad en la I_{Na} en comparación con las células de descarga única. Esto concuerda con la hipótesis de que las neuronas de descarga única y repetitiva representan una secuencia de etapas de maduración.

La aparición de las conductancias de K⁺ en las neuronas espinales es importante para la maduración del potencial de acción y para adquirir la capacidad de descargar de manera repetitiva (Gao y Ziskind-Conhaim, 1998; Russo y Hounsgaard, 1999). Las neuronas en contacto con el CC mostraron tanto una I_{KD} como una I_A. La I_{KD} presentó propiedades similares en las células de descarga única y repetitiva, lo que concuerda con un desarrollo temprano de la I_{KD} durante la diferenciación neuronal (Spitzer y Ribera, 1998). Sin embargo, las células de descarga única mostraron una mayor densidad de la I_A, con una cinética de inactivación más lenta, activándose a potenciales sub-umbral y regulando así la generación de los potenciales de acción. La cinética de inactivación más lenta de la I_A en las células de descarga única implica una ventana temporal más amplia para el control de la excitabilidad. Esto puede ser una forma eficaz de regular la duración de la espiga de Ca²⁺ y por lo tanto

55

regulando la entrada de Ca²⁺ a partir del medio extracelular, un evento que como ya fue mencionado tiene un rol clave durante la diferenciación (Spitzer y col., 2004). La rápida cinética de inactivación de la I_A en las células de descarga repetitiva puede estar relacionada con la maduración de la forma del potencial de acción que es determinante para poder generar una descarga repetitiva (Connor y Stevens, 1971). De hecho, la primera corriente que expresan las neuronas recién nacidas de la ZSV es la I_{KD} , para luego comenzar a expresar una I_A cuando alcanzan el bulbo olfatorio (Belluzzi y col., 2003). En un paso final de maduración, estas neuronas olfatorias adquieren una I_A con un curso temporal de inactivación más rápido (Belluzzi y col., 2003). Por lo tanto, la maduración de las corrientes de K⁺ en las neuronas inmaduras que contactan al CC podría seguir el mismo plan de desarrollo que el de las neuronas en los nichos neurogénicos adultos.

Señalización GABAérgica en el CC

Nuestros resultados demuestran que las neuronas que contactan al CC presentan receptores GABA_A funcionales. La señalización GABAérgica juega un rol importante en el proceso de diferenciación neuronal (Owens y Kriegstein, 2002). En neuronas que se encuentran en desarrollo, el GABA actúa como un neurotransmisor excitatorio a causa de que las neuronas inmaduras presentan un potencial de reversión para el Cl⁻ despolarizado (-30 a -50 mV). Esto se debe a la expresión en la membrana de estas células inmaduras del co-transportador de Na⁺-K⁺-2Cl⁻ denominado NKCC1 (Ge y col., 2006), que es el responsable de generar una [Cl_i] elevada. A medida que las neuronas maduran, comienzan a expresar el co-transportador de K⁺-Cl⁻ denominado KCC2. Este co-transportador disminuye la [Cl_i] y genera el cambio en el efecto del GABA de la excitación a la inhibición (Owens y Kriegstein, 2002). Nuestros registros de "patch" perforado con gramicidina mostraron que el GABA generó desde una robusta excitación hasta una inhibición en las neuronas del CC. Esto sugiere que estas células presentan diferentes [Cl_i], probablemente debido a diferentes niveles de expresión de co-transportadores de Cl⁻ (por ejemplo el NKCC1) como se observa típicamente en neuroblastos en desarrollo (Tozuka y col., 2005). Esto apoya la hipótesis de que las neuronas en contacto con el CC se encuentran en diferentes etapas de maduración. De hecho, algunas neuronas del CC presentaron un potencial de reversión del Cl⁻ más despolarizado (ej, -46 mV) que el potencial de reposo. Las despolarizaciones inducidas por el GABA pueden ser suficientes para aumentar la concentración intracelular de Ca²⁺ por la activación de canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes (Yuste y Katz, 1991; Owens y col, 1996). Gran parte de las neuronas del CC con un fenotipo funcional inmaduro mostraron una robusta electrogénesis Ca²⁺ que de manera eficiente podría acoplarse con la señalización generada por el GABA para promover la maduración neuronal (Owens y Kriegstein, 2002). Además, en neuronas inmaduras corticales el aumento de Ca²⁺ inducido por GABA está mediado por canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes sensibles al Ni²⁺ (Fukuda y col., 1998), similares a los que observamos en algunas neuronas del CC.

Nacimiento tardío de las neuronas en contacto con el CC

Las similitudes de las propiedades moleculares y electrofisiológicas de las neuronas en contacto con el CC con la de los nichos neurogénicos en el cerebro adulto planteó la posibilidad de que puedan ser generadas luego del nacimiento. Shechter y col. (2007, 2010) reportaron la generación de nuevas células que expresan DCX en la médula espinal de ratones adultos en condiciones normales, que aumentaría ante la exposición a estímulos táctiles novedosos. Sin embargo, en nuestro trabajo no encontramos evidencias de la generación de neuronas postnatales en el CC. En lugar de ello, nuestro estudio demostró que estas células se originan en el embrión, concordando con estudios previos que mostraron que las células PSA-NCAM+ en el CC no co-localizan con BrdU inyectado en roedores adultos (Alonso, 1999; Stoeckel y col, 2003). Al igual que los datos recientemente publicados por Kútna y col. (2014), nuestros experimentos de BrdU muestran que estas neuronas son generadas en una "ola" tardía de neurogénesis embrionaria con un pico máximo de producción en E14.

embargo, Kútna y col. (2014) proponen que algunas neuronas podrían ser producidas incluso hasta E22. Esta diferencia con nuestros resultados podría deberse a los distintos protocolos de inyección de BrdU utilizados (2 vs 3 dosis diarias de 50 mg/kg). Por lo tanto, las diferentes etapas de maduración sugeridas por nuestro estudio podrían deberse a estos diferentes tiempos de nacimiento de estas neuronas. Otra posibilidad es que pese a nacer en distintos momentos, los diferentes fenotipos electrofisiológicos encontrados simplemente reflejen propiedades fisiológicas heterogéneas. De hecho, la heterogeneidad funcional en neuronas que contactan el líquido cefalorraquídeo parece extenderse a regiones más rostrales del SNC. En un reciente trabajo, Orts-Del'Immagine y col. (2012) reportaron contactando al CC en el núcleo dorsal del vago del tronco encefálico de ratones adultos, células con la capacidad de descargar de forma repetitiva y otras de descarga única (denominadas por estos autores de descarga tónica y descarga fásica respectivamente). Estas células también mantienen la expresión de marcadores de inmadurez como DCX y HuC/D (Orts-Del'Immagine y col., 2014). Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados en el CC espinal, no encontraron células con una electrogénesis de Ca²⁺ prominente y algunas expresaron una leve inmunorreactividad para NeuN (Orts-Del'Immagine y col., 2012, 2014). Es por esto que los autores proponen que estas neuronas se encuentran en un grado intermedio de maduración neuronal. Esta diferencia podría ser debido a las diferentes edades analizadas (ratas P0-P5 y P15-P18 vs ratones P56-P70), a una diferencia entre las especies o una diferencia regional entre la médula espinal y el tronco encefálico. La utilización de vectores retrovirales que permitan un seguimiento de estas células desde su nacimiento combinado con estudios funcionales ayudará a distinguir entre estas posibilidades.

Capitulo II

Organización funcional de los progenitores ependimarios

Introducción

Aunque la médula espinal en los mamíferos es considerada como una estructura no-neurogénica, la región que rodea al CC comparte características claves con nichos de células madre del cerebro (Hugnot y Franzen, 2011). Por ejemplo, en ratones las células que tapizan el CC expresan marcadores de células madre neurales como la nestina, GFAP o BLBP (Meletis y col., 2008, Petit y col., 2011) y mantienen capacidad proliferativa (Johansson y col., 1999, Horner y col., 2000). Además, los datos presentados en el capítulo anterior demuestran que algunas células en contacto con el CC de la rata presentaron características moleculares y funcionales de neuronas inmaduras, similares a las de los nichos neurogénicos adultos. En respuesta a una lesión de la médula espinal, las células ependimarias proliferan y migran hacia el sitio de la lesión para formar parte de la cicatriz glial, diferenciándose en astrocitos y oligodendrocitos mielinizantes (Mothe y Tator., 2005, Meletis y col., 2008). Sin embargo, algunos estudios en la médula espinal normal y en un modelo de esclerosis múltiple sugieren que las células ependimarias podrían generar neuronas (Ke y col., 2006, Danilov y col., 2006, Shechter y col., 2007). Los nichos de células madre en el cerebro adulto están formados por progenitores con propiedades heterogéneas que interactúan en una compleja organización tridimensional (Alvarez-Buylla y col., 2008). Durante el desarrollo embrionario de la médula espinal, los progenitores en el tubo neural se disponen dentro de diferentes dominios espaciales que generan determinados tipos de neuronas (Briscoe y col., 2000, Jessell y col., 2000). En los vertebrados inferiores, algunos de estos progenitores son retenidos luego del nacimiento. Por ejemplo en la tortuga, los progenitores neurogénicos se encuentran funcionalmente agrupados en los dominios laterales del CC (Russo y col., 2008). Sin embargo, se desconoce la complejidad funcional y la organización de los progenitores en la región ependimaria en la médula espinal de los mamíferos, considerada actualmente como un nicho de células madre latente.

Antecedentes específicos

Resultados de nuestro grupo de trabajo mostraron la expresión de algunas moléculas típicas de células madre neurales en el CC de ratas neonatales. Por ejemplo, la nestina se expresó en los polos dorsal y ventral del CC (Figura 22 A). En las partes laterales del epéndimo de ratas neonatales las células expresaron vimentina y 3CB2, extendiendo sus prolongaciones en forma radial (Figura 22 B y C). Aunque un subconjunto de progenitores en el embrión y en el cerebro adulto expresa GFAP y/o BLBP (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009, Campbell y Götz, 2002), no encontramos expresión de estos dos marcadores en células en contacto con el CC (Figura 22 D y E). En cambio, sólo encontramos células BLBP+ y GFAP+ por afuera de la región ependimaria (Figura 22 D y E). Las células BLBP positivas presentaron una morfología similar a la de células en migración (Figura 22 D, puntas de flecha), mientras que las células que expresaron GFAP mostraron la morfología típica de los astrocitos (Figura 22 E, puntas de flecha).



Figura 22. Progenitores en contacto con el CC: expresión de marcadores moleculares I. A. Expresión de nestina en el CC. B-C, Las células en las partes laterales del epéndimo expresaron vimentina (G) y 3CB2 (H), con prolongaciones en forma radial (puntas de flechas). I, el BLBP se expresó en células por fuera de la región del CC (puntas de flecha). J, no se detectaron células GFAP+ en la capa ependimaria, pero sí fueron marcadas células con la morfología típica de astrocitos por fuera de esta región (puntas de flecha). Modificado de Marichal y col., 2012.

La realización de inmunhohistoquímica para detectar proteínas endógenas del ciclo celular como el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, se expresa durante todas las fases del ciclo celular) y la fosfohistona H3 (pH3, expresada principalmente durante la fase M) (Kuhn y Peterson, 2008), reveló una gran cantidad de células que expresaron PCNA en su núcleo contactando el lumen del CC (Figura 23 A, C1 y D1 puntas de flecha). Estas células coexpresaron vimentina (Figura 23 A1-2) o 3CB2 (Figura 23 D). En los polos dorsales y ventrales del CC también se encontraron núcleos PCNA+ a diferentes distancias del CC (Figura 23 B, C y D flechas). Muchos de los núcleos PCNA+ en los polos correspondieron a células que co-expresaron nestina (Figura 23 B), vimentina (Figura 23 C) o 3CB2 (Figura 23 D). El análisis de la expresión de pH3 reveló que las células mitóticas parecen contactar el CC (Figura 23 E). En contraste con el PCNA, sólo se encontraron células pH3+/nestina+ en aposición al lumen del CC (Figura 23 F, flecha). Esto sugiere que, al igual que durante la embriogénesis (Sauer, 1935), la división celular ocurre cerca de la superficie del CC en contacto con el líquido cefalorraquídeo. Por lo tanto, la actividad proliferativa persiste en los diferentes progenitores en contacto con el CC durante los primeros días de vida post-natal.



Figura 23. Proliferación celular alrededor del CC. A, Núcleos PCNA+ alrededor del CC (1) rodeados por fibras vimentina+. La imagen a mayor aumento de la célula señalada con punta de flecha en 1 (2) muestra como el núcleo PCNA+ corresponde a una célula que expresa vimentina (punta de flecha). B, Núcleo PCNA+ (1, flecha) que corresponde a una célula que expresa nestina (2-3, flecha). Nótese la presencia de otros núcleos PCNA+ en los aspectos laterales del CC (1,3, puntas de flechas). C, Núcleo PCNA+ en uno de los polos alejado del lumen del CC (1, flecha) pertenece a una célula vimentina+ (2, flechas). Las puntas de flecha en 1 indican núcleos PCNA+ contactando el lumen. D, Núcleo PCNA+ en el polo ventral del CC y alejado del lumen (1, flecha) correspondiente a una célula 3CB2+. La punta de flecha señala un núcleo PCNA+ contactando el lumen del CC. 2, Imágenes ortogonales y a mayor aumento de la célula señalada con flecha en 1. E, Núcleos pH3+ (flechas) en los aspectos laterales del CC. F, Algunos de los núcleos pH3+ cercanos al lumen y en los polos del CC correspondieron a células nestina+ (flecha). Modificado de Marichal y col., 2012.

Basados en estos antecedentes, la hipótesis de trabajo que se aborda en este capítulo es que, al igual que en los vertebrados inferiores, el epéndimo de la médula espinal de la rata contiene células progenitoras funcionalmente agrupadas dentro de dominios específicos alrededor del CC durante la vida postnatal temprana.

Objetivo específico

Identificar y caracterizar las eventuales células progenitoras en el epéndimo de la médula espinal de ratas neonatas (P0-P5) en base a sus propiedades electrofisiológicas y la expresión de marcadores moleculares típicos de células madre neurales.

Resultados

Progenitores alrededor del CC: claves moleculares

Para identificar posibles células progenitoras y su distribución espacial dentro de la región ependimaria de la rata neonatal, profundizamos en el análisis de la expresión del filamento intermedio nestina (típico marcador de células neuroepiteliales, Frederiksen y McKay, 1998) en el CC. Al igual que en capítulo anterior, la mayoría de las células en contacto con el CC expresaron el marcador de células ependimarias S100ß (Figura 24 A). Sólo una región discreta confinada al polo dorsal del epéndimo no expresó esté marcador (Figura 24 A). Sin embargo, la nestina se expresó mayoritariamente en células con la morfología típica de la GR, con una prolongación que contacta al CC y otra que provecta hacia la periferia en los polos dorsal y ventral (Figura 24 B). A diferencia del polo ventral, las fibras nestina+ en el polo dorsal del CC no coexpresaron S100ß (Figura 24 C). Para analizar la posición de los cuerpos celulares de las células que expresaron nestina, utilizamos el marcador nuclear Syto 64. La mayoría de los cuerpos celulares correspondiente a fibras nestina+ se situaron lejos de la luz del CC (Figura 24 D y E puntas de flecha) con sólo unos pocos núcleos cerca de la misma (Figura 24 F, punta de flecha). También se encontró una débil expresión de nestina en algunos de los procesos radiales derivados de las células en las caras laterales del epéndimo (Figura 24 B1).



Figura 24. Progenitores en contacto con el CC con morfología de GR expresan nestina. A, La mayoría de las células alrededor del CC expresaron el marcador de células ependimarias S100ß, a excepción de una estrecha región en el polo dorsal (flecha). B, La expresión de nestina se observó principalmente en células con largos procesos radiales en la línea media dorsal y ventral, extendiéndose desde el lumen del CC (1) hasta la piamadre en el polo dorsal (2, punta de flecha) y ventral (3, punta de flecha). C, Las células nestina+ en el polo dorsal del CC no expresan S100ß. D-F, Localización de los núcleos (Syto64) pertenecientes a las células que expresaron nestina. Nótese que las células nestina+ presentan morfología de GR (puntas de flechas en E y F), con sus somas a diferentes distancias del lumen del CC. Modificado de Marichal y col., 2012.

Propiedades funcionales de los progenitores del CC

Los progenitores en el embrión (Noctor y col., 2002) y en el cerebro adulto (Liu y col., 2006, Filippov y col., 2003, Chittajallu y col., 2004) poseen diferentes propiedades electrofisiológicas. Para comprobar si las células progenitoras en diferentes regiones del epéndimo presentaban propiedades funcionales específicas, realizamos registros de "patch clamp" de las células del CC comenzando en los aspectos laterales (Figura 25 A). Encontramos células (*n*=36) que presentaron propiedades de membrana pasivas (Figura 25 B),

resistencias de entrada relativamente bajas (123.63 ± 24.44 M Ω , *n*=34; Figura 25 C), y potenciales de reposo hiperpolarizados (-84.35 ± 2.13 mV, n=36; Figura 25 C). El análisis morfológico reveló que el colorante inyectado en este tipo de células se propagó hacia otras adyacentes, formando grupos de células ependimarias que tapizan porciones sustanciales de los aspectos laterales del CC (Figura 25 D y F). La resistencia de entrada baja y el pasaje del colorante hacía otras células sugirieron que las mismas podrían estar acopladas a través de uniones de tipo "gap junctions" formadas por conexinas. Si esto fuera así, el bloqueo de estas uniones causaría un aislamiento de estas células y por lo tanto un aumento en su resistencia de entrada. De acuerdo con esta interpretación, la aplicación al baño de carbenoxolona (bloqueante de uniones "gap", 100 µM) aumentó significativamente la resistencia de entrada de las células acopladas por colorante (de 103.8 \pm 26.4 a 388.5 \pm 189.6 M Ω , p <0.05, Test de Wilcoxon para datos pareados, Figura 25 E). El tamaño de los grupos celulares varió desde grandes grupos de células que cubrieron la totalidad de la cara lateral del CC (Figura 25 F1) hasta pequeños conglomerados celulares cercanos a los polos ventral o dorsal (Figura 25 F2-4). Algunas de estas células acopladas presentaron procesos basales que se proyectaron hacia la línea media ventral o dorsal (Figura 25 F2-3, puntas de flecha) proyectando hacia la piamadre (Figura 25 F4, flecha).

Ocasionalmente, se registraron células desacopladas en los aspectos laterales del CC con un proceso proyectando hacia el parénquima (*n*=4, datos no mostrados).

Dado que los datos electrofisiológicos sugirieron la existencia de uniones de tipo "gap" entre las células acopladas, estudiamos la base molecular de este acoplamiento eléctrico. Aunque varios subtipos de conexinas se expresan en el cerebro en desarrollo, la Cx43 es la más abundante en la ZSV del prosencéfalo en desarrollo (Nadarajah y col., 1997). Por lo tanto, analizamos la expresión de esta conexina en el CC. La inmunohistoquímica para Cx43 reveló una alta densidad de "punctae" positivos al anticuerpo anti-Cx43 en los aspectos laterales (Figura 25 G, flecha). Sin embargo, en los polos dorsales y ventrales del

65

epéndimo no se observó expresión de Cx43. En base a estos resultados podemos concluir que en los aspectos laterales del CC de la rata, las células de estirpe no-neuronal presentan características morfológicas y electrofisiológicas descritas en ependimocitos y tanicitos (Bruni, 1998) funcionalmente acoplados por intermedio de uniones de tipo "gap junction".



Figura 25. Propiedades funcionales de los progenitores en los aspectos laterales del CC: acople eléctrico y respuestas pasivas. A, Visualización del CC y del electrodo de registro en una rodaja. B, Respuestas de una célula en contacto con el CC a una serie de escalones de voltaje (1). 2, Relación voltaje-corriente del registro en 1. Nótese que la membrana presentó una respuesta lineal frente a los cambios en el potencial de membrana. 3, Substracción de la corriente de pérdida del registro en 1. C, Distribución de las resistencias de entrada y los potenciales de reposo de las células con respuesta pasiva. D, La inyección de un fluoróforo a través de la pipeta reveló que la célula registrada se encontraba acoplada con otras células. E, La carbenoxolona (100 μ M) aumentó la resistencia de estas células por desacople. F, Las células ependimarias acopladas tapizan los aspectos laterales del CC (1) enviando algunas prolongaciones radiales hacia la pía (2-3, puntas de flechas). Estos procesos alcanzan la superficie pial (4, flecha). G, Expresión de conexina 43 (Cx43) en el CC de la rata neonatal. La expresión parece estar confinada principalmente a las regiones laterales (flecha). Modificado de Marichal y col., 2012.

Teniendo en cuenta que nuestros datos inmunohistoquímicos indican que las células en los polos dorsal y ventral del CC presentan fenotipos moleculares diferentes a los de los aspectos laterales, especulamos que también pudieran tener diferentes propiedades electrofisiológicas. Para analizar esto, realizamos registros de "patch clamp" en los polos del CC, donde las células presentaron la morfología típica de GR (Figura 26 B, C) y se encontraron desacopladas (n = 71). Las células en estas regiones mostraron potenciales de membrana en reposo fuertemente hiperpolarizados (-81.95 \pm 2.31 mV, n=47, Figura 26 A) y altas resistencias de entrada en comparación con las células en los aspectos laterales del CC (361.22 ± 56.29 M Ω , n=48, p <0.05, prueba U de Mann-Whitney; Figura 26 A). Algunas células mostraron un proceso apical relativamente grueso (Figura 26 B1, flecha) con abundantes protuberancias en forma de "dedos" (Figura 26 B2, puntas de flecha) y un proceso distal más delgado proyectando hacia la piamadre (Figura 26 B1, punta de flecha). Sin embargo, otras células mostraron procesos apicales y distales lisos (Figuras 26 C, flechas). Además, en línea con nuestros datos inmunohistoquimicos (Figura 24 E y F), los cuerpos celulares de estas células se encontraron a diferentes distancias del lumen del CC (Figura 26 D). Estas imágenes se asemejan a la morfología de las GRs durante el "movimiento nuclear intercinético" en el desarrollo embrionario (Noctor y col., 2001).



Figura 26. GRs en los polos del CC. A. Distribución de las resistencias de entrada (1) y los potenciales de membrana (2) de las células en los polos del CC. B. Típica GR registrada en el polo dorsal del CC, con un proceso grueso que contacta el lumen del CC (1, flecha) que mostró proyecciones laterales (2, puntas de flechas) y otra prolongación fina proyectando hacia la piamadre (1, punta de flecha). C, Otra GR presentó procesos lisos (flechas). D, Los cuerpos celulares en los polos del CC se encontraron a diferentes distancias del lumen (1-4). Modificado de Marichal y col., 2012.

A diferencia de lo observado en los aspectos laterales, las GRs situadas en los polos dorsal y ventral del CC presentaron un complejo repertorio de propiedades activas de membrana con diferentes corrientes entrantes y salientes. En algunas GRs (16 de 65, Tabla 2), la aplicación de escalones de voltaje despolarizantes generó una corriente saliente sin inactivación (Figura 27 A y B1-3). Esta corriente mostró un umbral de activación cercano a -40 mV con una Vh de 5.37 ± 1.77 mV (Figura 27 B2, C, D, n=10 células) y fue sensible a TEA (10 mM, Figura 27 E, 3 en 3 células), sugiriendo la activación de una I_{KD}. En otras GRs (25 de 65, Tabla 2), escalones despolarizantes de voltaje (desde un potencial de mantenimiento de -90 mV) evocaron corrientes salientes que presentaron tanto un componente sin inactivación como otro con inactivación dependiente del voltaje y el tiempo (Figura 27 F, G, H). Para separar estos componentes, se aplicó el mismo protocolo de estimulación, pero desde un potencial de mantenimiento más despolarizado (-30 mV) (Figura 27 G2). Bajo estas condiciones, sólo se observó una corriente saliente con un lento inicio y sin inactivación, lo que sugiere la activación en forma aislada de la I_{KD}. Mediante la sustracción de I_{KD} (Figura 27 G2) de la corriente total obtenida a potenciales de mantenimiento hiperpolarizados (-90 mV, Figura 27 G1), pudimos separar una corriente saliente con un inicio rápido y una prominente inactivación dependiente del voltaje y el tiempo (Figura 27 G1-2), lo que sugiere la presencia de una I_A (Connor y Stevens, 1971). De acuerdo con esta interpretación, TEA (10 mM) bloqueó el componente lento y sin inactivación de la corriente saliente total (Figura 27 H1, 2, 10 en 10 células) pero no afectó la corriente con inactivación, la cual fue abolida por el bloqueante selectivo para los canales de K^{+} de tipo A, 4-AP (2 mM; Figura 27 H3; 10 de 10 células). La I_A se activó transitoriamente a potenciales de membrana de aproximadamente -40 mV con un Vh de -5.79 ± 1.2 mV (Figura 27 I y J, *n*=7). Además de mostrar I_{KD} e I_A, otro subgrupo de GRs se caracterizó por la generación de una corriente de entrada lenta voltajedependiente (6 de 65 células; Tabla 2). Esta corriente lenta se generó mediante despolarizaciones relativamente moderadas (umbral de activación de aproximadamente -55 mV; Figura 28 A y B1) y se mantuvo en presencia tanto de TTX (1 μ M; datos no ilustrados) como de bloqueantes de canales de K⁺ (Figura 28 B2). Sin embargo, la corriente de entrada fue abolida por 3 mM de Mn²⁺ o cuando aplicamos una solución extracelular con baja concentración de Ca²⁺ (Figura 28 B3, *n*=7) sugiriendo ser una corriente mediada por canales de Ca²⁺ de bajo umbral (I_{Ca}). En condiciones de fijación de corriente, esta corriente entrante generó una espiga lenta de bajo umbral (Figura 28 C1), que como esperábamos fue reducida al aplicar una solución extracelular con bajo Ca²⁺ (Figura 28 C2). También encontramos GRs que mostraron I_{KD} e I_{Ca} pero sin I_A (10 de 65, datos no ilustrados) y otras que sólo tenían I_{Ca} (6 de 65, datos no ilustrados). Por último, se encontraron pocas células (2 de 65) que presentaron respuestas de membrana pasivas similares a las de los ependimocitos laterales. Todos estos fenotipos electrofisiológicos se observaron tanto en el polo ventral como dorsal del CC (Tabla 2), y en todos los animales dentro del rango de edades exploradas (P0-P5).



Figura 27. I_{KD} e I_A en las GRs de los polos del CC. A, GR contactando al polo ventral del CC. B, Respuestas de la célula en A frente a una serie de escalones de voltaje (1) y relación corriente-voltaje de la respuesta en 1 (2). La respuesta presentó una rectificación a partir de -40 mV. La substracción de la corriente de pérdida del registro en 1 (3) muestra la presencia de una corriente saliente voltaje-dependiente. C-D, Amplitud y curva de activación de la corriente generada en las células de los polos del CC. E, La corriente saliente relativamente lenta es sensible a TEA (10 mM) sugiriendo que es generada por canales de K⁺ de tipo rectificador retardado (I_{KD}). F, Ejemplo de otra GR registrada en el polo ventral del CC. G, Respuesta de la célula en F a una serie de escalones de voltaje pero con la aplicación de un pre-pulso a -90 mV (1) y respuesta al mismo protocolo que en 1 pero con un pre-pulso a -30 mV (2). La diferencia entre 1 y 2 es una corriente saliente de rápida inactivación (1-2). H, Esta corriente (1) persistió en presencia de TEA (10 mM, 2) pero fue bloqueada por 4-AP (2 mM, 3) sugiriendo que es mediada por canales de K⁺ de tipo A. I-J, Curvas de activación/inactivación (I) y de amplitud de corriente (J) de la I_A generada en las células de los polos del CC. Modificado de Marichal y col., 2012.


Figura 28. I_{Ca} en GRs de los polos del CC. A, GR en el rafe ventral. B, Respuestas de esta célula a una serie de pulsos de voltaje (1). Nótese la presencia de una corriente entrante de cinética lenta (flecha) en respuesta a una despolarización de la membrana. Esta corriente persiste en presencia de bloqueantes de canales de K⁺ (2). La remoción del Ca²⁺ extracelular eliminó la corriente entrante (3), sugiriendo que es mediada por canales de Ca²⁺. C, En modo de fijación de corriente, los pulsos despolarizantes aplicados a partir de un potencial de reposo hiperpolarizado (1) generaron una espiga lenta en algunas GRs. Esta espiga lenta (2, flecha) desapareció cuando se disminuyó el Ca²⁺ extracelular. Modificado de Marichal y col., 2012.

	I _{KD}	$I_{\text{KD}} + I_{\text{A}}$	$I_{KD} + I_A +$	I_{KD} +	I _{Ca}	Respuestas	Total
	(n)	(n)	$I_{Ca}(n)$	$I_{Ca}(n)$	(n)	pasivas (n)	(n)
Dorsal	30% (8)	48% (13)	4% (1)	7% (2)	11% (3)	-	27
Ventral	21% (8)	32% (12)	13% (5)	21% (8)	8% (3)	5% (2)	38
Total (n)	16	25	6	10	6	2	65

Tabla 2. Porcentaje de GRs que expresaron diferentes combinaciones de corrientes voltajedependientes en los polos dorsal y ventral del CC. Modificado de Marichal y col., 2012. Para identificar los fenotipos moleculares de las células registradas, combinamos el marcaje de las células con inmunohistoquímica para marcadores específicos de células progenitoras. Algunas GRs registradas en los polos del CC expresaron nestina (9 de 28 células, Figura 29 A, B).

Debido a que la presencia de I_{KD} e I_A se ha descrito en células progenitoras de oligodendrocitos (Chittajallu y col., 2004), especulamos que las GRs en los polos del CC podrían ser progenitores de oligodendrocitos en una etapa temprana de diferenciación. Para evaluar esta hipótesis, se realizó inmunocitoquímica para marcadores típicos de progenitores de oligodendrocitos tales como receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas α (PDGFR α) y el proteoglicano sulfato de condroitina NG2 (Nishiyama y col., 1996). Aunque encontramos abundantes células reactivas para PDGFR α y NG2, tanto en la sustancia gris como en la blanca, las células en contacto con el CC fueron negativas (Figura 29 C y D).

En conjunto, nuestros resultados demuestran que las propiedades electrofisiológicas específicas de los distintos progenitores definen diferentes dominios espaciales alrededor del CC. En los dominios laterales se encuentran "clusters" de células ependimarias con propiedades pasivas de membrana mientras que las GRs con corrientes voltaje-dependientes integran dominios que denominamos mediales. Los dominios definidos por las propiedades de membrana se correlacionan con la expresión de marcadores moleculares distintivos.



Figura 29. Caracterización inmunohistoquímica de las GRs registradas en los polos del CC. A, GR (1, flecha) registrada en el polo ventral del CC con procesos delgados (puntas de flecha). Esta célula expresó nestina (2-4, flechas). B, Algunas GRs de los polos del CC no expresaron nestina. La punta de flecha señala una célula nestina+ cercana. C, Las GRs del dominio medial fueron negativas para PDGFRa. Unas pocas células PDGFRa+ se encontraron cerca de la línea media pero sin una conexión con el CC (punta de flecha). D, Células que expresaron NG2 se observaron por fuera de la región ependimaria (puntas de flecha). Modificado de Marichal y col., 2012.

Ultraestructura de los progenitores en los dominios mediales del CC

Durante el desarrollo embrionario y en los nichos neurogénicos adultos, los progenitores tienen una ultraestructura característica con una pronunciada polaridad ápico-basal (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Un componente clave en esta polaridad es la presencia en el polo apical de un centrosoma, estructura capaz de regular el ciclo celular y la organización de los microtúbulos. Para analizar la presencia del centrosoma en las células de los dominios mediales del CC realizamos inmunohistoquímica para la detección de pericentrina, un componente clave del material pericentriolar. Encontramos que esta proteína se expresa en los polos apicales de las células nestina+ que contactan al CC (Figura 30 A). Esta localización específica en las GRs sugiere la proyección de un cilio hacia la luz del CC, como ocurre con los progenitores durante el desarrollo embrionario (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Para confirmarlo, realizamos un análisis utilizando MET del proceso apical de estas células. Estudios en cortes seriados revelaron que el proceso apical de los progenitores en los polos del CC presenta un único cilio (Figura 30 B y D). Algunos de los

cilios exhibieron una organización 9+0 de microtúbulos (Figura 30 C, punta de flecha en el recuadro), mientras que otros tuvieron una organización 9+2 (Figura 30 C, flecha en el recuadro, D, punta de flecha). Observamos que los procesos apicales de las células de la línea media exhibieron perfiles irregulares con proyecciones laterales (Figura 30 D). Estas imágenes se corresponden con la morfología de algunas de las células registradas en esta región (Figura 25 B). Posteriormente, extendimos nuestro análisis a los procesos distales de las GR dorsales (Figura 30 E, recuadro). Las secciones transversales a nivel del rafe dorsal mostraron una población compacta de perfiles circulares/ovalados (Figura 30 E). A pesar de las similitudes en la estructura fina, nuestros registros electrofisiológicos sugieren que las GRs en la línea media en realidad representan una población heterogénea. La inmunohistoquímica para nestina combinada con MET mostró que los procesos nestina+ que se encuentran en el rafe (Figura 30 F) se entremezclan con otros que carecen de expresión de nestina (Figura 30 G y H). En concordancia con estos resultados, algunos procesos en la línea media sólo expresaron 3CB2 (Figura 30 I, flecha en J), mientras que algunos fueron nestina+/3CB2- (Figura 30 I, asteriscos en J) y otros co-expresaron ambos marcadores (Figura 30 I, punta de flecha en J).



Figura 30. Ultraestructura de las células en contacto con el polo dorsal del epéndimo. A, Expresión de pericentrina en los procesos apicales (flecha) de las células nestina+ del polo dorsal del CC. B. Micrografía electrónica de los procesos apicales de las células en contacto con el polo dorsal del CC (inserto). Cada proceso presentó un cilio único (flechas). C, Vista longitudinal de uno de estos cilios (flecha). Algunos cilios exhibieron una organización de microtúbulos de 9+0 (inserto, punta de flecha), mientras que otros mostraron una estructura de 9+2 (inserto, flecha). D, Ejemplo de uno de los procesos apicales (sombreado en celeste) de las células de la línea media que mostró proyecciones laterales y lamelas (flechas). Nótese la presencia de un centríolo que podría representar un cuerpo basal de un cilio (punta de flecha). El inserto ilustra el nivel donde fueron obtenidas las secciones analizadas con MET. E, La MET de secciones transversales a nivel del rafe dorsal (inserto), mostró una población compacta de procesos circulares u ovales. F, Imagen de microscopía de luz de las células nestina+ reveladas con DAB en una sección coronal. G, Imagen de una sección longitudinal a nivel de la línea punteada marcada en la parte F. Los procesos nestina+ se entremezclan con otros procesos nestina- (puntas de flecha). H, Imagen de MET al nivel indicado en F. Se observa un precipitado denso a los electrones correspondiente al marcaje con DAB-osmio (b) en una fibra nestina+ y otro proceso cercano no marcado (a). I, Expresión de 3CB2 y nestina en la línea media dorsal. J, Magnificación del área marcada en I. Se observa la coexistencia de procesos nestina+ (asteriscos), 3CB2+ (flecha), y procesos que expresaron ambos marcadores (punta de flecha en el panel principal y vista ortogonal). Modificado de Marichal y col., 2012.

Proliferación diferencial en los distintos dominios del CC

Teniendo en cuenta que los progenitores alrededor del CC presentaron diferentes propiedades funcionales y moleculares, nos preguntamos si también tenían distinta actividad proliferativa. Para esto, comparamos la expresión de PCNA y pH3 entre los diferentes dominios del CC. Encontramos que en los dominios laterales del CC una gran cantidad de células expresaron PCNA en su núcleo (7.1 6 ± 0.79 células por corte, 30 cortes, *n*=3 ratas, Figura 31). En los dominios mediales del CC el número de núcleos PCNA+ fue significativamente menor comparado con los dominios laterales (3.6 ± 0.68 por corte, 30 cortes, *n*=3 ratas, p<0.05, prueba U de Mann-Whitney, Figura 31). Al igual que los resultados obtenidos con PCNA, se encontró un mayor número de células pH3+ en los aspectos laterales del CC (0.96 ± 0.33 vs. 0.131 ± 0.08 núcleos por corte, 29 cortes, *n*=3 ratas, p< 0.05, prueba U de Mann-Whitney; Figura 31). Si bien no sabemos si el número absoluto de células es similar entre los diferentes dominios, estos resultados indican que la mayor densidad de células proliferantes se encuentra en los dominios laterales.



Figura 31. Diferencias en el potencial de proliferación entre los dominios laterales y mediales del CC. A, Dibujo esquemático que muestra los límites de las regiones (verde: dominios mediales, rojo: dominios laterales del CC) en la que se contaron los núcleos PCNA+ y pH3+. B, Número de células PCNA+ y pH3+ por sección en los distintos dominios del CC (media ± SEM). Modificado de Marichal y col., 2012.

Progenitores en el CC juvenil y adulto

Finalmente, nos preguntamos si a medida que el animal se desarrolla, estos progenitores desaparecen o cambian sus propiedades y organización dentro de los dominios espaciales del CC. Para explorar esta posibilidad, realizamos registros en ratas de entre 15 y 21 días de edad (P15-P21, n=6 células). Encontramos que las células en contacto con los polos del epéndimo en ratas juveniles continúan desacopladas, con morfología de GR y con un fenotipo electrofisiológico complejo (Figura 32 A-D). Similar a lo descrito en los animales recién nacidos, las células en los aspectos laterales presentaron propiedades eléctricas pasivas y se encontraron acopladas formando grandes "clusters" celulares (Figura 32 E). Al igual que lo reportado en ratones (Meletis y col., 2008), la expresión de marcadores típicos de células progenitoras también se mantuvo en la médula espinal de ratas adultas (P40). La nestina predominó en las células en los polos del CC (Figura 32 F y G), mientras que 3CB2 se expresó en ambos polos y en los aspectos laterales del epéndimo (Figura 32 H). Por último, un número sustancial de células en los aspectos laterales fueron positivos para PCNA (Figura 32 I). Por lo tanto, los progenitores en el epéndimo de la rata adulta parecen mantener las propiedades básicas y la compartimentación observada en los recién nacidos.



Figura 32. Progenitores en el CC de ratas juveniles y adultas. A, GR registrada en el polo dorsal del CC en una rata de 15 días (P15). Esta célula presentó una morfología similar a las observadas en los neonatos, con un proceso apical grueso que llega hasta el lumen (flecha), un cuerpo celular redondo (punta de flecha vacía) y un proceso distal fino que provecta hacia la piamadre (punta de flecha). B. Corrientes voltaie-dependientes registradas en la célula de A. C. célula en el polo dorsal del CC de una rata de 20 días. La misma se encontró desacoplada y presentó un proceso corto contactando el lumen del CC (flecha) y un proceso basal fino (punta de flecha). D. Los cuerpos celulares de algunas GR en los polos del CC de ratas de 21 días fueron encontrados cerca del lumen. E, Célula registrada en la parte lateral del CC de una rata P20 que se encontró acoplada por colorante con las células vecinas. Nótese que el "cluster" celular se extendió hasta el inicio del polo dorsal (punta de flecha). Al igual que lo observado en neonatos, el "cluster" presentó propiedades pasivas de membrana (inserto). F, La inmunohistoquímica para nestina reveló células positivas radiales en los polos del CC aún en ratas de 40 días. G, La tinción con el marcador nuclear Syto mostró que las células nestina+ mantienen sus cuerpos celulares a diferentes distancias del lumen del CC (puntas de flechas). H, Las células 3CB2+ fueron observadas mayoritariamente en los dominios laterales del CC. I, Los núcleos PCNA+ aparecen contactando al CC en la rata P40. Modificado de Marichal y col., 2012.

Discusión

Los datos presentados en este capítulo demuestran que el epéndimo de la médula espinal de la rata presenta células progenitoras organizadas en diferentes dominios espaciales. Los "clusters" de células acopladas eléctricamente en los dominios laterales combinan características moleculares de ependimocitos y GRs (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Por su parte, los dominios mediales contienen células con las características típicas de las células madre neurales (Noctor y col., 2001) y propiedades electrofisiológicas complejas que podrían reflejar diferentes clases de progenitores o distintos estadios funcionales de un mismo progenitor. La diferencia en el potencial proliferativo entre los dominios laterales y mediales sugiere que representan una compartimentación funcional en este nicho de células madre latente.

Claves estructurales y moleculares de un nicho de células madres espinal

Estudios histológicos clásicos generaron el concepto del epéndimo de la médula espinal como una capa homogénea de células epiteliales (Peters y col., 1991, Del Bigio, 2010). Nuestros hallazgos en la rata y los de otros autores en ratones (Meletis y col., 2008, Sabourin y col., 2009, Hamilton y col., 2009, Petit y col., 2010) sugieren que la región que rodea al CC tiene una organización compleja con células progenitoras heterogéneas. Al igual que en el cerebro (Spassky y col., 2005), la mayoría de las células que recubren los aspectos laterales del CC expresaron el marcador de célula ependimaria S100ß. Algunas de estas células co-expresaron el marcador de GR 3CB2 o vimentina y mostraron un proceso basal que proyectó lejos del CC, lo que sugiere características morfológicas y moleculares de célula progenitora (Pinto y Götz, 2007). De hecho, muchas células S100ß+/3CB2+/vimentina+ expresaron PCNA, indicando que se encuentran dentro del ciclo mitótico. Sin embargo, pocas de estas células se encontraron realizando efectivamente la división, como lo indica la baja expresión de pH3 (Eisch y Mandyam, 2007). Esta proliferación sería comandada

por un subtipo de célula ependimaria biciliada y estaría correlacionado con el crecimiento postnatal de la médula espinal (Alfaro-Cervello y col., 2012).

La expresión de nestina, un marcador de células neuroepiteliales y GR (Pinto y Götz., 2007) define un segundo dominio de células heterogéneas en contacto con los polos del CC. En ratones adultos, la nestina se expresa preferentemente en las células en contacto con el polo dorsal del epéndimo (Hamilton y col., 2009). El hecho de que en esta misma región en humanos neonatales, las células también expresan nestina (Sakakibara y col., 2007), sugiere que este es un rasgo evolutivo conservado en las etapas tempranas del desarrollo postnatal. Los progenitores en los nichos neurogénicos adultos expresan GFAP además de nestina (Doetsch y col., 1999, Garcia y col., 2004). Sin embargo, no observamos inmunorreactividad para GFAP en el epéndimo de la rata neonatal. Este resultado es opuesto a lo reportado en ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor de GFAP. Estos ratones presentan células GFAP+ en el polo dorsal del CC (Sabourin y col., 2009, Fiorelli y col., 2013). La discrepancia con nuestros resultados puede deberse a la diferencia de especie y/o edad (neonato vs adulto) utilizados. Otra posibilidad es que en los animales transgénicos se exprese la proteína verde fluorescente en células en el CC que en realidad no expresan GFAP, pero tienen el promotor del gen activo. Las células en contacto con el polo ventral del CC expresaron el marcador de astrocitos y células ependimarias S100ß, pero este marcador no se expresó en una subpoblación de células del polo dorsal. Esto sugiere que las GRs en los dominios mediales puedan no ser idénticas en su potencial de linaje o en la capacidad proliferativa (Pinto y Götz, 2007). De hecho, los progenitores que generan neuroesferas en ratones adultos presumiblemente se localizan específicamente en el polo dorsal del CC (Sabourin y col., 2009), aunque su capacidad de auto-renovación parece ser restringida (Fiorelli y col., 2013). Alternativamente, las células nestina+/S100ß+ en el polo ventral podrían ser una etapa de transición entre GR y células ependimarias como se describe durante el desarrollo embrionario en el cerebro (Spassky y col., 2005). Al igual que las células madre neurales embrionarias y adultas (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009), las células vimentina+ y nestina+ de los polos del CC presentaron un fenotipo morfológico típico de GR con una pronunciada polaridad ápico-basal. Aunque sus cuerpos celulares se encontraron a diferentes distancias del lumen del CC, los centrosomas siempre se encontraron en el proceso apical. Además, nuestro análisis con microscopía electrónica mostró que algunos procesos apicales presentan un cilio único con una organización de microtúbulos de 9+0, una especialización estructural encontrada en las células madre neuronales (Alvarez-Buylla y col., 2001).

Los núcleos pH3+ pertenecientes a células nestina+ fueron encontrados siempre cerca de la luz del CC, mientras que los núcleos PCNA fueron encontrados a diferentes distancias. Esto apoya la posibilidad de que las GRs en la médula espinal durante la vida postnatal temprana realizan el proceso denominado "migración nuclear intercinética" (Sauer, 1935), donde los núcleos se encuentran en la fase S del ciclo celular a unos cuerpos de distancia del lumen del CC moviéndose apicalmente para dividirse. Esto es una propiedad característica de las células neuroepiteliales y de las GRs durante el desarrollo embrionario (Noctor y col., 2001, Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009) que parece ser retenida únicamente por los progenitores de los dominios mediales del CC. Este movimiento del cuerpo celular le permitiría a estas células estar bajo un mayor control de señales del entorno que podrían regular su proliferación (Del Bene y col., 2008). Una forma de poder confirmar este mecanismo de división en estas células sería con experimentos de invección de BrdU en animales neonatales y perfusión a tiempos cortos (30-60 minutos luego de la invección) con la posterior detección inmunohistoquímica de nestina y BrdU. De esta forma esperaríamos encontrar únicamente núcleos de las GRs que estén en la fase S del ciclo celular (y que incorporaron BrdU) alejados del lumen del CC. Otra posibilidad alternativa es que las células luego de dividirse cerca del lumen estén movilizándose a través del funículo dorsal y ventral, migrando desde el epéndimo hacia la periferia (Mladinic y col., 2014).

Diversidad funcional en los progenitores del CC

Los ependimocitos en los dominios laterales de la médula espinal de la rata neonatal mostraron propiedades electrofisiológicas similares a las de los progenitores durante el desarrollo cortical: resistencias de entrada bajas, respuestas pasivas al pasaje de la corriente, potenciales de membrana en reposo hiperpolarizados y extenso acoplamiento a través de Cx43 (Bittman y col., 2007, Noctor y col., 2002). Estas propiedades, junto con la expresión de marcadores típicos de GR dentro de los "clusters" celulares pueden indicar una relación de linaje entre las GR y las células ependimarias, como ocurre en la ZSV (Spassky y col., 2005). En contraste a esto, las GR en la línea media no se encontraron acopladas y por lo tanto parecen funcionar como unidades individuales. A diferencia de la GR neurogénica de la corteza en desarrollo (Noctor y col., 2002), la GR en la médula espinal postnatal presentó fenotipos electrofisiológicos complejos con diversas combinaciones de I_{KD}, I_A, y/o I_{Ca}. La presencia de I_{KD} es una característica común entre los progenitores adultos ya que se ha reportado en las células progenitoras del hipocampo que expresan nestina (Filippov y col., 2003) y en las células GFAP+ en la ZSV (Liu y col., 2006). La presencia de I_A se ha reportado en células madre humanas (Schaarschmidt y col., 2009) y en progenitores embrionarios (Smith y col., 2008) o neonatales (Stewart y col., 1999) de la ZSV. Sin embargo, no se encuentra en los progenitores de la ZSV del animal adulto (Liu y col., 2006). El fenotipo de GR de la línea media que presentó conspicuas I_{KD} y I_A es muy similar al de los progenitores de oligodendrocitos (Chittajallu y col., 2004). Esta similitud plantea la posibilidad de que estas GRs sean precursoras bipolares comprometidas con el linaje de los oligodendrocitos, siendo aún negativas para NG2 y PDGFRa (Levine y col., 2001). A favor de esta hipótesis, un reciente trabajo muestra evidencias inmunohistoquimicas de que el CC contribuye a la generación de oligodendrocitos durante el desarrollo postnatal y el adulto (Sevec y col., 2014). El complejo repertorio de corrientes de K^+ podría regular propiedades fundamentales de las células progenitoras ependimarias. En diversos progenitores gliales, los canales que generan la I_{KD} son importantes reguladores

de la proliferación celular (Ghiani y col., 1999, MacFarlane y Sontheimer, 2000, Chittajallu y col., 2002). Los canales de I_A son esenciales para la proliferación de células madre neurales humanas (Schaarschmidt y col., 2009). Esto sugiere que los canales de K⁺ en las GRs de la línea media podrían ser parte de los mecanismos epigenéticos que regulan su proliferación. Además, la I_A ha sido implicada en la diferenciación de precursores de oligodendrocitos (Sontheimer y col., 1989) y de astrocitos de la médula espinal de ratas (MacFarlane y col., 2000). Por lo tanto, otra posibilidad es que las corrientes de K⁺ participen en la transición de GR hacia fenotipos gliales postmitóticos espinales. Una minoría de las GR mostraron una I_{Ca} lo suficientemente robusta como para generar una espiga lenta de bajo umbral. Este fenotipo podría mantenerse en estas GRs desde las etapas embrionarias ya que ha sido descrito en algunas células de la placa del piso del tubo neural (Frischknecht y col., 1988). Sin embargo, la electrogénesis de Ca²⁺ juega un papel central en el desarrollo mediante el control de eventos de inducción neural (Webb y col., 2005) en diversos aspectos de la diferenciación neuronal (Spitzer y col., 2004). La generación de espigas de Ca2+ se observa durante las primeras etapas de la diferenciación de las neuronas espinales en embriones de Xenopus (Spitzer y Lamborghini, 1974) y en neuronas recién nacidas en el hipocampo adulto (Schmidt-Hieber y col., 2004). En las ratas, una subpoblación de las neuronas que contactan al CC y que expresan DCX tiene una robusta espiga lenta de bajo umbral (ver capítulo anterior). Por lo tanto, otra alternativa es que las GRs que presentaron I_{Ca} sean precursores que muestran los primeros signos de diferenciación hacia neuronas en contacto con el CC. Para abordar esta hipótesis, una posibilidad sería la realización de cultivos organotípicos de médula espinal. Este preparado nos permitiría infectar las células en los dominios mediales del CC con vectores lentivirales que expresen una proteína fluorescente y seguir el comportamiento de estas células en el tiempo. Una posterior caracterización inmunohistoquímica y electrofisiológica nos permitiría analizar si adquieren propiedades neuronales.

Capítulo III Señalización purinérgica en el CC

Introducción

Los datos expuestos en el capítulo anterior representan la primera evidencia que los progenitores en el CC de la médula espinal están organizados en diferentes dominios espaciales definidos por sus propiedades funcionales. En respuesta a la lesión, las células ependimarias son capaces de migrar hacia el sitio lesionado y diferenciarse mayoritariamente en astrocitos u oligodendrocitos (Meletis y col., 2008). Recientemente se ha demostrado que esta reacción es requerida para restringir la propagación secundaria de la lesión y disminuir la muerte axonal (Sabelström y col., 2013). Sin embargo, los mecanismos que regulan el comportamiento de los progenitores en el CC permanecen desconocidos.

La señalización mediada por ATP juega un rol importante tanto en el cerebro normal como patológico. Durante el desarrollo embrionario, la activación de receptores purinérgicos regula diversos procesos como la proliferación, migración, diferenciación de células progenitoras y la formación de sinapsis (Zimmermann, 2006). Por otra parte, una variedad de patologías del CNS conduce a una liberación masiva de ATP a partir de diferentes fuentes (Di Virgilio y col., 2009). Se ha propuesto que el ATP puede actuar como una "señal de peligro" difusible para alertar sobre los daños e iniciar la reparación (Surprenant y North, 2009). En la médula espinal, los niveles de ATP aumentan considerablemente alrededor del epicentro de una lesión traumática (Wang y col., 2004), activando el receptor ionotrópico P2X₇ y contribuyendo a la extensión del daño. Estos datos sugieren que la señalización mediada por ATP es candidata a actuar en la respuesta ante la lesión de las células del CC. Nuestra hipótesis de trabajo en este capítulo es que el ATP señaliza sobre los diferentes progenitores que contactan al CC, regulando sus propiedades.

Objetivo específico

Analizar la señalización purinérgica en el CC de la médula espinal de la rata neonatal como nicho putativo de células progenitoras.

Resultados

Respuestas al ATP en las neuronas del CC

Estudios inmunohistoquímicos y de microscopía electrónica han reportado la presencia del receptor ionotrópico purinérgico P2X₂ en las neuronas que contactan al CC en la médula espinal de la rata adulta (Stoeckel y col., 2003). Sin embargo, no se conoce si la activación por ATP de estos receptores es capaz de generar respuestas en estas células. Para evaluar esta posibilidad, realizamos registros de "patch clamp" combinados con la aplicación local de ATP sobre neuronas en contacto con el CC. Observamos que estas células respondieron a la aplicación de ATP (100 µM, 100 ms, n=3) con una robusta excitación generada por una corriente entrante (Figura 33 A1-3). La relación voltaje-corriente de la respuesta inducida por ATP mostró una rectificación con muy poca corriente fluyendo a potenciales despolarizados (Figura 33 A4), comportamiento típico de las corrientes generadas por receptores P2X₂ (North, 2002). Además, la inmunohistoquímica para detectar la presencia de estos receptores mostró expresión positiva en algunas células en contacto con el CC que presentaron la morfología típica de las neuronas inmaduras (Figura 33 B flechas).



Figura 33. Receptores P2X₂ en las neuronas del CC. A, Neurona en contacto con el CC de descarga repetitiva (1, inserto, escala: 20 mV, 10 pA y 100 ms) que mostró una robusta excitación ante la aplicación de ATP (100 μ M, 100 ms) (2). Las corrientes inducidas por el ATP (3) mostraron una marcada rectificación con muy poca corriente fluyendo a potenciales despolarizados (4). B, Inmunorreactividad para receptores P2X₂ en algunas de las células contactando al CC de una rata neonatal que presentan la morfología de las neuronas inmaduras (flechas). A, modificado de Marichal y col., 2009.

Respuestas al ATP en los progenitores del CC

Posteriormente, analizamos la respuesta al ATP en los diferentes progenitores del CC, comenzando por las GRs de los dominios mediales (Figura 34 A). En contraste con lo observado en las neuronas que contactan al CC, cuando aplicamos pulsos relativamente cortos (50-500 ms) de ATP a concentraciones elevadas (1 mM) no se detectaron corrientes en las GRs registradas (*n*=8 células). Pequeñas corrientes entrantes comenzaron a observarse a partir de aplicaciones de ATP por 1 s (4 de 7 células, 13.3 ± 2.62 pA a PM= -80 mV, *n*=3, Figura 34 B1). Estos datos sugirieron la presencia en estas células de una clase de receptor ionotrópico con una sensibilidad para la activación por ATP muy baja. Ésta es una de las características de los receptores ionotrópicos P2X₇ (Bianchi y col., 1999, North, 2002). Debido a que el BzATP es 10-30 veces más potente que el ATP para activar estos receptores (North, 2002), aplicamos localmente el BzATP a las GRs para tratar de comprobar la presencia de receptores funcionales en estas células. Encontramos que el BzATP (1 mM)

generó corrientes entrantes en la mayoría de las GRs (31 de 44 células, Figura 34 B2). Estas corrientes fueron más prominentes que las inducidas por concentraciones equimolares de ATP (67.97 ± 24.92 pA, *n*=9, Figura 34 B2). Las respuestas mostraron una latencia entre la aplicación del BzATP y el inicio de la corriente de aproximadamente 0.6 s (0.66 ± 0.060 s, *n*=31 células). Las corrientes inducidas por BzATP revirtieron a un potencial de membrana cercano a 0 mV (-1.54 ± 5.35 mV, *n*=6 células, Figura 34 C). Este valor corresponde al potencial de reversión esperado en nuestras condiciones de trabajo para una corriente catiónica no selectiva como la que generan los receptores P2X₇ (Bianchi y col., 1999). Las respuestas inducidas por BzATP fueron reducidas por la adición al baño de registro del antagonista de los receptores P2X₇ "brillant blue G" (BBG, 10 μ M, *n*=3, Figura 34 D).



Figura 34. Respuestas a agonistas purinérgicos en las GRs del CC. A, GR registrada en el polo ventral del CC. Se muestra la posición de la pipeta de aplicación de agonistas purinérgicos. B, Corrientes inducidas por la aplicación de 1 mM de ATP (1) con diferentes pulsos de 50 ms (celeste) 500 ms (verde) y 1 s (rojo) en una GR del CC. En la célula registrada en A, el BzATP (1 s, 1 mM) generó una corriente entrante mayor que la generada por el ATP aplicado por igual tiempo y a la misma concentración (2). C, Respuestas al BzATP (1) a diferentes potenciales de membrana en una GR. La curva relación corriente-voltaje (2) de las respuestas al BzATP de las GRs muestra que las respuestas revirtieron a un potencial de membrana despolarizado de ~0 mV. D, BBG (10 µM) redujo la corriente inducida por el BzATP.

En los dominios laterales del CC, la mayoría de los ependimocitos registrados también respondieron a la aplicación local de BzATP (1 mM, 10 de 13 células, Figura 35 A y B). Al igual que en las GRs, las corrientes entrantes fueron mayores cuando se aplicó BzATP en lugar de ATP (Figura 35 B) y revirtieron a potenciales de membrana cercanos a 0 mV (-2.56 \pm 7.26, *n*=5 células, Figura 35 C). La latencia entre la aplicación del BzATP y la iniciación de la corriente entrante fue de 0.54 \pm 0.14 s (*n*=10 células) similar a la registrada en las GRs de los dominios mediales.



Figura 35. Receptores P2X₇ funcionales en los dominios laterales del CC. A, Ependimocito registrado en uno de los dominios laterales del CC. B, Al igual que en las GRs de los dominios mediales, la aplicación de BzATP (1 mM) generó corrientes entrantes de mayor amplitud en estas células que concentraciones equimolares de ATP. C, Aplicación de BzATP a diferentes potenciales de membrana (1) y curva relación corriente-voltaje (2) de las respuestas al BzATP de los ependimocitos laterales.

Inmunohistoquímica para receptores P2X7 en la región ependimaria

Los datos electrofisiológicos sugieren que los diferentes progenitores del CC presentan receptores P2X₇ funcionales. Para detectar la localización de estos receptores dentro de la región ependimaria de la rata neonatal realizamos su detección inmunohistoquímica. Observamos la expresión de un marcaje punteado para el receptor P2X7 en células en contacto con el CC en los dominios laterales (Figura 36 A, puntas de flechas). Para probar si las GRs en los dominios de la línea media expresan este receptor, se combinó la detección de P2X₇ con nestina, un marcador expresado en las GRs del CC (Capitulo II, Hamilton y col., 2009, Petit y col., 2011). Encontramos un marcaje punteado para el receptor P2X₇ en algunas fibras nestina+ en el polo dorsal del CC (Figura 36 B1). Los planos ortogonales confirmaron la expresión de receptores P2X₇ en las células nestina+ (Figura 36 B2). En el polo ventral, la inmunorreactividad para receptores P2X₇ se observó en algunas de las células nestina+ que recubren el CC y en sus procesos (Figura 36 C). Estos datos indican que tanto en los dominios mediales y laterales, las células del CC expresan el receptor P2X7.



Figura 36. Inmunohistoquímica para los receptores P2X7 en el CC. A, Inmunorreactividad para receptores $P2X_7$ en las células que contactan el CC (puntas de flechas). B, Expresión de $P2X_7$ en las células nestina+ en el polo dorsal del CC (1, puntas de flecha). En 2 se observan los planos ortogonales de la región marcada con un círculo punteado en 1. Nótese la presencia de receptores $P2X_7$ rodeados de fibras nestina+ (2, flechas). C, Las células y procesos nestina+ en el polo ventral del CC también expresaron receptores $P2X_7$ (1-3, puntas de flechas).

Ondas de Ca²⁺ inducidas por activación de receptores P2X₇ en las GRs del CC

Una de las características de los receptores P2X₇ es que son altamente permeables al Ca²⁺ (Khakh y North, 2006). Por lo tanto, su activación podría estar implicada en la mediación intracelular de señales de Ca²⁺ en las GRs en contacto con los polos del CC. Para evaluar esta posibilidad, realizamos experimentos de imagenología de Ca²⁺ cargando las células con el indicador Fluo-4. Observamos que la aplicación de BzATP provocó ondas de Ca²⁺ en la mayoría de las GRs que contactan los polos del CC (23 de 36 células, Figura 37

A). Los videos en tiempo real mostraron que las ondas de Ca²⁺ viajaron a lo largo de toda la célula, a partir del sitio en que se aplicó el agonista (Figura 37 A y B). Cuando el BzATP se aplicó en el proceso apical de las GRs, la onda de Ca²⁺ se propagó en dirección al proceso distal de la célula (Figura 37 A y C). En cambio, cuando se aplicó el BzATP en el cuerpo celular, la onda generada se propagó tanto hacia el polo apical como hacia el proceso distal en contacto con la piamadre (Figura 37 B y D). El registro electrofisiológico simultáneo, reveló una corriente entrante que comenzó antes de la señal de Ca²⁺ (1.36 ± 0.45 s, *n*=6) con un curso temporal más rápido que el de la señal de Ca²⁺ (Figura 37 C y D). La velocidad media de propagación de estas ondas fue de 27.64 ± 1.23 µm/s (*n*= 4 células).



Figura 37. Ondas de Ca²⁺ en las GR del CC. A, GR en el polo dorsal del CC llenada con Fluo-4 antes (1), durante (2) y después de la aplicación (3-6) local de BzATP (1 s, 1 mM) a nivel del proceso apical que contacta al CC. La morfología de la célula luego de revelada la biocitina se observa en el inserto en 6. Las puntas de flecha indican la dirección de propagación de la onda de Ca²⁺ generada. B, Imágenes de la misma célula de A antes (1), durante (2) y después (3-6) de la aplicación de BzATP a nivel del cuerpo celular. Nótese que la dirección de propagación de la onda (puntas de flecha) es inversa que en A. C-D, Análisis de los cambios en la fluorescencia del Fluo4 en función del tiempo en las ROIs (círculos blancos) señaladas en A1 (C) y en B1 (D). La generación de las ondas de Ca²⁺ coincide con una corriente entrante registrada en la GR (trazado negro en C y D) durante la aplicación de BzATP.

Para determinar si las ondas de Ca^{2+} generadas por la activación de los receptores P2X₇ necesitan de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular para ser iniciadas, disminuimos la concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular (de 2.4 a 0.2 mM). En esta condición, las ondas de Ca^{2+} inducidas

por BzATP fueron atenuadas (*n*=4, Figura 38 A y B), aunque los receptores se mantienen funcionales ya que persiste la generación de una corriente entrante (Figura 38 B). Esto sugiere que el ingreso de Ca²⁺ extracelular a través de los receptores P2X₇ es requerido para la generación de la onda. Posteriormente, nos preguntamos cual sería el posible mecanismo que, luego del ingreso de Ca²⁺ extracelular inicial, permite la propagación de la onda de Ca²⁺. Dado que las mismas son capaces de recorrer largas distancias (como la longitud de los procesos de las GRs), pensamos que debería existir un mecanismo de amplificación de la onda. Esta amplificación podría surgir de la movilización de Ca²⁺ almacenado en el retículo endoplasmático hacia el citoplasma por intermedio de la activación de receptores P2X₇. Para analizar esta posibilidad, aplicamos el inhibidor de los receptores de rianodina dantrolene (40 µM) al baño de registro, el cual bloqueó la propagación de las ondas de Ca²⁺ producidas por la aplicación de BzATP (*n*=3, Figura 39).



Figura 38. El Ca²⁺ extracelular es necesario para la generación de una onda. A, GR en el polo ventral del CC llenada con Fluo-4. Se indica la posición de la pipeta de aplicación de BzATP (1 mM). B, Cambios en la fluorescencia del Fluo-4 en función del tiempo (1) en las ROIs marcadas en A (círculos blancos) y la corriente entrante generada (1, trazado negro). En Ringer con baja concentración de Ca²⁺ (0.2 mM, 2) la aplicación de BzATP no generó una onda de Ca²⁺ propagada (ROIs #2, 3, 4). Sin embargo, los receptores se mantienen funcionales ya que persiste la generación de una corriente entrante (2, trazado negro).



Figura 39. La propagación de la onda de Ca²⁺ depende de la liberación de Ca²⁺ intracelular. A, GR en el polo ventral del CC a la que también se le aplicó BzATP (1 mM) a nivel del soma celular. B, El análisis en los cambios en la fluorescencia del Fluo-4 en las ROIs señaladas en A (círculos blancos) reveló la generación de una onda de Ca²⁺ (1) que se propagó desde el lugar de aplicación del BzATP (#1) hacia el proceso distal (#2, 3, 4). B, La aplicación de dantrolene (40 µM) al baño de registro bloqueó la propagación de la onda de Ca²⁺ a través del proceso (2), pero no bloqueo el ingreso de Ca²⁺ en el sitio de aplicación de BzATP (#1).

Durante el desarrollo embrionario del cerebro, se generan ondas de Ca²⁺ en GRs inducidas mediante la activación de receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y₁ (Weissman y col., 2004). Por lo tanto, nos planteamos si la activación de los receptores P2Y₁ podía ser un componente de las ondas de Ca²⁺ generadas en las GRs del CC. Para evaluar esta posibilidad, aplicamos 2-MeS-ADP (1 mM), un agonista purinérgico que presenta una selectividad potente para receptores P2Y₁. En células que respondieron al BzATP con la generación de una onda de Ca²⁺, el 2-MeS-ADP no generó respuesta (*n*=2, Figura 40 A y B). Además, en contraste con el BzATP, nunca observamos corrientes entrantes luego de la aplicación de 2-MeS-ADP (*n*=10 células, datos no ilustrados) y no se observaron respuestas de Ca²⁺ en la mayoría de las GRs registradas en las que respondió al 2-MeS-ADP generando una onda de Ca²⁺ (Figura 40 C).



Figura 40. Respuestas al 2-Mes-ADP en las GR del CC. A, Secuencia temporal (1-3) de la respuesta de una GR llenada con Fluo-4 a la aplicación de BzATP a nivel del soma. El inserto en 3 muestra el proceso apical de la célula (punta de flecha) que contacta la luz del CC. El BzATP genera un aumento en la fluorescencia (4) en las ROIs señaladas en A1 (círculos blancos). B, Aplicación de 2-Mes-ADP (1 mM) en la misma célula que en A a nivel del soma (1-3). En este caso, este agonista de los receptores purinérgicos metabotrópicos no generó un aumento en la fluorescencia del Fluo-4 en las ROIs señaladas (B1, círculos blancos) (4). C1-4, GR en uno de los polos del CC en la que el 2-Mes-ADP generó una onda de Ca²⁺.

Compartimentos formados por endomembranas en las GR del CC como posibles reservorios del Ca²⁺ intracelular

La propagación de ondas de Ca²⁺ generada por la liberación desde reservorios intracelulares sugiere que las GRs de los polos del CC tienen compartimientos que actúan como reservorios de Ca²⁺ a lo largo de todo su citoplasma. Para identificar estos potenciales compartimientos, exploramos la estructura fina de las células en los polos dorsales y ventrales del CC combinando el marcado con biocitina de las células registradas con MET. Su identificación inequívoca utilizando microscopía de luz y MET fue posible luego del procesamiento adecuado con el complejo DAB-Ni (Figura 41 A y B). Esto posibilitó que las células registradas exhibieran un marcaje denso a los electrones y por tanto, visible por microscopía electrónica (Figura 41 B). La célula que se muestra en la Figura 40 A fue analizada en cortes ultrafinos realizados perpendicularmente al eje radial principal celular. Las secciones correspondientes a diferentes niveles (líneas de puntos 1 a 4 en la Figura 41 A) fueron examinadas con MET.

todos los niveles celulares (proceso distal, cuerpo celular y proceso apical), libres del precipitado denso a los electrones (Figura 41 B asteriscos y puntas de flechas). Imágenes de MET de médula espinal que fueron fijadas y tratadas con procedimientos que permitieron una mejor preservación citológica del tejido (ver métodos) también mostraron el mismo tipo de compartimentos de endomembranas en las células de los polos del CC (Figura 41 C, D y E, asteriscos).



Figura 41. Compartimentos formados por endomembranas en las GR del CC. A, GR registrada en uno de los polos del CC llenada con Alexa 488 (inserto) y biocitina que fue posteriormente revelada con el complejo DAB-Ni. B, El precipitado electrón-denso permitió la observación de esta GR a distintos niveles (marcados de 1 a 4 en A). Nótese en todos los niveles la presencia de un pronunciado sistema de compartimentos formados por endomembranas (asteriscos en 1, 2 y 4, y puntas de flecha en 3). C-E, Las imágenes de MET obtenidas de las células en los polos del CC a partir de material con una mejor preservación citológica mostraron la presencia de compartimentos de endomembranas similares a los ilustrados en B a nivel de la luz del CC (asteriscos en C), y en regiones más alejadas del rafe (asteriscos en D-E). El inserto en C muestra la presencia de un centríolo en esta célula.

Ondas de Ca²⁺ en los dominios laterales del CC

La aplicación de BzATP también generó aumentos marcados en la fluorescencia del Fluo-4 y una corriente entrante en las células ependimarias de los dominios laterales del CC (5 de 7 células, Figura 42 A y B). Cuando se aplicó BzATP a nivel del cuerpo celular, la señal de Ca²⁺ se propagó a lo largo del proceso basal de estas células (Figura 42 C y D). Estos datos demuestran la presencia de receptores P2X₇ funcionales en todas las células progenitoras que recubren al CC de la médula espinal de rata.



Figura 42. Señales de Ca²⁺ en los dominios laterales del CC. A, Ependimocito llenado con Fluo-4 en el dominio lateral del CC (inserto en 1) antes (1), durante (2,3) y después (4) de la aplicación local de BzATP (1 mM). B, Cambios de fluorescencia en la ROI señalada en B1 (circulo negro) y registro simultáneo de la corriente (trazado negro) generada por la aplicación del BzATP. C, Ependimocito lateral con un fino proceso apical al que se le aplicó BzATP al nivel del soma. D, Cambios de fluorescencia en las ROIs señaladas en C (círculos blancos). En esta célula, la onda de Ca²⁺ se propagó desde el soma hacia el proceso distal.

Discusión

Los datos presentados en este capítulo demuestran que las células en el epéndimo de la médula espinal de ratas neonatales presentan receptores funcionales que responden al ATP. Las neuronas en contacto con el CC tienen receptores ionotrópicos P2X₂ que generan una potente despolarización ante la aplicación de ATP. Por su parte, las células progenitoras de los diferentes dominios del CC tienen receptores ionotrópicos P2X₇ menos sensibles al ATP. Su activación genera corrientes entrantes y ondas de Ca²⁺ internas que viajan a lo largo del citoplasma. Esta señalización de Ca²⁺ intracelular desencadenada por la activación de los receptores P2X₇ podría ser uno de los mecanismos epigenéticos que regulan la biología de las células ependimarias.

Evidencias funcionales de los receptores P2X7 en la región del CC

En el SNC, la presencia del receptor P2X₇ se ha demostrado en diversas células incluyendo neuronas (Deuchars y col, 2001, Amadio y col, 2002; Cavaliere y col, 2004), astrocitos (Ballerini y col, 1996; Kukley y col., 2001), microglía (Ferrari y col., 1997), y precursores de oligodendrocitos (Wang y col., 2009). A pesar de cierta controversia sobre la utilización de los anticuerpos disponibles en la actualidad como herramienta para detectar receptores P2X7 en neuronas del cerebro (Sim y col, 2004), existe una fuerte evidencia farmacológica de que los receptores P2X7 neuronales influyen en la liberación de neurotransmisores y tienen efectos reguladores postsinápticos (Anderson y Nedergaard, 2006). Sin embargo, es escasa la información acerca de la presencia de receptores purinérgicos en las células ependimarias de la médula espinal, y el papel asociado de los nucleótidos extracelulares en el control de las funciones celulares ependimarias. En nuestro trabajo, encontramos evidencias convergentes que sugieren la presencia de receptores P2X7 en las células progenitoras del CC: 1) los datos inmunohistoguímicos indicaron reacciones positivas al anticuerpo P2X₇ en estas células. Este resultado es consistente con estudios anteriores que muestran que el ARN mensajero para la expresión de

P2X₇ se encuentra en las células ependimarias alrededor del CC en la rata adulta (Yu y col., 2008); 2) el BzATP fue mucho más potente que el ATP para generar respuestas, una característica distintiva de los receptores P2X7 (Anderson y Nedergaard, 2006; Bianchi y col, 1999; North y Surprenant, 2000); 3) el potencial de reversión cercano a 0 mV de la corriente inducida por el BZATP es una característica consistente con la apertura de los receptores ionotrópicos P2X (North, 2002); 4) el BBG, un antagonista comúnmente utilizado de los receptores P2X₇ (Evans y col., 1995; North y Surprenant, 2000) redujo las corrientes mediadas por BzATP. BBG no afecta a otros subtipos de receptores P2X a concentraciones nM (Jiang y col. 2000). A concentraciones más elevadas como las que se utilizó en nuestros experimentos (10 mM), los receptores P2X2 y P2X₄ podrían ser también inhibidos (Jiang y col., 2000, Anderson y Nedergaard, 2006). Sin embargo, nuestros resultados y los de otros (Stoeckel y col., 2003) muestran que en el epéndimo de la rata los receptores P2X₂ parecen estar presente específicamente en las neuronas que contactan al CC. Esto sugiere que los receptores P2X₂ no estarían involucrados en las respuestas observadas en los progenitores del CC. El ATP es 10 veces más potente para lograr la activación de los receptores $P2X_4$ que los receptores $P2X_7$ (Jiang y col., 2000). Si los receptores P2X₄ estuvieran presentes en las GRs en contacto con los polos del CC deberíamos haber observado una gran respuesta a la aplicación local del ATP, lo que no ocurrió. Por lo tanto, aunque no podemos excluir completamente la participación de los receptores P2X₄, nuestros resultados sugieren fuertemente que las corrientes mediadas por el BzATP en las células del CC fueron generadas por la activación de receptores P2X₇. Por otro lado, la activación de los receptores metabotrópicos P2Y por el agonista

específico 2-Mes-ADP fue mucho menos eficaz para generar respuestas de Ca²⁺ en las GRs del CC. Sin embargo, en 1 de 10 células encontramos que este agonista fue capaz de generar una onda de Ca²⁺. Esta característica refuerza la idea de que los progenitores en el dominio medial constituyen una población morfológica y funcionalmente heterogénea (Marichal y col., 2012). Similitudes y diferencias importantes se han reportado entre la zona ependimaria de la médula espinal y la zona subventricular del cerebro anterior de los mamíferos (Hamilton y col., 2009) y de otros vertebrados como los reptiles (Trujillo-Cenóz y col., 2014). Sin embargo, las células ependimarias de la médula espinal expresan receptores P2X₇, como sus homólogos en los ventrículos laterales del cerebro (Genzen y col., 2009). Estos datos sugieren una posible función relevante de esos receptores que parecen ser un rasgo conservado de las células ependimarias que recubren la mayor parte de las cavidades del SNC.

Ondas de Ca²⁺ en los progenitores del CC

Los progenitores en los diferentes dominios del CC tienen receptores ionotrópicos P2X₇ funcionales que cuando se activan generan un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Una característica general de las ondas de Ca²⁺ es que se propagan con una velocidad de aproximadamente 20 µm/s, pudiendo propagarse de célula a célula en un radio de 300-400 µm (Cornell-Bell y col., 1990). A pesar de que el abordaje experimental utilizado no nos permitió analizar la posible propagación intercelular, la velocidad de la onda dentro de las GRs individuales coincide con el valor de la velocidad media obtenida en nuestro estudio. Dado que los progenitores en los dominios laterales se encuentran acoplados (Capítulo II), es probable que las señales de Ca²⁺ puedan propagarse a células vecinas a través de uniones de tipo "gap junction". Una estrategia para confirmar esto sería aplicar Fluo-4-AM alrededor del CC. El Fluo-4-AM es captado por las células y en su interior la región AM es clivada, dejando libre a la sonda fluorescente. De esta forma podríamos tener un "cluster" de células llenas con el indicador de Ca²⁺ y aplicar ATP en una de ellas analizando lo que ocurre con la señal generada.

Nuestros experimentos sugieren que en las GRs el Ca²⁺ que ingresa al citosol desde el medio extracelular por activación de los receptores P2X₇ es el primer paso para la generación de la onda de Ca²⁺. Esto concuerda con que la corriente entrante registrada se inicie antes que la señal de Ca²⁺. El mecanismo de propagación sería la activación de canales de rianodina presentes en

102

compartimentos intracelulares que liberan Ca²⁺ almacenado. Este proceso ha sido llamado liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (Clapham, 1995, Berridge y col., 2000) y resulta válida la analogía con lo que se conoce como "efecto dominó" (Lino, 2010). Además, nuestras imágenes de MET mostraron gran cantidad de compartimentos formados por endomembranas distribuidas a lo largo de toda la GR como posibles candidatos para almacenar el Ca²⁺. Los receptores de rianodina han sido descritos en los procesos de progenitores de oligodendrocitos, donde su activación genera señales de Ca²⁺ (Haak y col., 2001). En estas células, existe un "diálogo" entre receptores de rianodina y receptores de inositol trifosfato. La participación de éste último en las ondas de Ca²⁺ observadas en los progenitores del CC es un hecho a confirmar en el futuro utilizando drogas selectivas para estos receptores.

Rol de la señalización purinérgica en el CC

La sensibilidad al ATP encontrada en los receptores P2X₂ de las neuronas del CC sugiere que pueden responder ante pequeños cambios en la concentración de ATP extracelular y ser activados en condiciones fisiológicas. El ATP podría ser una señal que genere la liberación de sustancias al líquido cefalorraquídeo en estas células. Sin embargo, en el tronco encefálico de ratones adultos estas neuronas no parecen responder al ATP (Orts-Del'Immagine y col., 2012). Esto sería una diferencia funcional regional entre estas neuronas, sin descartar que pueda deberse a la diferencia en especies y/o edades analizadas.

La importancia biológica de la señalización de Ca^{2+} generada por la activación de los receptores P2X₇ en las células progenitoras ependimarias es intrigante. Las señales de Ca^{2+} están involucradas en funciones celulares relevantes, como por ejemplo la diferenciación neuronal (Spitzer y col., 2004). La activación de los receptores purinérgicos y los fenómenos desencadenantes podrían ser una causa o una consecuencia de la activación glial luego de un daño producido en el SNC y pueden estar relacionados con efectos perjudiciales o beneficiosos (Franke y col., 2006). La activación producida por altas concentraciones de ATP de los receptores P2X₇ en los progenitores del CC sugiere que estos receptores

son ideales para activarse exclusivamente en condiciones extremas. Se ha demostrado que después de una lesión en la médula espinal, la concentración de ATP aumenta notablemente alrededor del epicentro de la lesión (Wang y col., 2004). Es tentador especular que este aumento podría desencadenar señales de Ca²⁺ mediadas por los receptores P2X₇ en las GRs en contacto con el CC y propagarse a toda la célula. Estos transitorios intracelulares de Ca²⁺ podrían inducir la expresión génica nuclear, por la activación de quinasas o fosfatasas, que a su vez, serían capaces de activar factores de transcripción específicos relacionados con determinadas funciones (Glaser y col., 2013). La modulación de la expresión génica podría estar directamente relacionada con la proliferación celular, la diferenciación y la migración desencadenada en estas células luego de una lesión (Meletis y col., 2008). Además, las ondas de Ca²⁺ invaden el polo apical de las GRs pudiendo generar cambios en este compartimento celular (ej. reabsorción de cilios, Goto y col., 2013) que se postula como crítico para la regulación del comportamiento de las células madre (Götz y Huttner, 2005). Esta hipótesis, basada en los datos presentados en este capítulo, se resume en la Figura 43. Otra posibilidad es que las corrientes entrantes generados por el BZATP provoguen efectos perjudiciales en las células progenitoras del CC, al igual que ha sido reportado en otras células gliales (Matute y col., 2007, Wang y col., 2009), en células precursoras neurales embrionarias (Delarrasse y col., 2009) y en células progenitoras neurales de la zona subventricular del ratón adulto (Messemer y col., 2013).



Figura 43. Esquema basado en nuestros resultados que plantea la hipótesis de la señalización purinérgica mediada por la activación de los receptores P2X₇ como señal activadora de la respuesta de los progenitores del CC ante una lesión en la médula espinal.

Conclusiones y perspectivas

Los resultados obtenidos en esta Tesis han confirmado nuestra hipótesis de trabajo que planteó la existencia en el CC de la médula espinal de la rata, de células con características de progenitores y células similares a los neuroblastos de los nichos neurogénicos. Además, nuestro estudio ha revelado una inesperada heterogeneidad funcional con una organización de los progenitores en dominios espaciales. Finalmente, hemos demostrado una importante señalización purinérgica en el CC. La activación de receptores P2X₇ genera ondas de Ca²⁺ con el potencial de cambiar las propiedades de los progenitores. Estos resultados podrían tener implicancias directas en la respuesta frente a una lesión de este nicho de células madre endógeno de la médula espinal.

¿Neuronas inmaduras en "modo de espera"?

En la médula espinal de la tortuga, una subpoblación de células en contacto con el CC presenta propiedades moleculares y fenotipos electrofisiológicos similares a los neuroblastos inmersos en un nicho de progenitores neurales (Russo y col., 2004, 2008). De manera similar, en el epéndimo de la rata demostramos que una subpoblación celular expresa el marcador neuronal temprano HuC/D pero no el marcador de neurona madura NeuN. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que muestran que algunas células del CC en ratas adultas expresan PSA-NCAM (Alonso, 1999, Stoeckel y col., 2003). Aunque algunas células no neuronales pueden llegar a expresar los marcadores utilizados en este estudio (Bonfanti, 2006, Kuhn y Peterson, 2008), nuestros registros de "patch-clamp" confirmaron que esta subpoblación de células en el epéndimo pertenece al linaje neuronal. La relevancia funcional de estas neuronas es desconocida. Una posibilidad es que sean células sensoriales peculiares que actúen como "sensores" de la composición del líquido cefaloraquídeo (Vigh y Vigh-Teichmann, 1998). En efecto, estas células expresan el canal PKD2L1 (Huang y col., 2006) que es sensible a cambios en el pH y demostramos que responden vigorosamente al ATP. Al igual que lo reportado por Huang y col.

(2006), encontramos que las neuronas en contacto con el CC fueron fuertemente excitadas por una caída en el pH. Sin embargo, el hecho de que las neuronas que se encuentran por fuera del CC también responden vigorosamente a los cambios de pH sugiere que la detección de protones es una función general de las neuronas espinales (Baron y col., 2008) y no una característica distintiva de las neuronas que contactan el CC. Los diferentes fenotipos electrofisiológicos encontrados, similares a los descritos durante el proceso de diferenciación neuronal en embriones de Xenopus (Spitzer y col., 2000) y durante la neurogénesis adulta (Espósito y col., 2005), sugiere que estas células se encuentran en diversas etapas de diferenciación neuronal. En ambos casos, la diferenciación de la excitabilidad comienza por la electrogénesis de Ca²⁺ (O'Dowd y col., 1988, Spitzer y col., 2000). Por lo tanto, las neuronas en el CC dominadas por una espiga de Ca²⁺ podrían ser las más inmaduras. La generación de potenciales de acción rápidos dependientes de Na⁺ como muestran las neuronas de descarga única y las de descarga repetitiva serían la siguiente secuencia de etapas de maduración. El efecto despolarizante del GABA en algunas de las neuronas en contacto con el CC (al igual que en neuronas inmaduras) e hiperpolarizante en otras (como en neuronas maduras) apoya esta hipótesis. Aunque son generadas durante el desarrollo embrionario, las neuronas que contactan al CC mantienen la expresión de PSA-NCAM y DCX incluso en ratas adultas (Stoeckel y col., 2003; Shechter y col., 2007). De manera similar, en el paleocortex de la rata adulta una población de neuronas generadas pre-natalmente también expresan PSA-NCAM y DCX pero no marcadores de neuronas maduras (Gómez-Climent y col., 2008, 2010). Dado que el PSA-NCAM y la DCX están involucrados en eventos relacionados con la plasticidad como la migración celular, el crecimiento de neuritas y la regeneración (Couillard-Despres y col., 2005; Bonfanti, 2006), la región del CC podría retener un grado sustancial de plasticidad similar a la de los nichos neurogénicos (Ming y Song, 2005). En un modelo experimental de esclerosis múltiple, Danilov y col. (2006) sugieren que algunas de las células que migran son neuronas. Por lo tanto, es tentador especular que el epéndimo de la médula espinal de ratas representa un reservorio de neuronas inmaduras en "modo de espera", que bajo circunstancias particulares como una lesión traumática o la inflamación podrían reanudar su diferenciación para incorporarse a los circuitos espinales dañados. El permanecer en "modo de espera" durante prolongados períodos de tiempo podría serle útil a estas neuronas para mantener cierta plasticidad mientras realizan una función particular (Kempermann, 2012). Estudios en diferentes modelos de lesión espinal utilizando animales transgénicos que permitan la identificación de estas células para seguir su posible migración (ej. ratones CRE-recombinasa que expresen una proteína fluorescente bajo el control del promotor del receptor PKD2L1, en los que la aplicación de tamoxifen marcaría selectiva y permanentemente las neuronas del CC) podrán en el futuro confirmar o descartar esta hipótesis.

Progenitores heterogéneos en dos dominios espaciales

Los progenitores neurales en el cerebro en desarrollo y en los adultos son heterogéneos y regionalmente especificados en términos de potencial de linaje (Graf y Stadtfeld, 2008, Merkle y col., 2007). Basado en la expresión de diversos marcadores de células madre, se ha propuesto recientemente que los progenitores en contacto con el CC en ratones son heterogéneos y con diferente potencial (Meletis y col., 2008). Nuestros resultados han demostrado que los progenitores del CC en ratas presentan un nivel de complejidad desconocido hasta este momento: son funcionalmente heterogéneos y se organizan en diferentes dominios espaciales. Esta novedosa organización del CC de la rata como nicho de progenitores espinales se muestra en forma esquemática en la Figura 44. Las células situadas en los dominios de la línea media son casi quiescentes y tiene diversas características moleculares y estructurales de las GR, reconocidas como las células madre neurales durante el desarrollo embrionario (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). No está claro si la heterogeneidad molecular y los fenotipos electrofisiológicos complejos dentro del dominio medial representan diferentes tipos de progenitores o varias etapas
funcionales de un único progenitor durante su desarrollo. Los progenitores en los dominios laterales mostraron características combinadas de ependimocitos y GR agrupados funcionalmente en unidades multicelulares a través de Cx43. Este acoplamiento podría ser importante para regular la proliferación celular como ocurre durante el desarrollo cortical (Elias y Kriegstein, 2008), siendo un factor importante para determinar la diferencia en la capacidad proliferativa entre los dominios laterales y mediales. Un posible abordaje para develar esta incógnita sería la realización de experimentos de interferencia de ARN para eliminar selectivamente la expresión de Cx43 en el CC y el posterior análisis de los cambios en la proliferación. El perfil espacial de la expresión de Cx43 y los grupos de progenitores acoplados descritos en esta Tesis se asemejan a lo reportado en las tortugas (Russo y col., 2008), lo que sugiere una organización funcional filogenéticamente conservada. Sin embargo, los progenitores acoplados en la rata no expresaron BLBP, lo que sugiere un carácter noneurogénico de los progenitores en los dominios laterales de los mamíferos durante la vida postnatal (Pinto y Götz, 2007). Aunque se ha reportado la posibilidad de neurogénesis postnatal alrededor del CC en ratones (Shechter y col., 2007, 2010) la mayoría de los estudios sugieren que en condiciones normales esto es sólo una capacidad latente de este nicho de células madre (Stoeckel y col., 2003, Sabourin y col., 2009, Barnabé-Heider y col., 2010).

El destino y la potencialidad de los progenitores en contacto con el CC a medida que el desarrollo continúa son poco claros. Aunque poco después del nacimiento, las GRs en el cerebro (Noctor y col., 2004) y en la médula espinal (Barry y McDermott, 2005) se diferencian en astrocitos, algunas células progenitoras permanecen en la médula adulta con la capacidad de reaccionar a las lesiones (Meletis y col., 2008). Las células derivadas del epéndimo migran lejos del CC, pero a diferencia de sus contrapartes en el cerebro isquémico (Carlen y col., 2009), no parecen tener la capacidad de convertirse en neuronas. En el futuro, experimentos de trazado de linaje de las células del CC que reaccionan a la lesión combinados con registros electrofisiológicos nos podrían develar interrogantes sobre la potencialidad de los diversos progenitores y los fenotipos celulares que son capaces de generar.

La expresión de canales de K^{\dagger} voltaje-dependientes y su activación juegan un rol fundamental en la señalización que lleva a la proliferación en diferentes tipos celulares (Ghiani y col., 1999, MacFarlane y Sontheimer, 2000, Chittajallu y col., 2002, Schaarschmidt y col., 2009). Esto se debe a que la apertura de estos canales influye sobre dos propiedades celulares relevantes para la progresión del ciclo mitótico: el volumen celular y el potencial de membrana (Rouzaire Dubois y Dubois, 1998, Wonderlin y Strobl, 1996). El bloqueo farmacológico de estos canales generalmente detiene la proliferación, mientras que la potenciación de estas corrientes genera un efecto contrario de estimulación de síntesis de ADN y aceleración del ciclo (Pardo, 2004). Es por tanto posible que la presencia de canales de K⁺ en los progenitores del CC contribuya a la modulación de su proliferación. Nuestros resultados abren una nueva estrategia que podría resultar útil para aumentar la respuesta de estas células ante una lesión espinal: la manipulación de los canales de K⁺ operados por voltaje en esta población heterogénea de células progenitoras. Dada la gran variedad de subtipos de canales de K⁺ existentes y que sólo algunos están relacionados directamente con la proliferación (Pardo, 2004), resulta necesario profundizar en el conocimiento de cuáles son expresados en éstas células. Un posible candidato sería el canal de K⁺ de rectificación retardada Kv1.3, relacionado con la proliferación de diversos tipos celulares como por ejemplo los progenitores de oligodendrocitos (Chittajallu y col., 2002). Para esto serían adecuados experimentos de "single cell RT-PCR" (Comer y col., 1999) que nos permitan identificar la expresión de ARN mensajero relacionado con los distintos sub-tipos de canales de K⁺ en esta población celular. El desarrollo posterior de vectores virales que permitan realizar experimentos de interferencia de ARN eliminando la expresión de estos canales en estas células nos podrían dar información clave para entender su posible rol funcional.



Figura 44. Esquema que representa al epéndimo de la médula espinal de la rata como un nicho de células progenitoras organizadas en dominios mediales y laterales. La heterogeneidad molecular y los fenotipos funcionales están codificados por color o ilustrados con datos representativos. Algunas de las especulaciones surgidas de nuestros resultados se indican con signos de interrogación. Modificado de Marichal y col., 2012.

Señalización purinérgica en los progenitores del CC y su implicancia para la reparación endógena

En esta Tesis demostramos que las células ependimarias tienen receptores ionotrópicos P2X₇ funcionales. Nuestros datos sugieren que esta señalización podría activarse por las altas concentraciones de ATP extracelular cuando se produce una lesión en la médula espinal, generando señales de Ca²⁺ intracelulares que podrían modular eventos como la proliferación, migración y diferenciación de estas células (Meletis y col., 2008). Por lo tanto postulamos a la señalización purinérgica a través de los receptores P2X₇ como otro posible objetivo para manipular la respuesta de este nicho latente de células madre de la médula espinal ante una lesión, abriendo una nueva avenida para la reparación. En línea con esta idea, un reciente trabajo sugiere la presencia de estos

receptores en neuroesferas derivadas de células ependimarias de ratas adultas y el aumento de su expresión en la médula espinal luego de una lesión espinal (Gómez-Villafuertes y col., 2014). Resulta entonces necesario una mejor comprensión de la modulación inducida por esta señalización en los progenitores ependimarios endógenas post-natales. La utilización de ratones transgénicos FoxJ1-Cre recombinasa (Meletis y col., 2008) para marcar selectivamente las células ependimarias sería una herramienta muy poderosa para profundizar en este tema. Esto nos permitiría identificar a las células del epéndimo y analizar sus respuestas mientras modulamos la activación o inactivación de estos receptores. Un posible abordaje experimental es la aplicación en el funículo dorsal de perlas de agarosa (Spitzer y col., 2004) embebidas en agonistas/antagonistas de los receptores P2X7 que puedan liberar estos compuestos para que actúen en los procesos basales de las GRs. La combinación con inyecciones de BrdU, inmunohistoquímica y registros electrofisiológicos permitiría analizar posibles cambios en la proliferación y en los fenotipos moleculares y funcionales de las células ependimarias marcadas. Experimentos de lesión en estos ratones, junto con la aplicación de agonistas/antagonistas de los receptores P2X7, permitirían analizar si esta señalización modula la migración de estas células en respuesta a la lesión. Además, podríamos analizar cómo el bloqueo de estos receptores afecta la recuperación funcional de animales lesionados.

Esta Tesis ha aportado datos novedosos sobre las propiedades de las células que tapizan el CC. Creemos que la profundización en el conocimiento de este nicho latente de células madre en la médula espinal resultará útil para manipular esta región de forma tal que en el futuro pueda alcanzarse una reparación endógena eficiente luego de una lesión que lleve a una recuperación funcional satisfactoria.

Referencias

Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. 2012. Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. *J Comp Neurol.* 520(15):3528-52.

Alonso G. 1999. Neuronal progenitor-like cells expressing polysialylated neural cell adhesion molecule are present on the ventricular surface of the adult rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol.* 414:149–166.

Altman J. 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 135, 1127–1128.

Altman J. 1963. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Postnatal growth and differentiation of the mammalian brain, with implications for a morphological theory of memory. *Anat. Rec.* 145, 573–591.

Altman J. & Das G.D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335.

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* 2(4):287-93. Review.

Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT. 2008. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 73:357-65.

Amadio S, D'Ambrosi N, Cavaliere F, Murra B, Sancesario G, Bernardi G, Burnstock G, Volonté C. 2002. P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacology*. 42(4):489-501.

Anderson CM, Nedergaard M. 2006. Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci.* 29(5):257-62.

Ballerini P, Rathbone MP, Di Iorio P, Renzetti A, Giuliani P, D'Alimonte I, Trubiani O, Caciagli F, Ciccarelli R. 1996. Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport.* 7(15-17):2533-7.

Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, Takebayashi H, Pfrieger FW, Meletis K, Frisén J. 2010. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell.* (4):470-82.

Baron A, Voilley N, Lazdunski M, Lingueglia E. 2008. Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons. *J Neurosci.* 28:1498–1508.

Barry D, McDermott K. 2005. Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing ratspinal cord. *Glia.* 50:187–197.

Beeton C, Pennington MW, Wulff H, Singh S, Nugent D, Crossley G, Khaytin I, Calabresi PA, Chen CY, Gutman GA, Chandy KG. 2005. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol Pharmacol.* 67: 1369–1381.

Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ. 2003. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 23:10411–10418.

Ben-Ari Y 2002. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 3: 728–739. Review.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:11–21.

Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis MF, van Biesen T. 1999. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 376(1-2):127-38.

Birse SC, Leonard RB, Coggeshall RE. 1980. Neuronal increase in various areas of the nervous system of the guppy, Lebistes. *J Comp Neurol.* 194(2):291-301.

Bittman K, Owens DF, Kriegstein AR, LoTurco JJ. 1997. Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. *J Neurosci*. 17(18):7037-44.

Bonfanti L. 2006. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol.* 80(3):129-64.

Boonstra J, Mummery CL, Tertoolen LG, Van Der Saag PT, De Laat SW. 1981. Cation transport and growth regulation in neuroblastoma cells. Modulations of K⁺ transport and electrical membrane properties during the cell cycle. *J Cell Physiol.* 107(1):75-83.

Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J. 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell.* 101(4):435-45.

Bruni JE. 1998. Ependymal development, proliferation, and functions: A review. *Microsc Res Technol.* 41:2–13.

Bruzzone R, Dermietzel R. 2006. Structure and function of gap junctions in the developing brain. *Cell Tissue Res.* 326(2):239-48.

Cameron HA, McKay RD. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 435(4):406-17.

Campbell K, Götz M. 2002. Radial glia: Multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 25:235–238. Review.

Carlén M, Meletis K, Göritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabé-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisén J. 2009. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci.* 12(3):259-67.

Carleton A, Petreanu L, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. 2003. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci*. 6(5):507-18.

Cavaliere F, Amadio S, Sancesario G, Bernardi G, Volonté C. 2004. Synaptic P2X7 and oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. J *Cereb Blood Flow Metab.* 24(4):392-8.

Chittajallu R, Aguirre A, Gallo V. 2004. NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *J Physiol*. 561(Pt 1):109-22.

Chittajallu R, Chen Y, Wang H, Yuan X, Ghiani CA, Heckman T, McBain CJ, Gallo V. 2002. Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci.* 99(4):2350-5.

Clapham DE. 1995. Calcium signaling. Cell. 80:259–268. Review.

Clorfene JB, Pollack ED. 1994. Late-generated cells in the lateral motor columns of developing frog spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res.* 79(1):93-100.

Comer AM, Gibbons HM, Qi J, Kawai Y, Win J, Lipski J. 1992. Detection of mRNA species in bulbospinal neurons isolated from the rostral ventrolateral medulla using single-cell RT-PCR. *Brain Res Protoc.* 4(3):367-77.

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

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*. 247(4941):470-3.

Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L. 2005. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 21:1–14.

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

Del Bene F, Wehman AM, Link BA, Baier H. 2008. Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell.* 134:1055–65

Del Bigio MR. 2010. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119(1):55-73.

Delarasse C, Gonnord P, Galante M, Auger R, Daniel H, Motta I, Kanellopoulos JM. 2009. Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J Neurochem.* 109(3):846-57.

Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, Buckley NJ, Parson SH, Deuchars 2001. J. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci.* 21(18):7143-52.

Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC. 2009. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol.* 9(4):507-13. Review.

Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 17:5046–5061.

Dubois JM, Rouzaire-Dubois B. 1993. Role of potassium channels in mitogenesis. *Prog Biophys Mol Biol*. 59(1):1-21.

Eisch AJ, Mandyam CD. 2007. Adult neurogenesis: Can analysis of cell cycle proteins move us "Beyond BrdU"? *Curr Pharm Biotechnol.* 8:147–165.

Elias LA, Kriegstein AR. 2008. Gap junctions: Multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Trends Neurosci.* 31:243–250.

Emsley JG, Mitchell BD, Magavi SS, Arlotta P, Macklis JD. 2004. The repair of complex neuronal circuitry by transplanted and endogenous precursors. *NeuroRx.* 1(4):452-71. Review.

Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci.* 25(44):10074-86.

Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A.1995. Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol.* 48(2):178-83.

Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O. 2002. Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. *J Comp Neurol*. 453(2):131-44.

Ferrari D, Wesselborg S, Bauer MK, Schulze-Osthoff K. 1997. Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *J Cell Biol.* 139(7):1635-43.

Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. 2003. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 23(3):373-82.

Fiorelli R, Cebrian-Silla A, Garcia-Verdugo JM, Raineteau O. The adult spinal cord harbors a population of GFAP-positive progenitors with limited self-renewal potential. 2013. *Glia.* 61(12):2100-13.

Fishell G, Kriegstein AR. 2003. Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance. *Curr Opin Neurobiol.* 13(1):34-41. Review.

Franke H, Krügel U, Illes P. 2006. P2 receptors and neuronal injury. *Pflügers Arch.* 452:622-644.

Frederiksen K, McKay RD. 1988. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci.* 8(4):1144-51.

Frischknecht F, Randall AD. 1988. Voltage- and ligand-gated ion channels in floor plate neuroepithelia of the rat. *Neuroscience*. 85:1135–1149.

Fu H, Qi Y, Tan M, Ci J, Hu X, Liu Z, Jensen J, Qiu M, 2003. Molecular mpping of the origin of postnatl spinal cord ependiymal cells: evidence tht dult ependyml cells re derived from Nkx6.1+ ventral progenitor cells. *J. Comp. Neurol.* 456:237-244.

Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A. 2012. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell.* 10(6):698-708.

Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I, Nishino H. 1998. Changes in intracellular Ca²⁺ induced by GABAA receptor activation and reduction in CI- gradient in neonatal rat neocortex. *J Neurophysiol.* 79:439–446.

Gao BX, Ziskind-Conhaim L. 1998. Development of ionic currents underlying changes in action potential waveforms in rat spinal motoneurons. *J Neurophysiol.* 80:3047–3061.

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

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

Genzen JR, Platel JC, Rubio ME, Bordey A. 2009. Ependymal cells along the lateral ventricle express functional P2X7 receptors. *Purinergic Signal*. 5:299-307.

Ghiani CA, Yuan X, Eisen AM, Knutson PL, DePinho RA, McBain CJ, Gallo V. 1999. Voltage-activated K^+ channels and membrane depolarization regulate accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(Kip1) and p21(CIP1) in glial progenitor cells. *J Neurosci*. 19(13):5380-92.

Glaser T, Resende RR, Ulrich H. 2013. Implications of purinergic receptormediated intracellular calcium transients in neural differentiation. *Cell Commun Signal.* 17;11(1):12.

Goldman SA, & Nottebohm F. 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl Acad. Sci.* 80, 2390–2394.

Gómez-Climent MA, Castillo-Gómez E, Varea E, Guirado R, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ, Nácher J. 2008. A population of prenatally generated cells in the rat paleocortex maintains an immature neuronal phenotype into adulthood. *Cereb Cortex*. 18:2229–2240.

Gomez-Climent MA, Guirado R, Varea E, Nàcher J. 2010. "Arrested development". Immature, but not recently generated, neurons in the adult brain. *Arch Ital Biol.* 148(2):159-72. Review.

Gómez-Villafuertes R, Rodríguez-Jiménez FJ, Alastrue-Agudo A, Stojkovic M, Miras-Portugal MT, Moreno-Manzano V. 2014. Purinergic receptors in spinal cord-derived ependymal stem/progenitor cells and its potential role in cell-based therapy for spinal cord injury. *Cell Transplant.* Jul 15.

Göritz C, Frisén J. 2012. Neural stem cells and neurogenesis in the adult. *Cell Stem Cell.* 10(6):657-9.

Goto H, Inoko A, Inagaki M. 2013. Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. *Cell Mol Life Sci.* 70:3893-3905.

Götz M, Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(10):777-88.

Graf T, Stadtfeld M. 2008. Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell Stem Cell.* 3:480–483.

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

Haak LL, Song LS, Molinski TF, Pessah IN, Cheng H, Russell JT. 2001. Sparks and puffs in oligodendrocyte progenitors: cross talk between ryanodine receptors and inositol trisphosphate receptors. *J Neurosci.* 21(11):3860-70.

Hamilton LK, Truong MK, Bednarczyk MR, Aumont A, Fernandes KJ. 2009. Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience*. 164(3):1044-56.

His, W. 1904. Die Entwickelung des menschlichen Gehirns (Hirzel, Leipzig).

Hodgkin AL, Huxley AF. 1952. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol.* 1952. 116(4):449-72.

Horky LL, Galimi F. Gage FH, Horner PJ. 2006. Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *J Comp Neurol*. 498(4):525-38.

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

Hsieh J, Schneider JW. 2008. Genetics and Epigenetics in Adult Neurogenesis. In: Adult neurogenesis (Gage FH, Kempermann G, Song H, eds), pp 321–339. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor.

Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Tränkner D, Ryba NJ, Zuker CS. 2006. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature.* 442:934 –938.

Hugnot JP, Franzen R. 2011. The spinal cord ependymal region: a stem cell niche in the caudal central nervous system. *Front Biosci* 16: 1044-1059. Review.

lino, M. 2010. Spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ signaling and its physiological roles. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86, 244–256.

Jahnsen H, Llinás R. 1984. Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an in vitro study. *J Physiol.* 349:205-26.

Jang M-H, Song H and Ming G-I, 2008. Regulation of Adult Neurogenesis by Neurotransmitters. In: Adult neurogenesis (Gage FH, Kempermann G, Song H, eds), pp 397–423. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor.

Jessell TM. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet.* 1(1):20-9.

Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A. 2000. Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol.* 58(1):82-8.

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

Kaplan MS. & Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*. 197, 1092–1094.

Ke Y, Chi L, Xu R, Luo C, Gozal D, Liu R. 2006. Early response of endogenous adult neural progenitor cells to acute spinal cord injury in mice. *Stem Cells*. 24(4):1011-9.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 386, 493–495. Review.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27(8):447-52. Review.

Kempermann G. 2008. Activity Dependency and Aging in the Regulation of Adult Neurogenesis. In: Adult neurogenesis (Gage FH, Kempermann G, Song H, eds), pp 341–361. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor.

Kempermann G. 2012. New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat Rev Neurosci*. 13(10):727-36. Review.

Khakh BS, North RA. 2004. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature.* 442(7102):527-32. Review.

Koelliker A. 1896. Handbuch der Gewebelehre des Menschen (Engelmann, Leipzig).

Kornack DR & Rakic P. 1999. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc. Natl Acad. Sci.* 96, 5768–5773.

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

Kriegstein AR, Götz M. 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia.* 43(1):37-43. Review.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: acerelated decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027–2033.

Kuhn HG, Peterson DA. 2008. Detection and phenotypic characterization of adult neurogenesis. In: Adult neurogenesis (Gage FH, Kempermann G, Song H, eds), pp 25–47. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor.

Kukley M, Barden JA, Steinhäuser C, Jabs R. 2001. Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia.* 36(1):11-21.

Kútna V, Ševc J, Gombalová Z, Matiašová A, Daxnerová Z. 2014. Enigmatic cerebrospinal fluid-contacting neurons arise even after the termination of neurogenesis in the rat spinal cord during embryonic development and retain their immature-like characteristics until adulthood. *Acta Histochem.* 116(1):278-85.

Kyrozis A, Reichling DB. 1995. Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentrarion. *J Neurosci Methods*. 57:27–35.

Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. 2001. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci.* 24:39–47. Review.

Liebau S, Propper C, Bockers T, Lehmann-Horn F, Storch A, Grissmer S, Wittekindt OH. 2006. Selective blockage of Kv1.3 and Kv3.1 channels increases neural progenitor cell proliferation. *J Neurochem.* 99: 426–437.

Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A. 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci.* 8(9):1179-87

Liu X, Bolteus AJ, Balkin DM, Henschel O, Bordey A. 2006. GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia.* 54(5):394-410.

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci.* 7:179-193. Review.

Lucassen PJ, Oomen CA, van Dam AM, Czéh B. 2008. Regulation of Hippocampal Neurogenesis by Systemic Factors Including Stress, Glucocorticoids, Sleep, and Inflammation. In: Adult neurogenesis (Gage FH, Kempermann G, Song H, eds), pp 363–395. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor.

Lytle JM, Chittajallu R, Wrathall JR, Gallo V. 2009. NG2 cell response in the CNP-EGFP mouse after contusive spinal cord injury. *Glia.* 57(3):270-85.

MacFarlane SN, Sontheimer H. 2000. Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia*. 30(1):39-48.

MacFarlane SN, Sontheimer H. 2000. Modulation of Kv1.5 currents by Src tyrosine phosphorylation: potential role in the differentiation of astrocytes. *J Neurosci.* 20(14):5245-53.

Majumder P, Trujillo CA, Lopes CG, Resende RR, Gomes KN, Yuahasi KK, Britto LR, Ulrich H. 2007. New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. *Purinergic Signal.* 3:317-331.

Marichal N, Garcia G, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O, Russo RE. 2009. Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in "standby mode"? *J Neurosci*. 2009, 29(32):10010-10024.

Marichal N, García G, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O, Russo RE. 2012. Spatial domains of progenitor-like cells and functional complexity of a stem cell niche in the neonatal rat spinal cord. *Stem Cells.* 30(9):2020-31.

Matute C, Torre I, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Alberdi E, Etxebarria E, Arranz AM, Ravid R, Rodríguez-Antigüedad A, Sánchez-Gómez M, Domercq M. 2007. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci.* 27(35):9525-33.

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

Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science.* 317:381–384.

Messemer N, Kunert C, Grohmann M, Sobottka H, Nieber K, Zimmermann H, Franke H, Nörenberg W, Straub I, Schaefer M, Riedel T, Illes P, Rubini P. 2013. P2X7 receptors at adult neural progenitor cells of the mouse subventricular zone. *Neuropharmacology.* 73:122-37.

Ming GL, Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 28:223–250. Review.

Mladinic M, Bianchetti E, Dekanic A, Mazzone GL, Nistri A. 2014. ATF3 is a novel nuclear marker for migrating ependymal stem cells in the rat spinal cord. *Stem Cell Res.* 12(3):815-27.

Mothe AJ, Tator CH 2005. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord inury in the adult rat. *Neuroscience*. 131:177–187.

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

Nadarajah B, Jones AM, Evans WH, Parnavelas JG. 1997. Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. *J Neurosci.* 17(9):3096-111.

Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. 1996. *J Neurosci Res.* 43(3):299-314.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein, AR. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*. 409: 714-720.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. 2002. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci*. 22(8):3161-73.

Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7(2):136-44.

Nornes HO, Das GD. 1972. Temporal pattern of neurogenesis in spinal cord: cytoarchitecture and directed growth of axons. *Proc Natl Acad Sci.* 69: 1962-1966.

Nornes HO, Das GD. 1974. Temporal pattern of neurogenesis in spinal cord of rat. An autoradiographic study- Time and sites of origin and migration and settling patterns of neuroblasts. *Braian Research*. 73, 121-138.

North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. 2000 Annu Rev Pharmacol Toxicol. 40:563-80.

North RA. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 82:1013-1067.

Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. 1989. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J. Neurocytol.* 18, 311–318.

O'Dowd DK, Ribera AB, Spitzer NC. 1988. Development of voltage-dependent calcium, sodium, and potassium currents in Xenopus spinal neurons. *J Neurosci.* 8(3):792-805.

Orts-Del'immagine 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. *J Physiol*. 590(Pt 16):3719-41.

Orts-Del'Immagine A, Kastner A, Tillement V, Tardivel C, Trouslard J, Wanaverbecq N. Morphology, distribution and phenotype of polycystin kidney disease 2-like 1-positive cerebrospinal fluid contacting neurons in the brainstem of adult mice. *PLoS One.* 4;9(2):e87748.

Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR. 1996. Excitatory GABAresponses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci.* 16:6414–6423.

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

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

Peters A, Palay SL, Webster HdeF. 1991. The ependyma. In: Peters A, Palay SL, Webster HdeF, eds. The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells. Oxford: Oxford UP, 312–327.

Petit A, Sanders AD, Kennedy TE, Tetzlaff W, Glattfelder KJ, Dalley RA, Puchalski RB, Jones AR, Roskams AJ. 2011. Adult spinal cord radial glia display a unique progenitor phenotype. *PLoS One.* 6(9):e24538.

Petreanu L, Alvarez-Buylla A. 2002. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci.* 22(14):6106-13.

Pfenninger CV, Steinhoff C, Hertwig F, Nuber UA. 2011. Prospectively isolated CD133/CD24-positive ependymal cells from the adult spinal cord and lateral ventricle wall differ in their long-term in vitro self-renewal and in vivo gene expression. *Glia.* 59(1):68-81.

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

Platel JC, Lacar B, Bordey A. 2007. GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *J. Mol. Histol.* 38, 602-610.

Ramón y Cajal S. 1909. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés, vol 1. Paris: Maloine. 993 p.

Ramón y Cajal S. 1913-1914. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso, TI-II. Degeneración y regeneración de los centros nerviosos. Moya, Madrid.

Ribera AB. Potassium currents in developing neurons. 1999. *Ann N Y Acad Sci.* 868:399-405.

Rouzaire-Dubois B, Dubois JM. 1998. K^+ channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *J Physiol.* 510 (Pt 1):93-102.

Rowitch DH. 2004. Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci.* 5(5):409-19. Review.

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

Russo RE, Hounsgaard J. 1999. Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones. *Prog Biophys Mol Biol.* 72:329 –365.

Russo RE, Fernández A, Reali C, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O. 2004. Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurones in the turtle spinal cord. *J Physiol*. 560(Pt 3):831-8. Russo RE, Reali C, Radmilovich M, Fernández A, Trujillo-Cenóz O. 2008. Connexin 43 delimits functional domains of neurogenic precursors in the spinal cord. *J Neurosci*. 28(13):3298-309.

Sabelström H, Stenudd M, Réu P, Dias DO, Elfineh M, Zdunek S, Damberg P, Göritz C, Frisén J. 2013. Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science.* 342(6158):637-40.

Sabourin JC, Ackema KB, Ohayon D, Guichet PO, Perrin FE, Garces A, Ripoll C, Charité J, Simonneau L, Kettenmann H, Zine A, Privat A, Valmier J, Pattyn A, Hugnot JP. 2009. A mesenchymal-like ZEB1(+) niche harbors dorsal radial glial fibrillary acidic protein-positive stem cells in the spinal cord. *Stem Cells* 27(11):2722-33.

Sakakibara A, Aoki E, Hashizume Y, Mori N, Nakayama A. 2007. Distribution of nestin and other stem cell-related molecules in developing and diseased human spinal cord. *Pathol Int.* 57(6):358-68.

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

Schaarschmidt G, Wegner F, Schwarz SC, Schmidt H, Schwarz J. 2009. Characterization of voltage-gated potassium channels in human neural progenitor cells. *PLoS One*. 4(7):e6168.

Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature.* 429:184 – 187.

Seki T, Arai Y. 1993. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res.* 17(4):265-90.

Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. 2004. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 478(4):359-78.

Sevc J, Matiašová A, Kútna V, Daxnerová Z. Evidence that the central canal lining of the spinal cord contributes to oligodendrogenesis during postnatal development and adulthood in intact rats. *J Comp Neurol.* 522(14):3194-207.

Shechter R, Ziv Y, Schwartz M. 2007. New GABAergic interneurons supported by myelin-specific T cells are formed in intact adult spinal cord. *Stem Cells*. 25:2277–2282.

Shechter R, Baruch K, Schwartz M, Rolls A. 2011. Touch gives new life: mechanosensation modulates spinal cord adult neurogenesis. *Mol Psychiatry*. 16(3):342-52.

Sim JA, Young MT, Sung HY, North RA, Surprenant A. 2004. Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. *J Neurosci.* 24(28):6307-14.

Smith DO, Rosenheimer JL, Kalil RE. 2008. Delayed rectifier and A-type potassium channels associated with Kv 2.1 and Kv 4.3 expression in embryonic rat neural progenitor cells. *PLoS* One. 3:e1604.

Sontheimer H, Trotter J, Schachner M, Kettenmann H. 1989. Channel expression correlates with differentiation stage during the development of oligodendrocytes from their precursor cells in culture. *Neuron.* 2(2):1135-45.

Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci.* 25:10–18.

Spitzer NC, Lamborghini JE. 1976. The development of the action potential mechanism of amphibian neurons isolated in culture. *Proc Natl Acad Sci.* 73:1641–1645.

Spitzer NC, Ribera AB. 1998. Development of electrical excitability in embryonic neurons: mechanisms and roles. *J Neurobiol.* 37:190 –197.

Spitzer NC, Vincent A, Lautermilch NJ. 2000. Differentiation of electrical excitability in motoneurons. *Brain Res Bull.* 53(5):547-52.

Spitzer NC, Kingston PA, Manning TJ, Conklin MW, 2002. Outside and in: development of neuronal excitability. *Curr Opin Neurobiol.* 12:315–323.

Spitzer NC, Root CM, Borodinsky LN. 2004. Orchestrating neuronal differentiation: patterns of Ca²⁺ spikes specify transmitter choice. *Trends Neurosci.* 27:415–421.

Stanfield BB. & Trice JE. 1988. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp. Brain Res.* 72, 399–406.

Stewart RR, Zigova T, Luskin MB. 1999. Potassium currents in precursor cells isolated from the anterior subventricular zone of the neonatal rat forebrain. *J Neurophysiol.* 81:95–102.

Stoeckel ME, Uhl-Bronner S, Hugel S, Veinante P, Klein MJ, Mutterer J, Freund-Mercier MJ, Schlichter R. 2003. Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 457(2):159-74.

Surprenant A, North RA. 2009. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol.* 71:333-359. Review.

Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. 2005. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron.* 47:803–815.

Trujillo-Cenóz O, Fernández A, Radmilovich M, Reali C, Russo RE. 2007. Cytological organization of the central gelatinosa in the turtle spinal cord. *J Comp Neurol*. 502(2):291-308.

Trujillo-Cenóz O, Marichal N, Rehermann MI, Russo RE. 2014. The inner lining of the reptilian brain: a heterogeneous cellular mosaic. *Glia.* 62(2):300-16.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Funtional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 415(6875):1030-4.

Vigh B, Vigh-Teichmann I. 1998. Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Microsc Res Tech.* 41(1):57-83.

Vigh-Teichmann I, Vigh B. 1983. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Arch Histol Jpn.* 46(4):427-68.

Vinay L, Brocard F, Pflieger JF, Simeoni-Alias J, Clarac F. 2000. Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. *Brain Res Bull.* 53:635–647.

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

Wang DD, Bordey A. 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*. 86(4):342-67. Review.

Wang LY, Cai WQ, Chen PH, Deng QY, Zhao CM. 2009. Downregulation of P2X7 receptor expression in rat oligodendrocyte precursor cells after hypoxia ischemia. *Glia.* 57(3):307-19.

Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, Peng WG, Wan P, Li P, Xu Q, Liu QS, Goldman SA, Nedergaard M. 2004 P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med.* 10:821-827.

Webb SE, Moreau M, Leclerc C, Miller AL. 2005. Calcium transients and neural induction in vertebrates. *Cell Calcium.* 37(5):375-85.

Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC, Kriegstein AR 2004. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron.* 43:647-661.

Wonderlin WF, Strobl JS. 1996. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol.* 154(2):91-107.

Yu Y, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Inoue K, Kyaw Nyunt A, Umemura A, Mase M, Yamada K, Shimada S. 2008. Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res.* 1194:45-55.

Yuste R, Katz LC. 1991. Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron.* 6:333–344.

Zimmermann H 2006. Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflügers Arch.* 452:573-588.

Cellular/Molecular

Enigmatic Central Canal Contacting Cells: Immature Neurons in "Standby Mode"?

Nicolás Marichal,¹ Gabriela García,¹ Milka Radmilovich,² Omar Trujillo-Cenóz,¹ and Raúl E. Russo¹

¹Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, CP11600, Montevideo, Uruguay, and ²Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, CP 11800, Montevideo, Uruguay

The region that surrounds the central canal of the spinal cord derives from the neural tube and retains a substantial degree of plasticity. In turtles, this region is a neurogenic niche where newborn neurons coexist with precursors, a fact that may be related with the endogenous repair capabilities of low vertebrates. Immunohistochemical evidence suggests that the ependyma of the mammalian spinal cord may contain cells with similar properties, but their actual nature remains unsolved. Here, we combined immunohistochemistry for cell-specific markers with patch-clamp recordings to test the hypothesis that the ependyma of neonatal rats contains immature neurons similar to those in low vertebrates. We found that a subclass of cells expressed HuC/D neuronal proteins, doublecortin, and PSA-NCAM (polysialylated neural cell adhesion molecule) but did not express NeuN (anti-neuronal nuclei). These immature neurons displayed electrophysiological properties ranging from slow Ca²⁺-mediated responses to fast repetitive Na⁺ spikes, suggesting different stages of maturation. These cells originated in the embryo, because we found colocalization of neuronal markers with 5-bromo-2'-deoxyuridine when injected during embryonic day 7–17 but not in postnatal day 0–5. Our findings represent the first evidence that the ependyma of the rat spinal cord contains cells with molecular and functional features similar to immature neurons in adult neurogenic niches. The fact that these cells retain the expression of molecules that participate in migration and neuronal differentiation raises the possibility that the ependyma of the rat spinal cord is a reservoir of immature neurons in "standby mode," which under some circumstances (e.g., injury) may complete their maturation to integrate spinal circuits.

Introduction

The region that surrounds the central canal (CC) of the spinal cord is a plastic structure. For example, ependymal cells in the spinal cord of rats and mice react to injury providing limited endogenous repair (Beattie et al., 1997; Mothe and Tator, 2005; Meletis et al., 2008). This kind of plasticity is outstanding in some low vertebrates, in which the CC region organizes the reconnection of the cord after transection (Dervan and Roberts, 2003). Postnatal endogenous repair mechanisms may be related to the preservation of progenitor cells similar to those in the embryo. In the region around the CC of juvenile turtles, there are cells with functional and molecular properties of neurogenic precursors intermingled with others that express early neuronal markers and fire action potentials, indicating they are immature neurons im-

Received Dec. 30, 2008; revised June 16, 2009; accepted July 5, 2009.

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

DOI:10.1523/JNEUROSCI.6183-08.2009

Copyright © 2009 Society for Neuroscience 0270-6474/09/2910010-15\$15.00/0

mersed in a neurogenic environment (Fernández et al., 2002; Russo et al., 2004, 2008). Some studies suggest that the ependyma of mammals may retain similar properties which may support endogenous repair mechanisms (Danilov et al., 2006; Shechter et al., 2007).

In some niches of the adult mammalian brain, new neurons are generated throughout life (Lim et al., 2008). During differentiation, these cells initially express doublecortin (DCX) and polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), which are typical of migrating neuroblasts (Kuhn and Peterson, 2008). As they integrate to existing circuits, they become negative for DCX and PSA-NCAM, start expressing anti-neuronal nuclei (NeuN), and acquire electrophysiological properties of mature neurons (van Praag et al., 2002). Some ependymal cells in the adult mammalian spinal cord proliferate (Johansson et al., 1999; Meletis et al., 2008), but their differentiation toward the neuronal lineage seems inhibited (Horner et al., 2000). However, immunohistochemical studies have shown that there are neuron-like cells within the ependyma that express proteins typical of neuroblasts in neurogenic niches (Alonso, 1999; Stoeckel et al., 2003; Shechter et al., 2007). Whether these neuron-like cells are similar to those in adult neurogenic niches remains unclear.

Anatomical (Vigh and Vigh-Teichmann, 1998) and immunohistochemical (Alonso, 1999, Stoeckel et al., 2003) evidences suggest that some cells in the ependyma of the rat resemble immature neurons in turtles (Russo et al., 2004). Interestingly, ependymal cells in the spinal cord have neural stem cell potential (Meletis et al., 2008) and may provide a favorable environment for neuroblasts. We thus

The work described here was supported by Grant # 63/135 from Programa de Desarrollo Tecnológico and Grant R01NS048255 from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke to R.E.R. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke or the National Institutes of Health. We thank Dr. A. Fernández and J. Cedrani for participating in an early stage of the project, G. Fabbiani and M. I. Rehermann for technical assistance and Dr. A. Merdes for the generous gift of the PCM-1 antibody. The sialylated form of the NCAM monoclonal antibody developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by The University of lowa, Department of Biology, Iowa City, IA.



Figure 1. Immature neurons contacting the CC. *A***1**–**3**, HuC/D + cells (**1**, arrows) contacting the CC. No NeuN + cells occurred within the ependymal layer (**2**). However, outside the ependyma all HuC/D + cells had NeuN + nuclei (**3**). The arrowheads in **2** and **3** point two HuC/D + cells close to the ependymal layer with NeuN + nuclei. *B***1**–**3**, HuC/D + cells (**1**, arrows) and Syto 64 labeled nuclei (**2**) in the ependyma of the rat. Notice that HuC/D + cells represent a minority of the cells within the ependymal layer (**3**) and that their nuclei (**2**, **3**, open arrowheads) have a rounded shape that contrast with the elongated nuclei (**2**, **3**, filled arrowheads) of most cells within the ependymal layer. **C1**–**3**, Most cells within the ependyma expressed the ependymal cell marker S100 β (**1**). However, some S100 β – cellular profiles (**1**, asterisks) within the ependymal layer expressed HuC/D (2–3, arrowheads). All images are single confocal optical planes. **A**, **C**, P2 rats; **B**, P5 rat.

hypothesized that some CC-contacting cells in the rat are neuroblasts similar to those in neurogenic niches. Here, we tested this hypothesis by combining immunohistochemistry for cell type specific markers with patch-clamp recordings of CC-contacting cells in neonatal rats [postnatal day 0–5 (P0–P5)]. We found that a subclass of cells expressed HuC/D, DCX, and PSA-NCAM but did not express NeuN. They displayed electrophysiological properties ranging from slow Ca²⁺-mediated responses to fast, repetitive Na⁺ spikes, and originated in the embryo as shown by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) birthdating analysis. Our findings represent the first evidence that the ependyma in the mammalian spinal cord contains cells with molecular and functional features similar to immature neurons in adult neurogenic niches and may imply novel forms of plasticity.

Materials and Methods

General. Neonatal rats (Sprague Dawley, P0– P5) were used following the guidelines of our local Committee for Animal Care and Research (Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay). For some electrophysiological and immunohistochemical experiments, P15–P18 and P >21 rats were used.

Immunohistochemistry. Animals were anesthetized (50 mg/kg, i.p.; Pentobarbital) and fixed by intracardiac perfusion with 10% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). To identify the molecular phenotype of cells around the CC, we used the following primary antibodies: (1) anti-HuC/D (mouse monoclonal, 1:50; Invitrogen); (2) NeuN (mouse monoclonal, 1:200; Millipore); (3) PSA-NCAM (mouse monoclonal, 1:10; Developmental Studies Hybridoma Bank); (4) anti-doublecortin (goat polyclonal C-18, 1:200; Santa Cruz Biotechnology); (5) anti-BrdU (mouse monoclonal, 1:500; Dako Cytomation) or (6) anti-BrdU (rabbit polyclonal, 1:10.000; Megabase Research); (7) anti-PCNA (rabbit polyclonal, 1:100; Santa Cruz Biotechnology); (8) anti neurofilament-M (rabbit polyclonal, 1:500; Millipore Bioscience Research Reagents); (9) anti-S100 β (rabbit polyclonal, 1:500; Sigma-Aldrich); and (10) anti-PCM-1 (rabbit polyclonal, 1:500; Dr. A. Merdes, Centre National de la Recherche Scientifique, Pierre Farbre, France). Tissues were sectioned with a vibrating microtome (60-80 μ m) and placed in PB with 0.5% bovine serum albumin (BSA) for 30 min and then incubated with the primary antibodies diluted in PB with 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Incubation times and antibody concentrations were optimized for each case. After washing in PB, tissues were incubated in secondary antibodies conjugated with different fluorophores or horseradish peroxidase. The horseradish peroxidase was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich). In some cases, the Zenon labeling kit (Invitrogen) was used according to the instructions of the manufacturer. When performing colabeling experiments, Alexa 488 and 633 (Invitrogen) were used to avoid cross talk. Colocalization for DCX, PSA-NCAM, and HuC/D was analyzed in 10 60- μ m-thick sections that were chosen randomly to avoid subjective bias (n = 3 rats). To reveal the nuclei of CCcontacting cells, sections were stained with the

nuclear stain Syto 64 (Invitrogen). We made control experiments suppressing primary antibodies during tissue processing. The histological material was visualized with light transmitted illumination, conventional epifluorescence or confocal microscopy (Olympus VF300). The images were acquired with Fluoview 5 (Olympus). Z-stacks, three-dimensional, and orthogonal views were generated and then exported to Photoshop 7 or Corel Draw for image adjustment.

Transmission electron microscopy. Anesthetized animals were fixed by intracardiac perfusion with 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M PB, pH 7.4. Tissues were sectioned with a Vibratome (50–60 μ m). Transmission electron microscopy (TEM) studies were performed in postfixed tissues (1% OsO₄ in PB 0.1 M) that were epoxyresin embedded. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate.

TEM immunohistochemistry. Floating sections processed for revealing HuC/D and DCX with DAB (Sigma-Aldrich) using the ABComplex (Dako Cytomation) were postfixed in 1% OsO₄ in PB 0.1 M, washed, and dehydrated as usual. The sections were finally resin epoxy embedded in flat molds that allowed transillumination and localization of the stained cells. After precise trimming of the block, the stained cells were ultrathin sectioned. Series of sections were mounted on one-hole grids (rectangular opening, 2 × 1 mm), covered with formvar, and contrasted with uranyl acetate and lead citrate.

Slice preparation and electrophysiology. Rats anesthetized with isoflurane (Forane) were decapitated and the cervical enlargement was dissected out in chilled Ringer's solution of the following composition (in mM): NaCl, 101; KCl, 3.8; MgCl₂, 18.7; CaCl₂, 1; MgSO₄.6H₂O, 1.3; HEPES, 10; KH₂PO₄, 1.2; and glucose, 25; saturated with 5% CO2 and 95% O2, pH 7.4. Transverse 300-µm-thick slices were cut, placed in a chamber (1 ml of volume), and superfused (1 ml min⁻¹) with Ringer's solution (in mM): NaCl, 124; KCl, 2.4; NaHCO₃, 26; CaCl₂, 2.4; MgSO₄.6H₂O, 1.3; HEPES, 1.25; KH₂PO₄, 1.2; and glucose, 10; saturated with 5% CO₂ and 95% O₂ to keep pH 7.4. All experiments were performed at room temperature. Cells were visualized with differential interference contrast (DIC) optics (Leica DM LFS) with a $40 \times (0.8$ numerical aperture) objective. Patch-clamp whole-cell recordings were obtained with electrodes filled with (in mM): K-gluconate, 122; Na₂-ATP, 5; MgCl₂, 2.5; CaCl₂, 0.003; EGTA, 1; Mg-gluconate, 5.6; K-HEPES, 5; H-HEPES, 5; and biocytin, 10; pH 7.4; 5-10 M . In some cases, Lucifer yellow (0.1-0.5%, Sigma-Aldrich) or Alexa 488 hydrazide (250-500 µM, Invitrogen) were added to the pipette solution. Current- and voltageclamp recordings were performed with an Axoclamp 2B or a Multiclamp 700B (Molecular Devices). Current and voltage steps were generated with pClamp10 (Molecular Devices), which was also used for further analysis. All cells were first studied in current clamp to characterize the intrinsic response properties

(Russo and Hounsgaard, 1999). Series resistance and whole-cell capacitance were not compensated. In voltage clamp mode, cells were held at -70 mV, and the resting membrane potential was estimated from the current-voltage relationship (at I = 0). To subtract leak currents we used a P4 protocol provided by Clampex10 (Molecular Devices) that allowed simultaneous storage of raw and leak subtracted data. Liquid junction potentials were determined and corrected off-line (Barry and Diamond, 1970). Values are expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance (p < 0.05) was evaluated using the Mann–Whitney *U* test. To explore whether the different electrophysiological phenotypes of CC-contacting cells were correlated with age, we used the χ^2 test at p < 0.05. As the null hypothesis (Ho), we assumed that phenotypes and postnatal age (P0–P5) were independent characteristics.

The voltage dependence of activation for K⁺ currents was determined from whole-cell conductance (*G*) versus membrane potential measurements (*V*_m) using the formula *G* = *I*/ (*V*_m - *V*_{reversal}). The reversal potential (*V*_{reversal}), was assumed to equal the K⁺ equilibrium potential (-102 mV) as calculated with the Nernst equation. The resulting curves were fitted with Boltzmann functions. Voltage-dependent inactivation properties were determined by applying conditioning voltage steps from a



Figure 2. HuC/D+ cells express proteins of neuroblasts in neurogenic niches. A1-3, HuC/D+ in the CC (1, arrows) had an apical process contacting the CC lumen (1, arrowhead). DCX expression (2) matched almost completely that of HuC/D (2 and 3, arrows). However, some HuC/D + cells did not express DCX (1-3, empty arrowheads) whereas few DCX + cells did not show HuC/D immunoreactivity (1-3, empty arrow). Single optical plane. B1-3, HuC/D + cells (1) also expressed PSA-NCAM, (2, 3). Note the characteristic punctate pattern of PSA-NCAM expression on the surface of the cell (arrowhead in 2). Z-stack projection. C1-3, The majority of DCX + cells (1, arrow) also expressed PSA-NCAM (2 and 3). Notice the conspicuous apical processes reaching the CC lumen (arrowheads). Single confocal optical plane. A, B, P2 rat; C, P5 rat.

 $-70~{\rm mV}$ holding potential to levels ranging from -100 to $10~{\rm mV}$ in 10 mV steps. The membrane potential was then set to 30 mV and the peak current amplitudes were measured, normalized relative to their maximum value, and plotted versus the conditioning-voltage amplitude. The half-activation voltage $(V_{\rm h})$ and the slope factor $(k_{\rm h})$ were estimated by fitting a Boltzmann function to the data.

In some experiments, the following drugs or ionic substitutions were introduced to the normal Ringer's solution: tetrodotoxin (TTX, 1 μ M; Alomone Labs) to block Na⁺ channels, Mn²⁺ (3 mM) to block the Ca²⁺ channels, Ni²⁺ (300 μ M) to block the T-type Ca⁺² channels, tetraethyl-ammonium (TEA, 10 mM; Sigma-Aldrich) to block K⁺ channels, 4-aminophyridine (4-AP, 1–2 mM; Sigma-Aldrich) to block A-type K⁺ channels, and gabazine (10 μ M, Tocris) to block GABA_A receptors.

GABA (100 μ M) and ATP (100 μ M) diluted in normal Ringer's solution were pressure ejected from patch pipettes (2 μ m tip diameter) using a Picospritzer III (Parker Instrumentation) controlled by Clampex10. Changes in the pH of the microenvironment surrounding the recorded cell were made by puffing a modified Ringer's solution buffered at pH 6.0 in which NaHCO₃ was lowered to 17.25 mM and HEPES was replaced by 10 mM MES.



Figure 3. Fine structure characteristics of immature neurons within the ependymal layer. *A***1**, *2*, Light microscope image of a HuC/D+ cell (**1**, arrowhead) resin-epoxy embedded. The same cell is shown under the electron microscope in *2*. The osmium-DAB precipitates (*2*, inset) allowed to identify the limits of the cell which are outlined by a dotted line. Notice the round nucleus of the HuC/D+ cell which is lighter than the elongated nuclei of neighboring ependymal cells (*2*, E). *B***1**, *2*, Light microscope image of a DCX+ cell in the ependymal layer (**1**, arrowhead). Conspicuous osmium-DAB precipitates allowed the identification of the DCX+ cell at the TEM level (*2*, lower left inset). As for HuC/D+ cells, the nucleus of the DCX+ cell had a round appearance (*2*, N) compared with neighboring nuclei (*2*, E). The apical process was easily identified and contacted the CC lumen (*2*, upper left inset; shadowed). *C*, Low power electronmicrograph of a putative immature neuron (N) in better preserved tissue that was not exposed to detergents. Note the round shaped nucleus that contrasts with the elongated nuclei of adjacent cells (E). An apical process reaches the CC lumen. The inset shows a tangential view of a cilium (arrow) surrounded by a crown of slender microvilli. *D***1**, *2*, Another putative immature CC-contacting neuron with an electron dense cytoplasm containing abundant free ribosomes. Notice the process arising from the basal pole (**1**, asterisk). This poorly differentiated process (*2*, shaded in light blue) showed no evidences of either neurotubes or neurofilaments. *A*, *B*, P4 rat; *C*, P2 rat; *D*, P4 rat.

Morphological identification of recorded cells. During whole-cell patchclamp recordings 165 cells were filled with a fluorophore and/or biocytin. Cells were filled for at least 10 min and the slices were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB for 12–24 h. In some cases, cells were visualized in living slices by injecting Lucifer yellow or Alexa 488 and the resulting images were acquired with an FG7 frame grabber (Scion Instruments) using ImageJ (NIH). Although leakage from the pipette was usually sufficient to get good stainings, in most cases we applied current or voltage pulses (500 ms at 1 Hz) after the electrophysiological characterization to iontophorese either biocytin or fluorophores. After overnight PB rinsing, the slices were blocked with 0.5% BSA in PB (1 h) and then incubated in a solution containing 0.3% Triton X-100 with either the streptavidin-fluorophore complex (streptavidin-Alexa 488 or 633, 2 h). Slices incubated with fluorophores were mounted in glycerol and examined with a confocal microscope (Olympus FV 300).

Perforated patch-clamp recordings. To avoid changing the intracellular Cl⁻ concentration $([Cl⁻]_i)$, we made perforated-patch recordings using the cation-selective ionophore gramicidin (Myers and Haydon, 1972; Kyrozis and Reichling, 1995). The gramicidincontaining pipette solution was made for each experiment from a stock solution (5 mg/ml in DMSO, stored at -20°C) in prefiltered intracellular solution to yield a final concentration of 5 μ g/ml. The solution was used within 2 h after preparation. To facilitate gigaseal formation, the tip of the electrode was filled with gramicidin-free patch solution containing Alexa 488 (250 μ M) by briefly (~2-4 s) immersing the back of the pipette into the solution. The liquid junction potential (4 mV) was corrected off-line.

BrdU labeling. To determine the date of birth of putative CC-contacting neurons we injected neonatal rats (P0–P5, n = 9) daily with BrdU (100 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich). The animals were killed 1, 10, and 17 d after the last BrdU injection. Pregnant rats (n = 4) were injected with BrdU (100 mg/kg, i.p.) every 48 h between embryonic day 7-17 (E7-E17). Pups were killed during the first five postnatal days and 30 d after the last injection. Transverse spinal cord sections ($60-80-\mu$ m-thick) were rinsed in PB and incubated in 2N HCl (30 min) followed by incubation with proteinase K at 0.2 mg/ml (10 min). After several rinses, sections were blocked with 5% goat serum in PB with 0.3% Triton X-100 and placed overnight in mouse anti-BrdU diluted 1:500 in PB and 0.3% Triton X-100. After washing, the tissues were incubated with a secondary serum conjugated with a fluorophore (Alexa 488, Alexa 546, or Alexa 633; Invitrogen). BrdU labeling was then combined with immunohistochemistry for HuC/D, DCX, or PSA-NCAM.

Results

Immature neurons around the CC: molecular clues

The spinal cord of turtles contains cells attached to the CC that express the early neuronal marker HuC/D (Russo et al., 2004, 2008) and display functional properties of immature neurons at various differentiation stages (Russo et al., 2004). Based on previous anatomical (Vigh and Vigh-Teichmann, 1998) and immunohistochemical (Stoeckel et al., 2003) studies, we speculated that the ependyma of neonatal rats shares common features with those of lower vertebrates and thus may contain cells with characteristics of immature neurons. To test this possibility we analyzed the expression of HuC/D in the spinal cord of neonatal rats (P0-P5). We found that HuC/D was robustly expressed in the gray matter of the spinal cord (data not shown). Figure 1A shows a subpopulation of cells within the ependymal layer that also expressed HuC/D. In most cases, a single process could be seen projecting to the CC lumen (Figs. 1A1, 2A, arrowhead). Hu proteins are among the first markers expressed in newborn neurons (Marusich et al., 1994) but they are also present in mature neurons in which are thought to participate in some forms of plasticity (Deschênes-Furry et al., 2006). To test whether HuC/D+ cells close to the CC were either mature or immature neurons, we combined the use of the mature neuronal marker NeuN (Mullen et al., 1992; Kuhn and Peterson, 2008). We found that none of the HuC/D+ cells within the ependymal layer coexpressed NeuN (Fig. 1A2), whereas all HuC/D+ cells outside this region did (Fig. 1A2,3, arrowheads).

To analyze the relative frequency of HuC/D+ cells contacting the CC, we combined HuC/D immunohistochemistry with the nuclear stain Syto 64 (Fig. 1*B*). From a total of 586 nuclei counted in 20 randomly chosen optical sections, only 56 corresponded to HuC/D+ cells (Fig. 1*B1*, arrows). As shown in Figure 1*B*, the nuclei of HuC/D+ cells (Fig. 1*B2*, empty arrowhead) had a round shape and a light staining that contrasted with the elongated and darker nuclei of neighboring cells (Fig. 1*B2*,3, arrowheads).

As stated by Peters et al. (1991a), the ependyma consists of a layer of epithelial cells that line the walls of the ventricles of the brain and the CC of the spinal cord. Because HuC/D+ cells contribute to line the CC through a narrow apical process, we asked whether they could be a specialized type of ependymal cell. To test this possibility, we combined the ependymal cell marker S100 β (Chiasson et al., 1999; Spassky et al., 2005: Carlén et al., 2009) with HuC/D immunostaining. Most of the CC was lined by S100 β + ependymal cells (Fig. 1*C1*; supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). However, HuC/D+ cells (Fig. 1*C2*, arrowheads) did not coexpress the ependymal cell marker S100 β (Fig. 1*C2*,3, arrowheads) supporting the idea that—although within the ependymal layer—they are a distinct cell type different from ependymocytes.

The fact that some CC-contacting cells in the rat had a morphological and molecular phenotype of immature neurons raised the possibility that these cells may be similar to neuroblasts in



Figure 4. Functional phenotypes of CC-contacting cells: passive responses versus Ca²⁺ electrogenesis. *A1–3*, Responses of a CC-contacting cell to a series of current steps (*1*). Current-voltage (C/V, *2*) relationship of the cell shown in *1*. Notice the passive responses to depolarizing current pulses and the linear behavior in the C/V plot. The excitation of Alexa 488 revealed that the cell recorded in 1 appeared dye coupled with neighboring cells (*3*). Conventional epifluorescence and DIC in a living slice. *B1–4*, Active response properties in a CC-contacting cell. A depolarizing current pulse produced a slow potential (*1*, arrowhead). Notice the presence of spontaneous synaptic activity (*1*, arrows). The slow potential could be generated in an all-or-non manner by a short-lasting current pulse (*2*) or by a barrage of spontaneous synaptic potentials (*3*, arrow). As revealed by injection of Alexa 488, the cell recorded in *2* had a single short process contacting the CC (*4*, arrow; conventional epifluorescence). *C1*, *2*, Slow depolarizing potential in a CC-contacting cell (*1*). A small and brief transient appeared at the beginning of the active response (*1*, arrow). The slow response was not sensitive to 1 μ m TTX but the brief transient disappeared, indicating a small contribution of Na ⁺ channels (*2*). Addition of 3 m Mn²⁺ completely blocked the slow depolarizing potential (*2*), indicating the involvement of Ca²⁺ channels. *D1*, *2*, Slow spike in response to a transient hyperpolarization (*1*). The slow response had a threshold close to -50 mV. The low threshold response was not blocked by TTX (1 μ M) but was abolished by 300 μ M Ni²⁺ (*2*). *A*, P3 rat; *B*, P2 rat; *C*, P4 rat; *D*, P1 rat.

neurogenic niches of the adult brain. We thus tested whether HuC/D+ cells also expressed DCX and PSA-NCAM, which are well known markers of immature neurons in neurogenic niches of the adult mammalian brain (Kuhn and Peterson, 2008). Double labeling experiments showed that most HuC/D+ cells also expressed DCX (104 of 105) (Fig. 2A1-3, arrows) with only one HuC/D+ cell that expressed little or no reactivity against DCX (Fig. 2*A*1–3, empty arrowhead). On the other hand, there were cells that expressed DCX but not HuC/D (7 of 111) (Fig. 2A1-3, empty arrow). PSA-NCAM immunoreactivity with a characteristic punctate pattern on the surface of the membrane was also present in HuC/D+ cells (38 of 46) (Fig. 2*B1*–3, arrowhead in 2). Finally, most DCX+ cells also expressed PSA-NCAM (61 of 67) (Fig. 2*C1*–3, arrow). These results indicate that there was a slight heterogeneity within the population of cells that expressed markers of immature neurons.



Figure 5. Single spiking CC-contacting cells. *A1–3*, Response of a cell in the ependyma to a series of current pulses. A 500 ms depolarizing current pulse applied at the resting membrane potential produced a small single fast spike followed by damped oscillations of the membrane potential (*1*). In this cell, a brief depolarizing current pulse applied at hyperpolarized membrane potentials produced a fast single spike followed by a slow depolarizing potential (*2*). Confocal image of the cell shown in *1* and *2* (*3*). Notice the cell body connected to the CC by a single process and several short neurites arising from the basal pole. *B1–3*, Single spiking cell (*1*) with an action potential that had a repolarizing phase without depolarizing afterpotential (*2*). This cell had a small cell body that contacted directly the CC lumen and very short processes (*3*). *C*, Response to the same depolarizing current pulse applied at two levels of hyperpolarizing bias current. The delayed depolarization when the cell was stimulated from hyperpolarizing potential generation (red). *D1*, *2*, The action potential (*1*) was blocked by 1 μm TTX (*2*). *E1–3*, A biocytin-filled single spiking cell (*1*) expressed HuC/D (*2*, *3*). All images are Z-stack projections. *A*, P2 rat; *B*, P1 rat; *C*, P4 rat; *D*, P1 rat; *E*, P3 rat.

We next analyzed the ultrastructure of HuC/D+ cells by performing preembedding immunoelectron microscopy. Figure 3A shows a HuC/D+ cell within the ependymal layer (Fig. 3A1, arrowhead) that was subsequently analyzed with TEM (Fig. 3A2). The brown precipitate that allowed identifying the cell under light microscopy (Fig. 3A1) appeared under TEM as an electron dense granular material in the perinuclear region (Fig. 3A2, inset) that resulted from the reaction of the DAB-HRP complex with Os₄. The nucleus of the HuC/D+ cell had a characteristic round profile (Fig. 3A2, see N) with a light content that contrasted with the elongated shape and dark chromatic masses of the HuC/Dependymal cells (Fig. 3A2, see E). The occurrence of round nuclei with most of the chromatin in an extended form is one of the features considered as characteristic of neurons (Peters et al., 1991b). Because HuC/D are RNA-binding proteins (Deschênes-Furry et al., 2006), the DAB reaction was intense mainly around the nucleus, and thus, it was often difficult to unambiguously trace the apical process of HuC/D+ cells to the CC lumen. Since DCX immunohistochemistry labeled apical processes more robustly (see Fig. 2C1), we made immunoelectron microscopy for DCX+ cells within the ependymal layer (Fig. 3B1, arrowhead). In

this case, the Os-DAB precipitate (Fig. 3B2, lower inset) was present in the apical process contacting the CC lumen (Fig. 3B2, upper inset). Note that similar to the HuC/D+ cell shown above, the nucleus of the DCX+ cell was round shaped and with light chromatin content. The morphological features provided by our immunoelectron microscopic images allowed us to identify presumptive neuronal-like cells in better preserved tissue, in which detergents were not used. As shown by Stoeckel et al. (2003) for P2X₂-expressing CCcontacting cells, we found that some neuronal-like cells with a round nucleus (Fig. 3C) bear a single cilium (Fig. 3C, arrow in inset). The fine structural organization of the cytoplasm particularly rich in free ribosomes and processes lacking both longitudinally oriented microtubules and microfilaments also suggested an immature cell phenotype (Fig. 3D1,2). In line with this, we found that neurofilament-M-a marker of mature neurons (Kuhn and Peterson, 2008)-was not expressed in CC-contacting cells but only in cells outside the ependyma (data not shown).

Immature neurons around the CC: functional clues

Athough the immunohistochemical data shown above suggested that some CCcontacting cells were similar to neuroblasts, the expression of DCX and PSA-NCAM does not by itself prove their neuronal nature, because these markers have been occasionally reported in glial progenitors and glial cells (Kuhn and Peterson, 2008). In addition, the early neuronal marker HuC/D and DCX are also expressed in a subset of neuronal pro-

genitors in the embryonic spinal cord (Marusich et al., 1994) and cerebral cortex (Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2008). We therefore made patch-clamp recordings to analyze the electrophysiological properties of CC-contacting cells under the assumption that functional clues have been very useful to clarify the nature of cells in potential neurogenic niches (van Praag et al., 2002; Bischofberger and Schinder, 2008). As shown in Figure 4, some cells (n = 34) had an electrophysiological phenotype characterized by relatively low input resistances (185.4 \pm 40.5 M Ω , n = 34), hyperpolarized resting membrane potentials (-82.1 ± 2.2, n = 34), and passive responses to depolarizing current pulses (Fig. 4*A1*) with linear voltage-current relationships (Fig. 4*A2*). The injection of Alexa 488 revealed a cluster of dye-coupled ependymocytes that lined a substantial portion of the CC (Fig. 4A3). Other cells, however, had active response properties when depolarized from rest. This cell type had a high input resistance $(5.63 \pm 0.87 \text{ G}\Omega, n = 19)$ and responded with a slow potential when the membrane was depolarized beyond a certain threshold (Fig. 4*B1*). As shown in Figure 4*B1*, many of these cells (15 of 19) showed spontaneous barrages of synaptic potentials (arrows). The plateau-like potential could be generated in an all-or-none

manner by a short-lasting current pulse, outlasting the stimulation by hundreds of milliseconds (Fig. 4B2). Notice that the slow potential could also be triggered by a spontaneous barrage of synaptic potentials (Fig. 4B3, arrows). The cell recorded in Fig. 4B had a round cell body connected to the CC lumen by a single short process (Fig. 4B4, arrow). The slow regenerative potential remained in the presence of TTX (1 μ M) but was blocked by 3 mM Mn^{2+} and was thus mediated by a Ca²⁺ conductance (Fig. 4C1,2). However, in this cell a small early component (Fig. 4C1, arrow) was blocked by TTX, suggesting a minor contribution of voltagegated Na⁺ channels to the earliest part of the response. We also observed a small and slow spike as a rebound response to a transient hyperpolarization (Fig. 4D1). The rebound response had a threshold of \sim -50 mV and thus resembled the low threshold spike (LTS) mediated by T-type Ca²⁺ channels. Indeed, the addition of low concentrations of Ni²⁺ (300 μ M, n =3) that block T-type but not L-type Ca²⁺ channels (Russo and Hounsgaard, 1996) abolished the LTS (Fig. 4D2).

A second class of cells with active properties (n = 94) had the ability to generate a single fast spike often followed by nonregenerative membrane potential oscillations in response to a sustained depolarization (Fig. 5A1, B1). This cell type had resting potentials of ~ -60 mV (-61.4 \pm 1.49 mV, n = 85) and a mean input resistance of 3.95 \pm 0.29 G Ω (n = 85) that was significantly smaller than that of cells with slow depolarizing potentials (p < 0.05). The single full spike had an amplitude of \sim 38 mV (38.27 \pm 1.52 mV, n = 77) and a half-amplitude duration of \sim 6 ms (6.21 ± 0.55 ms, n =77). In some cases (49 of 94 cells), a short lasting depolarizing current pulse evoked a single spike followed by a slow depolarizing potential similar to that of the nonspiking cell already described (Figs. 4B3, 5A2), whereas in the rest of cells the spike had a fast repolarizing phase (Fig. 5B2). Notice, however, that these spikes had no slow after-hyperpolarization (sAHP) as typically observed in spinal neurons (Russo and Hounsgaard, 1999).



Figure 6. Repetitive spiking CC-contacting cells. *A*1– *4*, Responses to a series of current pulses of a cell that fired repetitively (*1*). Notice the occurrence of spontaneous synaptic events. The first (red), second (green) and third (blue) action potentials during the spike train are shown superimposed in *2*. Notice the increase in threshold and half-amplitude duration during the spike train. The action potential produced by a brief current pulse lacks a slow after-hyperpolarization (*3*). Confocal Z-stack projection (*4*) of the cell recorded in *1*. The single process attached to the CC had an endfoot (*4*, encircled) with a single thin cilium-like process (*4*, arrow in inset). *B*, Camera lucida drawing of the cell recorded in *A*. Notice the presence of long ($>30 \ \mu$ m) branching neurites arising from the cell body. *C1*, *2*, The fast action potentials (*1*) in repetitive spiking cells were blocked by TTX (1 μ M, *2*). However, a slow depolarizing potential remained in the presence of TTX (*2*, arrow). *D1*–4, CC-contacting cell with a more robust repetitive spiking (*1*) than that shown in A. The first (red), second (green) and third (blue) action potential in this cell had a well developed sAHP (*3*, arrow). The image in *4* (conventional epifluorescence) shows that this cell was still connected to the CC via a thin single process (arrow), whereas a conspicuous branching neurite originated from the basal pole. *E1*–*3*, A biocytin-filled cell (*1*, arrow) with a repetitive spiking phenotype (*1*, inset; calibration: 20 mV, 10 pA and 100 ms) connected to the CC by a single process and with well developed neurites. Immunocytochemistry for NeuN showed several reactive nuclei (*2*, arrowhads). The merged images (*3*) show that the recorded cell did not express NeuN (*2*, *3*, arrow). Confocal optical plane. *A*–*C*, P3 rats; *D*, P5 rat; *E*, P2 rat.

In most cells, the application of the same depolarizing current from increasing levels of hyperpolarizing bias current produced a delayed depolarization that blocked the generation of an action potential (Fig. 5*C*), suggesting the presence of an A-type K⁺ current (I_A). As expected, the fast spike was blocked by 1 μ M TTX (Fig. 5*D*). The morphology of single spiking cells was similar to that shown by the immunohistochemistry for immature neuronal markers, with a cell body connected to the CC lumen by a single process (Fig. 5*A*3). Intracellular injection of biocytin allowed the discrimination of finer morphological details than those revealed by immunohistochemistry. Overall, the intracellular staining of CC-contacting cells with active membrane properties revealed pleomorphic morphologies (see below and supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). For example, some single spiking cells had neurites that originated from the cell body and projected away from the CC (Fig. 5*A*3). In other cases, these cells had a simpler morphology with a small cell body close the CC lumen and short thin processes (Fig. 5*B3*). To confirm that single spiking cells belonged to the group of cells expressing immature neuronal markers, we combined the histochemical reaction to intracellularly injected biocytin with immunohistochemistry against HuC/D. Figure 5*E* shows a single spiking CC-contacting cell (Fig. 5*E1*) that expressed HuC/D (Fig. 5*E2*,3).

Finally, we found cells attached to the CC that were able to fire Na⁺ action potentials repetitively (Fig. 6A1,D1) (n = 52). These cells had a resting potential of ~ -70 mV (-71.11 ± 2 mV, n =42) and a mean input resistance of 4.25 \pm 0.3 G Ω (n = 46) that was not statistically different from that of single spiking cells. However, the spike amplitude (56.38 \pm 2.1 mV, n = 46) and half-amplitude duration $(3.77 \pm 0.35 \text{ ms}, n = 44)$ were significantly larger and briefer than those in single spiking cells (p <0.05). In this group of cells the action potential waveform varied substantially and seemed correlated with the ability to fire repetitively (Fig. 6A3,D3). Some cells were able to fire repetitively but the half-amplitude duration during the spike train increased considerably (Fig. 6A1,2). Other cells had a more robust repetitive spiking, with little spike amplitude attenuation and broadening during the train (Fig. 6D1,2). The action potential in cells with robust repetitive spiking had a well developed sAHP (Fig. 6D3, arrow). These findings suggest that the ability for repetitive spiking depends on action potential maturation. As expected, the spikes of repetitive spiking cells were blocked by 1 μ M TTX (Fig. 6C1,2). Only in a minority of cells (19 of 52) a slow TTX-resistant depolarizing potential could still be observed (Fig. 6C2, arrow) suggesting that as the ability to fire repetitively develops, the prevalence of Ca²⁺ electrogenesis diminishes.

All electrophysiological phenotypes were found at ages between P0 and P5 (supplemental Fig. 3, available at www. jneurosci.org as supplemental material). A χ^2 test at p < 0.05revealed that there was no relationship between the particular functional phenotype and the age of rats within the analyzed temporal window (P0–P5).

Although repetitive spiking cells had similar morphological features as those of single spiking cells, they had more developed neurites (Fig. 6A4, B, D4, E1). Repetitive spiking cells frequently had several processes arising from the cell body that could be followed projecting into the surrounding gray matter for >30 μ m (Fig. 6*B*, camera lucida drawing, *D*4,*E*1). Nevertheless, a single process attached to the CC lumen by a wide endfoot could still be identified in repetitive spiking cells (Fig. 6A4,D4, arrow, E1). In some cells, a closer examination of the CC-contacting endfoot showed a single thin process protruding into the CSF (Fig. 6A4, arrow in inset). It is likely that the thin process corresponded to a single cilium, because spiking cells expressed the satellite centriolar protein PCM-1 in the apical process close to the CC lumen (supplemental Fig. 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Despite the more mature firing pattern, repetitive spiking cells in contact with the CC did not express NeuN (Fig. 6*E1–3*).

Ionic mechanisms underlying the excitability of spiking CC-contacting cells

Our current clamp data suggest that single and repetitive spiking cells are distinct cell phenotypes, probably reflecting different stages of differentiation. To explore the ionic basis of the excitability in these two types of cells, we studied the underlying currents in voltage-clamp mode focusing on Na⁺ and K⁺ voltage-gated conductances. Both in single (Fig. 7A1) and repetitive spiking (Fig. 7A2) cells, depolarizing voltage steps produced a brief TTX sensitive inward current followed by outward currents. The Na⁺ current (I_{Na}) density for membrane potentials



Figure 7. Na⁺ current (I_{Na}) in single and repetitive spiking cells. *A*, Leak subtracted currents in single (1) and repetitive (2) spiking cells in response to depolarizing voltage steps applied from a holding potential of -70 mV. As expected the inward currents were blocked by 1 μ m TTX (traces in upper right corner). *B*, Peak I_{Na} density at different membrane potentials in single (red) and repetitive (black) spiking cells. *A*₁, P3 rat; *A*₂, P5 rat; *B*, P1–P5 rats.

more depolarized than -40 mV was significantly smaller in single spiking cells (Fig. 7*B*) (p < 0.05, n = 7 cells).

Outward currents were analyzed using different voltage clamp protocols. In single spiking cells, depolarizing voltage steps from a holding potential of - 90 mV evoked currents that seemed to have non-inactivating and inactivating components (Fig. 8A1). To separate these two components we applied the same family of voltage steps but from a holding potential of -30 mV (Fig. 8A2). Under these conditions, we observed an outward current with a slower onset and no inactivation during the 100 ms voltage step, thus suggesting the involvement of delayed rectifier K^+ (I_{KD}) channels. By subtracting the delayed non-inactivating current (Fig. 8A2) from the total current (Fig. 8A1), we were able to separate an outward current with a fast onset and prominent time dependent inactivation (Fig. 8A3). A steady state inactivation protocol showed a strong voltage dependence of the inactivation, a typical feature of I_A (Fig. 8B) (Connor and Stevens, 1971). The same voltage clamp protocols in repetitive spiking cells gave similar results (Fig. 8C,D). In both types of cells, TEA (10 mM) blocked the non-inactivating component of the outward current mediated by the delayed rectifier (I_{KD}) (Fig. 8*E*1,2) but spared the inactivating current which was blocked by 4-AP (2 mM) (Fig. 8E3), a selective blocker of A-type K⁺ channels. Single and repetitive spiking cells differed in their I_A , being the time course of inactivation the most striking difference. The inactivation processes were significantly different (p < 0.01, n = 10) and could be fitted to a single exponential function with a time constant (τ) of 28.76 \pm 2.3 ms (n = 10) for single spiking cells (Fig. 8*F1*) and $12.7 \pm 1.3 \text{ ms} (n = 10)$ for repetitive spiking cells (Fig. 8 F2). The

peak I_A density was also significantly larger in single spiking cells (Fig. 8*G*) (p < 0.05, n = 6). However, the inactivation curves were similar with a V_h for inactivation of -66.96 ± 1.52 mV and $-65.7 \pm$ 1.95 mV for single and repetitive spiking cells, respectively (Fig. 8*H*) (n = 6). The V_h for the activation process were 21.45 \pm 1.3 mV and 26.67 \pm 0.66 mV for single and repetitive spiking cells (Fig. 8*H*) (n =6). The peak $I_{\rm KD}$ density (Fig. 8*I*) and the activation curves (Fig. 8*J*) for $I_{\rm KD}$ in single ($V_h = 8.44 \pm 0.86$ mV, n = 6) and repetitive ($V_h = 19.46 \pm 1.74$, n = 6) spiking cells were similar.

GABAergic signaling

GABA plays an important part during development by providing an excitatory input critical for neuronal maturation (Owens and Kriegstein, 2002). We reasoned that if CC-contacting cells were immature neurons in different stages of differentiation, GABAergic signaling should be present and may have a variety of effects. In conventional whole-cell recordings, pressure application of GABA produced a current in all cases (4 of 4) that reversed close to the expected Cl⁻ equilibrium potential (E_{Cl}) imposed by the pipette solution (Fig. 9A1,2). As expected, GABA_A receptors mediated the GABA-induced current because gabazine (10 μ M)—a selective GABA_A receptor antagonist-blocked the response (Fig. 9A3) (3 of 3). To explore the actual effect of GABA on CC-contacting cells, we used the gramicidin-perforated patch-clamp technique. Gramicidin generates cationselective pores in the membrane (Myers and Haydon, 1972; Kyrozis and Reichling, 1995) and therefore does not modify the normal intracellular Cl⁻ concentration $([Cl⁻]_i)$. In some cells (6 of 12) recorded with the gramicidin-perforated patch technique, GABA had an inhibitory action by eliciting a hyperpolarization from rest (Fig. 9B1) generated by an outward current (Fig. 9B2). The GABA-induced current in these cells reversed between -60 to $-80 \text{ mV} (-67.78 \pm 3.32, n = 6)$ (Fig. 9B2,3). As shown for the experiment illustrated in Figure 9B, to confirm that the recordings were done in the perforated patch mode, we excited the fluorophore



Figure 8. K⁺ currents in single and repetitive spiking cells. *A***1**–**3**, Outward currents evoked in a single spiking cell during 100 ms depolarizing voltage steps after a 75 ms prepulse to -90 mV (**1**). The currents evoked with the same protocol as in **1** but after a prepulse to -30 mV have a slow onset with no inactivation (**2**), suggesting a delayed rectifier (I_{KD}). The difference between the currents obtained with the protocols in **1** and **2** revealed a current with fast onset and strong time dependent inactivation (**3**) typical of A-type currents (I_A). **B**, Steady state inactivation protocol shows the voltage dependence of I_A inactivation. **C**, **D**, Same protocols as in **A** and **B**, but in a repetitive spiking cell. **E1–3**, Pharmacological separation of outward currents. TEA (10 mM) blocked the sustained component of the total outward current (**1**, **2**), whereas 2 mM 4-AP blocked the transient K⁺ current (**3**). **F1**, **2**, Time course of I_A inactivation for single (**1**) and repetitive (**2**) spiking cells. **H**, Activation and inactivation curves for I_A in single (red, SS) and repetitive (black, RS) spiking cells. **J**, Activation curves for I_{KD} in single (red, SS) and repetitive (blue, RS) spiking cells. **J**, Activation curves for I_{KD} in single (red, SS) and repetitive (blue, RS) spiking cells. **J**, Activation curves for I_{KD} in single (red, SS) and repetitive (blue, RS) spiking cells. **J**, Activation curves for I_{KD} in single (red, SS) and repetitive (blue, RS) spiking cells. **J**, Activation curves for I_{KD} in single (red, SS) and repetitive (blue, RS) spiking cells. **A**, B, P4 rat; **C**, **D**, P1 rat; **E**, P3 rat; **F**, P1–P5 rats; **G–J**, data pooled from P1 to P3 rats for SS, and P2 and P3 rats for RS.

contained in the pipette and observed no diffusion into the cell (Fig. 9*B4*, upper image). After rupturing the membrane by applying extra suction, the dye filled the cell within minutes and we could confirm that the recorded cell contacted the CC (Fig. 9*B4*, arrow in lower image) and had conspicuous neurites (Fig. 9*B4*, arrowhead in lower image). In other cells (6 of 12), GABA produced depolarizing responses from rest (Fig. 9*C1*) that could even evoke spike firing (Fig. 9*D1*) (2 of 6). The reversal potentials for the GABA-induced current in this group of cells varied from -43 to

 $-55 \text{ mV} (-46.7 \pm 1.9, n = 6)$ (Fig. 9*C*2,*D*2). Gabazine (10 μ M) also blocked the GABA-induced responses recorded with the perforated patch-clamp technique (3 of 3, data not shown). The various reversal potentials for GABA-induced currents revealed different [Cl⁻]_i in CC-contacting neurons, probably because of different levels of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 as typically found in developing neuroblasts (Tozuka et al., 2005).

Together, our findings support the idea that some cells lining the CC of neonatal rats are immature neurons at different stages



Figure 9. GABA-induced responses in CC-contacting immature neurons. *A1–3*, Responses of a CC-contacting cell to puff application (10 ms) of GABA (100 μ M) at different membrane potentials (*1*). In conventional whole-cell recordings the GABA-induced current reversed at the expected Cl⁻ equilibrium potential imposed by the internal solution (*2*). GABA_A receptors mediated the GABA-induced current because gabazine (10 μ M) blocked the response (*3*). *B*, *D*: GABA-induced responses recorded with the gramicidin perforated-patch technique. *B1–4*, In some cells, GABA application in current-clamp mode induced a strong hyperpolarizing response from rest (*1*). The GABA-induced currents (*2*) of this cell reversed at – 62 mV (*3*). The images in *4* show the recording conditions in perforated patch mode and after rupturing the patch. Confirmation of perforated patch is evidenced by the lack of diffusion of Alexa 488 into the cell (upper image). After completion of the experiment, the membrane was ruptured and the dye diffused rapidly into the cell (lower image). Notice the apical process in contact with the CC lumen (*4*, arrow) and the well developed neurite arising from the cell body (*4*, arrowhead). Conventional epifluorescence. *C1*, *2*, Depolarizing response induced be polarization provoked spike firing in a single spiking CC-contacting cell (*1*). The inset shows the initial depolarization that generated the action potential. The GABA-induced current in this cell reversed at – 43 mV (*2*). *A*, P5 rat; *B*, P1 rat; *C*, P2 rat; *D*, P5 rat.

of maturation. It is possible that as the animal develops, these cells acquire the molecular and functional phenotypes of mature neurons. To explore this possibility, we made patchclamp recordings in rats between P15–P18, because during the first two postnatal weeks, there is a fast maturation of the properties of spinal neurons and the rats acquire an adult pattern of locomotion (Vinay et al., 2000). We found that CC-contacting cells in these juvenile animals still displayed electrophysiological phenotypes of immature cells that fired a single spike (n = 4) (Fig. 10A1–3; compare with Fig. 5A1,2) or fired repetitively (n = 3, data not shown). In line with these results, the ependyma of adult rats remained devoid of NeuN+ cells (Fig. 10*B*), whereas as described by Stoeckel et al. (2003), PSA-NCAM cells were still abundant (Fig. 10*C*). These findings suggest that even beyond the early postnatal period these CC- contacting cells keep functional and molecular traits of immature neurons.

Acid and ATP mediated responses

Previous studies have shown that a subset of CC-contacting cells express the ATP activated P2X₂ receptor (Stoeckel et al., 2003) and the polycystic-kidney-disease-like ion channel PKD2L1 (Huang et al., 2006), that belong to the set of channels implicated in sensing changes in pH. We reasoned that if CC-contacting immature neurons are sensory cells specialized for detecting changes in H⁺ concentration, they should respond selectively to changes of pH with respect to other spinal neurons. A brief puff (100-300 ms) of Ringer's solution buffered at pH 6 onto CC-contacting neurons produced a strong excitation (Fig. 11A1,2,4) generated by an inward current that lasted ~ 3 s (Fig. 11A3). Spinal neurons in the ventral or dorsal horn with a mature spike firing pattern (Fig. 11B1,4) also responded strongly to similar changes in pH (Fig. 11B2,3). As expected, CCcontacting cells also responded to the application of ATP (100 μ M) with a strong excitation (Fig. 11C1,2) generated by a conspicuous inward current at resting potential (Fig. 11C3). The I/V relationship of the ATP-induced current showed a strong rectification with very little current flowing at depolarized potentials (Fig. 11C3,4), a typical behavior of currents mediated through P2X₂ receptors (North, 2002).

Birth date of CC-contacting neurons

In neurogenic niches of the adult brain, proliferating neurogenic precursors transiently express DCX (Brown et al., 2003). We therefore asked whether immature neurons in the ependyma of neonatal rats could be generated postnatally. To address this question, we injected BrdU daily (100 mg/kg) between P0 and P5 (n = 9) and let the animals survive for 1 d (n = 2), 10 d (n = 4), and 17 d (n = 3) (Fig. 12*A*).

We then combined BrdU labeling with immunohistochemistry for HuC/D at each time point. Although we found several BrdU+ nuclei around the CC (Fig. 12*B*, arrowhead), we did not find colocalization of BrdU and HuC/D staining in the same cell (Fig. 12*B*, arrow). Because a slow cell cycle with a short S phase may lower the probability that potential neurogenic precursors uptake BrdU, we combined immunohistochemistry for PCNA—an endogenous cell cycle protein expressed in all phases of the cell cycle of proliferating cells—and DCX. Similar to the data obtained with BrdU, we found many cells that expressed PCNA (Fig. 12*C*, arrow) in the ependyma of neonatal rats but none colocalized with DCX (Fig. 12*C*, arrowhead). We then applied BrdU (100 mg/kg, i.p.) to pregnant rats between E7–E17 (n = 4) and killed the newborn rats between P0 and P5 (Fig. 12*D*). This protocol revealed many cells in the ependyma that colocalized HuC/D and BrdU (Fig. 12*E*, arrow). Although it is still possible that HuC/D+ or DCX+ cells are quiescent precursors, the fact that they do not express PCNA together with their ability to fire action potentials favors a postmitotic fate. Therefore, the most parsimonious interpretation of our birthdating experiments is that CCcontacting neurons are born in the embryo but retain molecular traits of immature neurons after birth. The diversity of electrophysiological phenotypes raises the possibility that these immature neurons go into standby mode at different stages of functional maturation.

Discussion

We show here that some CC-contacting cells in the rat display molecular and functional properties of immature neurons similar to those of adult neurogenic niches (Lledo et al., 2006). Their electrophysiological phenotypes suggest diverse stages of differentiation similar to those of spinal neurons in *Xenopus* embryos (Spitzer et al., 2000). Although CC-contacting neuroblasts were generated in the embryo, the expression of DCX and PSA-NCAM suggests they remain highly plastic (Bonfanti, 2006).



Figure 10. CC-contacting immature neurons in older rats. *A1–3*, Response properties of a CC-contacting cell in a P17 rat (*1*). Notice the generation of a single spike in response to a long lasting depolarization. A brief depolarizing current pulse applied from hyperpolarized membrane potential evoked a small, brief spike followed by a slow depolarizing potential (*2*). Intracellular injection of Alexa 488 showed a morphology similar to that observed in neonatal animals with a single process contacting the CC (*3*, arrow). Confocal Z-stack projection. *B*, Immunocytochemistry for NeuN shows many positive cells in a P21 rat. However, even at this age the ependyma was devoid of NeuN + nuclei. *C*, PSA-NCAM + cells appeared in a P40 rat. *B*, *C*, Confocal single optical planes.



Figure 11. Acid and ATP mediated responses in CC-contacting immature neurons. *A*1–4, Single spike evoked in a CC-contacting cell by a 500 ms depolarizing current pulse (1). The cell was strongly excited by a brief application of a Ringer's solution buffered at pH 6 (2). Currents induced by different puff durations in the same cell (3). Notice that even a 100 ms puff induced almost maximal currents (3, red trace). Increasing the duration to 200 ms slightly increased the peak current and prolonged the response (3, green trace). Further increases in puff duration did not change acid induced currents (blue trace). Injection of Alexa 488 confirmed the cell contacted the CC (4). *B*1–4, Repetitive spiking of a cell in the ventral horn in response to a depolarizing current pulse (1). A brief puff of an acidic Ringer's solution produced a strong excitation, with robust repetitive spike firing (2). The acid-induced currents were maximally activated even by a 100 ms puff (3). The image in 4 shows the morphology and the location (inset) of the ventral horn neuron. *C*1–4, Repetitive spiking CC-contacting cell (1, inset, calibration: 20 mV, 10 pA and 100 ms) was strongly excited by brief application of ATP (100 μm, 2). The ATP-induced inward current showed a strong rectification, becoming almost undetectable at a holding membrane potential of –20 mV (3, 4). *A*, P2 rat; *B*, P4 rat; *C*, P3 rat. All images are from conventional epifluorescence.



Figure 12. Birth date of CC-contacting neurons. *A*, BrdU protocol to test the generation of CC-contacting neuroblasts in the early postnatal life. *B*, Double-labeling for HuC/D and BrdU at P15. Although many ependymal cells proliferated in neonatal rats (arrowhead) none of them colocalized the early neuronal marker HuC/D (arrow). Confocal Z-stack projection. *C*, Some ependymal cells were positive for the cell cycle marker PCNA (arrow) but they did not colocalize with DCX (arrowhead). Single confocal optical plane. *D*, BrdU protocol to test the generation of CC-contacting neuroblasts in the embryo. *E*, In newborn rats injected between E7–E17 and killed at P0–P5 some HuC/D + cells showed BrdU + nuclei (arrow in main panel and orthogonal images). Confocal Z-stack projection. *C*, *E*, P2 rat.

Immature neurons in the ependyma: reminiscences of a neurogenic niche?

In turtles, some CC-contacting cells have the molecular and electrophysiological phenotypes of neuroblasts (Russo et al., 2004) immersed in a niche of neurogenic precursors (Russo et al., 2008). Similarly, a subpopulation of CC-contacting cells in the rat expressed the early neuronal marker HuC/D but not the mature marker NeuN, suggesting they are immature neurons similar to those in spinal neurogenic niches of low vertebrates. Our findings are in line with previous studies showing that some CC-contacting cells in adult rats expressed PSA-NCAM and may therefore be neuronal progenitors (Alonso, 1999). Indeed, most HuC/D+ cells also expressed PSA-NCAM and DCX, which are transiently expressed in neuroblasts within neurogenic niches of the embryo and the adult brain (Seki, 2002; Brown et al., 2003).

Although non-neuronal cell types occasionally express HuC/D, DCX, and PSA-NCAM (Kuhn and Peterson, 2008), our patch-clamp recordings demonstrated that CC-contacting cells belonged to the neuronal lineage. Ependymocytes expressed S100 β , had glial-like properties such as a low input resistance, passive responses, high resting membrane potentials, and extensive gap junction coupling (Bruni, 1998). In contrast, HuC/D+ cells were uncoupled, had high input resistances, and displayed regenerative responses suggesting they belong to the neuronal lineage and-although still contacting the CC-are different from ependymal cells.

Immature CC-contacting neurons: learning to spike?

The various electrophysiological phenotypes described in this study suggest different stages of maturation resembling the developmental sequence of developing spinal neurons in Xenopus (Spitzer et al., 2002). Indeed, CC-contacting cells dominated by Ca2+ electrogenesis strikingly resembled the earliest steps of differentiation of Xenopus spinal neurons that generate long lasting Ca²⁺ action potentials (Spitzer and Lamborghini, 1976). Ca²⁺ electrogenesis is critical for the differentiation of various neuronal features such as the expression of voltage-gated channels, neurotransmitter specification, and the growth of neurites (Spitzer et al., 2004). Interestingly, an LTS similar to that described here plays an important role in early differentiation during adult neurogenesis by amplifying small depolarizations (Schmidt-Hieber et al., 2004).

As spinal neurons in *Xenopus* embryos differentiate, they shift from slow Ca²⁺

potentials to fast Na⁺ action potentials (Spitzer and Lamborghini, 1976). This may be the differentiation stage of single spiking cells in the CC. At more advanced stages of maturation the ability to fire repetitively would appear. In addition to a larger and briefer action potential, repetitive spiking cells had an sAHP that single spiking cells lacked. In developing spinal neurones (Spitzer et al., 2000), repetitive firing is caused by the development of Ca^{2+} -dependent K⁺ channels that generate the sAHP needed to remove Na⁺ channel inactivation (Russo and Hounsgaard, 1999).

The maturation of spike firing is implemented via the regulation of functional voltage-gated channels in the plasma membrane (Spitzer and Ribera, 1998). CC-contacting cells firing repetitively had a higher $I_{\rm Na}$ density compared with single spiking cells. This agrees with the hypothesis that single and repetitive spiking cells represent a sequence of maturational stages because an increase in Na⁺ channel density is a common strategy during the maturation of the excitability in the embryo (Gao and Ziskind-Conhaim, 1998) and adult neurogenic niches (Carleton et al., 2003).

The appearance of potassium conductances in spinal neurons is important for maturation of the action potential and repetitive firing (Gao and Ziskind-Conhaim, 1998; Russo and Hounsgaard, 1999). CC-contacting neuroblasts had both a delayed rectifier and an I_A . The delayed rectifier had similar properties in single and repetitive spiking cells, in line with an early development of the delayed rectifier during differentiation (Spitzer and Ribera, 1998). In contrast, single spiking cells had a higher density of an IA with slower inactivation kinetics that activated at subthreshold potentials thus regulating spike generation. The slower kinetics of $I_{\rm A}$ inactivation in single spiking cells implies a wider time window for the control of excitability. This may be an efficient way to regulate the timing of Ca²⁺ influx, an event that plays a key role during differentiation (Spitzer et al., 2004). Faster I_A inactivation kinetics in repetitive spiking cells may be related to the maturation of the action potential waveform which is determinant for repetitive firing (Connor and Stevens, 1971). Interestingly, in the subventricular zone newborn neurons first express a delayed rectifier in the rostral migratory stream to add an I_A when they reach the olfactory bulb (Belluzzi et al., 2003). In a final step of maturation, newborn olfactory neurons acquire outward currents with a faster inactivation time course (Belluzzi et al., 2003). Therefore, the maturation of K⁺ currents in CC-contacting immature neurons may follow the same developmental plan as newborn neurons in adult neurogenic niches.

GABAergic signaling in the CC

CC-contacting immature neurons had functional GABA_A receptors. GABAergic signaling plays an important part in neuronal differentiation (Owens and Kriegstein, 2002). In developing neurons, GABA provides an excitatory drive because of a depolarized E_{Cl} (~-30-50 mV) generated by the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 (Ge et al., 2006). As neurons mature, they express the K^+ -Cl⁻ cotransporter KCC2 which lowers $[Cl^-]_i$ shifting the GABA effect from excitation to inhibition (Owens and Kriegstein, 2002). Our gramicidin-perforated patch-clamp recordings showed that GABA had effects that ranged from robust excitation to inhibition, supporting the hypothesis that CC-contacting neurons are in different maturational stages. Many CC-contacting cells had $E_{\rm Cl}$ more depolarized (~46 mV) than resting potentials. GABA-induced depolarizations may be sufficient to increase intracellular Ca²⁺ by activation of voltage-gated Ca²⁺ channels (Yuste and Katz, 1991; Owens et al., 1996). CC-contacting neurons with a more immature functional phenotype had a robust Ca²⁺ electrogenesis which may efficiently couple with GABA signaling to promote neuronal maturation (Owens and Kriegstein, 2002). Interestingly, in immature cortical neurons the

 Ca^{2+} increase induced by GABA is mediated by Ni²⁺-sensitive Ca^{2+} channels (Fukuda et al., 1998), similar to those that generated the LTS in the CC.

The intriguing nature of CC-contacting neurons

The similarities of CC-contacting neurons with those of neurogenic niches raised the possibility that they may be generated postnatally. Shechter et al. (2007) reported the generation of new DCX+ cells in the spinal cord of the rat. However, in agreement with previous studies showing that PSA-NCAM+ or $P2X_2$ + cells in the CC do not colocalize with BrdU injected in adult rodents (Alonso, 1999; Stoeckel et al., 2003), we did not find reliable evidences of postnatal generation of CC-contacting neurons. Instead, our study showed that these cells originated in the embryo because many colocalized with BrdU injected in pregnant rats.

The functional relevance of CC-contacting neurons is puzzling. One possibility is that they are sensory cells monitoring the composition of the CSF (Vigh and Vigh-Teichmann, 1998). Indeed, these cells express $P2X_2$ receptors (Stoeckel et al., 2003) and PKD2L1—a polycystic-kidney-disease-like ion channel (Huang et al., 2006) —which are sensitive to changes in pH. As Huang et al. (2006), we found that CC-contacting neurons were strongly excited by a drop in pH. Furthermore, these cells had functional $P2X_2$ receptors because ATP induced currents with an inward rectification characteristic for these channels (North, 2002). However, the fact that neurons away from the CC also responded vigorously to pH changes suggests that acid sensing is a general feature of spinal neurons (Baron et al., 2008).

The different maturational stages suggested by our study may reflect different birth times during late neurogenesis in the embryo. Alternatively, the different electrophysiological phenotypes may simply reflect heterogeneous physiological properties. Cell tracking with retroviral vectors combined with functional studies will help testing these possibilities. Although generated in the embryo, CC-contacting neurons maintained the expression of PSA-NCAM and DCX even in adult rats (Stoeckel et al., 2003; Shechter et al., 2007). Interestingly, a population of prenatally generated neurons in the paleocortex of the adult rat also express PSA-NCAM+ and DCX+ but not mature neuronal markers (Gómez-Climent et al., 2008). Because PSA-NCAM and DCX are involved in plasticity-related events such as cell migration and neurite outgrowth and regeneration (Couillard-Despres et al., 2005; Bonfanti, 2006), the CC region may retain a substantial degree of plasticity similar to neurogenic niches (Ming and Song, 2005). Indeed, in response to minimal spinal injury ependymal cells proliferate and migrate toward the lesion (Mothe and Tator, 2005; Meletis et al., 2008). In an experimental model of multiple sclerosis, Danilov et al. (2006) showed that some migrating cells were neurons. It is tempting to speculate that the ependyma of the rat spinal cord represents a reservoir of immature neurons in standby mode, which under circumstances such as injury or inflammation may resume their differentiation to incorporate within damaged spinal circuits.

References

- Alonso G (1999) Neuronal progenitor-like cells expressing polysialylated neural cell adhesion molecule are present on the ventricular surface of the adult rat brain and spinal cord. J Comp Neurol 414:149–166.
- Baron A, Voilley N, Lazdunski M, Lingueglia E (2008) Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons. J Neurosci 28:1498–1508.
- Barry PH, Diamond JM (1970) Junction potentials, electrode standard potentials, and other problems in interpreting electrical properties in membranes. J Membr Biol 3:93–122.
- Beattie MS, Bresnahan JC, Komon J, Tovar CA, Van Meter M, Anderson DK,

Faden AI, Hsu CY, Noble LJ, Salzman S, Young W (1997) Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. Exp Neurol 148:453–463.

- Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ (2003) Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. J Neurosci 23:10411–10418.
- Bischofberger J, Schinder AF (2008) Maturation and functional integration of new granule cells into the adult hippocampus. In: Adult neurogenesis (Gage FH, Kempermann G, Song H, eds), pp 299–319. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor.
- Bonfanti L (2006) PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. Prog Neurobiol 80:129–164.
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. J Comp Neurol 467:1–10.
- Bruni JE (1998) Ependymal development, proliferation, and functions: a review. Microsc Res Tech 41:2–13.
- Carlén M, Meletis K, Göritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabé-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisén J (2009) Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. Nat Neurosci 12:259–267.
- Carleton A, Petrenau LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming new neurons in the adult olfactory bulb. Nat Neurosci 6:507–518.
- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D (1999) Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. J Neurosci 19:4462–4471.
- Connor JA, Stevens CF (1971) Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. J Physiol 213:1–19.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. Eur J Neurosci 21:1–14.
- Danilov AI, Covacu R, Moe MC, Langmoen IA, Johansson CB, Olsson T, Brundin L (2006) Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis. Eur J Neurosci 23:394–400.
- Dervan AG, Roberts BL (2003) Reaction of spinal cord central canal cells to cord transaction and their contribution to cord regeneration. J Comp Neurol 458:293–306.
- Deschênes-Furry J, Perrone-Bizzozero N, Jasmin BJ (2006) The RNAbinding protein HuD: a regulator of neuronal differentiation, maintenance and plasticity. Bioessays 28:822–833.
- Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O (2002) Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. J Comp Neurol 453:131–144.
- Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I, Nishino H (1998) Changes in intracellular Ca2+ induced by GABAA receptor activation and reduction in Cl- gradient in neonatal rat neocortex. J Neurophysiol 79:439–446.
- Gao BX, Ziskind-Conhaim L (1998) Development of ionic currents underlying changes in action potential waveforms in rat spinal motoneurons. J Neurophysiol 80:3047–3061.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. Nature 439:589–593.
- Gómez-Climent MA, Castillo-Gómez E, Varea E, Guirado R, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ, Nácher J (2008) A population of prenatally generated cells in the rat paleocortex maintains an immature neuronal phenotype into adulthood. Cereb Cortex 18:2229–2240.
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH (2000) Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. J Neurosci 20:2218–2228.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Tränkner D, Ryba NJ, Zuker CS (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. Nature 442:934–938.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 96:25–34.
- Kuhn HG, Peterson DA (2008) Detection and phenotypic characterization of adult neurogenesis. In: Adult neurogenesis (Gage FH, Kempermann G, Song H, eds), pp 25–47. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor.

- Kyrozis A, Reichling DB (1995) Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentrarion. J Neurosci Methods 57:27–35.
- Lim DA, Huang YC, Alvarez-Buylla (2008) Adult subventricula zone and olfactory bulb neurogenesis. In: Adult neurogenesis (Gage FH, Kempermann G, Song H, eds), pp 175–206. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. Nat Rev Neurosci 7:179–193.
- Marusich MF, Furneaux HM, Henion PD, Weston JA (1994) Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. J Neurobiol 25:143–155.
- Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisén J (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. PLoS Biol 6:e182.
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci 28:223–250.
- Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M (2004) Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. Development 131:3133–3145.
- Mothe AJ, Tator CH (2005) Proliferation, migration, and diferentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord inury in the adult rat. Neuroscience 131:177–187.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. Development 116:201–211.
- Myers VB, Haydon DA (1972) Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. II. The ion selectivity. Biochim Biophys Acta 274:313–322.
- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Kriegstein AR (2008) Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. J Comp Neurol 508:28–44.
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. Physiol Rev 82:1013–1067.
- Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? Nat Rev Neurosci 3:715–727.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. J Neurosci 16:6414–6423.
- Peters A, Palay SL, Webster HdeF (1991a) The ependyma. In: The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells (Peters A, Palay SL, Webster HdeF, eds), pp 312–327. Oxford: Oxford UP.
- Peters A, Palay SL, Webster HdeF (1991b) The neuronal cell body. In: The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells (Peters A, Palay SL, Webster HdeF, eds), pp 14–69. Oxford: Oxford UP.
- Russo RE, Hounsgaard J (1996) Burst-generating neurones in the dorsal horn in an in vitro preparation of the turtle spinal cord. J Physiol 493:55–66.
- Russo RE, Hounsgaard J (1999) Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones. Prog Biophys Mol Biol 72:329–365.
- Russo RE, Fernández A, Reali C, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O (2004) Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurones in the turtle spinal cord. J Physiol 560:831–838.
- Russo RE, Reali C, Radmilovich M, Fernández A, Trujillo-Cenóz O (2008) Connexin 43 delimits functional domains of neurogenic precursors in the spinal cord. J Neurosci 28:3298–3309.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. Nature 429:184–187.
- Seki T (2002) Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. J Neurosci Res 69:772–783.
- Shechter R, Ziv Y, Schwartz M (2007) New GABAergic interneurons supported by myelin-specific T cells are formed in intact adult spinal cord. Stem Cells 25:2277–2282.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. J Neurosci 25:10–18.
- Spitzer NC, Lamborghini JE (1976) The development of the action potential mechanism of amphibian neurons isolated in culture. Proc Natl Acad Sci U S A 73:1641–1645.

- Spitzer NC, Ribera AB (1998) Development of electrical excitability in embryonic neurons: mechanisms and roles. J Neurobiol 37:190–197.
- Spitzer NC, Vincent A, Lautermilch NJ (2000) Differentiation of electrical excitability in motoneurons. Brain Res Bull 53:547–552.
- Spitzer NC, Kingston PA, Manning TJ, Conklin MW (2002) Outside and in: development of neuronal excitability. Curr Opin Neurobiol 12:315–323.
- Spitzer NC, Root CM, Borodinsky LN (2004) Orchestrating neuronal differentiation: patterns of Ca2+ spikes specify transmitter choice. Trends Neurosci 27:415–421.
- Stoeckel ME, Uhl-Bronner S, Hugel S, Veinante P, Klein MJ, Mutterer J, Freund-Mercier MJ, Schlichter R (2003) Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM,

GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. J Comp Neurol 457:159–174.

- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. Neuron 47:803–815.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Funtional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature 415:1030–1034.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I (1998) Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. Microsc Res Tech 41:57–83.
- Vinay L, Brocard F, Pflieger JF, Simeoni-Alias J, Clarac F (2000) Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. Brain Res Bull 53:635–647.
- Yuste R, Katz LC (1991) Control of postsynaptic Ca2+ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. Neuron 6:333–344.
STEM CELLS® TISSUE-SPECIFIC STEM CELLS

Spatial Domains of Progenitor-Like Cells and Functional Complexity of a Stem Cell Niche in the Neonatal Rat Spinal Cord

NICOLÁS MARICHAL,^a GABRIELA GARCÍA,^a MILKA RADMILOVICH,^{a,b} OMAR TRUJILLO-CENÓZ,^a RAÚL E. RUSSO^a

^aNeurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, CP11600, Montevideo, Uruguay; ^bDepartamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Avenida Gral. Flores 2125, CP 11800, Montevideo, Uruguay

Key Words. Progenitor cells • Nestin • Vimentin • Patch-clamp • Ependyma • Spinal cord

Abstract

During spinal cord development, progenitors in the neural tube are arranged within spatial domains that generate specific cell types. The ependyma of the postnatal spinal cord seems to retain cells with properties of the primitive neural stem cells, some of which are able to react to injury with active proliferation. However, the functional complexity and organization of this stem cell niche in mammals remains poorly understood. Here, we combined immunohistochemistry for cell-specific markers with patch-clamp recordings to test the hypothesis that the ependyma of the neonatal rat spinal cord contains progenitor-like cells functionally segregated within specific domains. Cells on the lateral aspects of the ependyma combined morphological and molecular traits of ependymocytes and radial glia (RG) expressing S100 β and vimentin, displayed passive membrane properties and were electrically coupled via Cx43.

Cells contacting the ventral and dorsal poles expressed the neural stem cell markers nestin and/or vimentin, had the typical morphology of RG, and appeared uncoupled displaying various combinations of K⁺ and Ca²⁺ voltage-gated currents. Although progenitor-like cells were mitotically active around the entire ependyma, the proliferative capacity seemed higher on lateral domains. Our findings represent the first evidence that the ependyma of the rat harbors progenitor-like cells with heterogeneous electrophysiological phenotypes organized in spatial domains. The manipulation of specific functional properties in the heterogeneous population of progenitor-like cells contacting the ependyma may in future help to regulate their behavior and lineage potential, providing the cell types required for the endogenous repair of the injured spinal cord. STEM CELLS 2012;30:2020-2031

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

INTRODUCTION

Neurogenesis in discrete niches of the adult mammalian brain represents a remarkable form of plasticity [1, 2]. Although the mature spinal cord in mammals is regarded as a non-neurogenic structure, the region surrounding the central canal (CC) shares key features with stem cell niches of the brain [3]. For example, cells lining the CC express markers of neural stem cells [4, 5] and keep the ability to proliferate [6, 7]. In addition, we recently reported that some CC-contacting cells in neonatal rats display molecular and functional features of immature neurons like those of adult neurogenic niches [8]. In response to spinal cord injury, ependymal cells proliferate and migrate to the lesion site where they differentiate into scar-forming astrocytes and myelinating oligodendrocytes [4, 9]. However, some studies in the normal and the diseased mammalian spinal cord suggest that ependymal cells may support neurogenesis [10–12].

Neural stem cell niches in the adult brain are formed by progenitors with heterogeneous properties that interact within a complex three-dimensional organization [13]. During spinal cord development, progenitors in the neural tube are arranged within domains that generate specific cell types [14, 15]. Some of these progenitors are retained postnatally in low vertebrates. In turtles, for example, neurogenic progenitors are functionally clustered on the lateral aspects of the CC [16]. Little is known about the functional complexity and organization of the spinal cord ependymal region as a stem cell niche in mammals.

We speculated that as in low vertebrates, the ependyma of the mammalian spinal cord during early postnatal life—when developmental refinement of spinal circuits still occurs (e.g., myelination)—may contain progenitor-like cells functionally

Author contributions: N.M.: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, financial support, and manuscript writing; G.G.: conception and design, collection of data, data analysis and interpretation; M.R.: collection of data and data analysis and interpretation; O.T.-C.: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, financial support; M.R.: conception, and manuscript writing; R.E.R.: conception and design, collection of data, data analysis and interpretation, financial support, and manuscript writing.

Correspondence: Raúl E. Russo, Ph.D., Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas, Clemente Estable, Avenida Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay. Telephone: 598-2-480-7862; Fax: 598-2-487-5548; e-mail: russoblanc@gmail. com Received March 23, 2012; accepted for publication June 19, 2012; first published online in STEM CELLS *Express* July 20, 2012. © AlphaMed Press 1066-5099/2012/\$30.00/0 doi: 10.1002/stem.1175

STEM CELLS 2012;30:2020–2031 www.StemCells.com

grouped within specific domains around the CC. To test this idea, we combined immunohistochemistry for molecular markers of neural stem cells and patch-clamp recordings of CC-contacting cells in neonatal rats. Here we show that the cells lining the lateral aspects and those on the dorsal and ventral poles of the CC constitute a heterogenous population of progenitor-like cells with characteristic molecular and functional properties. Most of the cells on the lateral aspects of the ependyma had the morphology of typical ependymocytes, exhibited passive membrane properties, and were electrically coupled via connexin 43 (Cx43). In contrast, the cells contacting the poles of the CC had the morphology of radial glia (RG) with a single cilium, were uncoupled, and displayed various combinations of K^+ and Ca^{2+} voltage-gated currents. Although, progenitor-like cells were mitotically active around the ependyma, the proliferative capacity seemed higher on cells contacting the lateral aspects of the CC. Our findings show an unforeseen functional and molecular diversity of progenitors within the ependyma of the rat spinal cord segregated within specific spatial domains. It is tempting to speculate that like in the embryo, these domains represent a reservoir of progenitors with different functional roles and lineage potential.

MATERIALS AND METHODS

General

Neonatal rats (Sprague Dawley, P0–P5) were used. For some electrophysiological and immunohistochemical experiments, P15–P21 and P40 rats were also used. All experimental procedures were performed in accordance with the ethical guide-lines established by our local Committee for Animal Care.

Immunohistochemistry

Animals were anesthetized (50 mg/kg, i.p.; Pentobarbital) and fixed by intracardiac perfusion with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). To identify the molecular phenotype of cells around the CC, the following primary antibodies were used (supporting information Table 1): anti-S100 β , anti-vimentin, anti-nestin, anti-3CB2, anti-brain lipid binding protein (BLBP), anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP), anti-Cx43, anti-platelet derived growth factor receptor α (PDGFR α), anti-NG2, anti-pericentrin, anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and anti-phosphohistone H3 (pH3). Tissues were sectioned with a vibrating microtome (60–80 μ m thick) and placed in PB with 0.5% bovine serum albumin (BSA) for 30 minutes and then incubated with primary antibodies in PB with 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, http://www.sigmaaldrich.com). Tissues were then incubated in secondary antibodies conjugated with different fluorophores or HRP. The HRP was revealed with 3,3-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich). Nuclei were stained with Syto 64 (Invitrogen, Carlsbad, CA, http://www.invitrogen.com). For double-labeling using anti-3CB2 and anti-Nestin antibodies raised in mice, we applied a sequential immunofluorescence procedure using anti-mouse IgG1 Alexa 488 and anti-mouse IgM Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, http://www.jacksonimmuno.com). The number of PCNA and pH3 positive nuclei was counted in 60- μ m-thick sections chosen randomly (30 sections from three animals). Values are expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance was set at p < .05 and evaluated using the independent t test. Control experiments were performed suppressing the primary antibodies. The confocal images were acquired with Fluoview 5 (Olympus VF300).

Slice Preparation and Electrophysiology

Rats anesthetized with isoflurane (Forane, Abbot Laboratories, Berkshire, UK, http://www.abbott.com) were decapitated and the cervical enlargement was dissected out. Transverse 300-µmthick slices were cut, placed in a chamber, and superfused (1 ml min⁻¹) with Ringer's solution (in mM): NaCl, 124; KCl, 2.4; NaHCO₃, 26; CaCl₂, 2.4; MgSO₄·6H₂O, 1.3; HEPES, 1.25; KH₂PO₄, 1.2; and glucose, 10; saturated with 5% CO₂ and 95% O₂ to keep pH 7.4. In low Ca²⁺ Ringer's solution, CaCl₂ was lowered to 0.2 mM whereas MgSO4 was increased to 4 mM. All experiments were performed at room temperature (22°C-24°C). Cells were visualized with differential interference contrast optics (Leica DM LFS, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Germany, http://www.leica.com) and patch-clamp whole-cell recordings obtained with electrodes filled with (in mM): K-gluconate, 122; Na₂-ATP, 5; MgCl₂, 2.5; CaCl₂, 0.003; ethylene glycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 1; Mg-gluconate, 5.6; K-HEPES, 5; H-HEPES, 5; and biocytin, 10; pH 7.3 (5-10 MΩ). In some cases, Alexa 488 or 594 hydrazide (250–500 μ M, Invitrogen) was added to the pipette solution. Current and voltage-clamp recordings were performed with a Multiclamp 700B and pClamp10 (Molecular Devices, Union City, CA, http://www.moleculardevices.com). Seal resistances were between 4 and 18 G Ω . The series resistance and whole-cell capacitance were not compensated. In voltage clamp mode, cells were held at -70 mV, and the resting membrane potential was estimated from the current-voltage relationship (at I = 0). To subtract leak currents, we used a P4 protocol by Clampex10 (Molecular Devices). Liquid junction potentials were determined and corrected off-line [17]. Values are expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance was set at p < .05 and evaluated using the independent t test or the Wilcoxon matched-paired test. The activation and inactivation curves for K⁺ currents were determined as described elsewhere [8].

Morphological Identification of the Recorded Cells

During whole-cell patch-clamp recordings, cells were filled with a fluorophore and/or biocytin. In most cases, cells were first imaged in living slices with an FG7 frame grabber (Scion Instruments) using ImageJ (NIH). Then, slices were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB for 12–24 hours. Following PB rinsing, the slices were blocked with 0.5% BSA in PB (1 hour) and then incubated in PB containing 0.3% Triton X-100 with the streptavidin-fluorophore complex.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Anesthetized animals were fixed by intracardiac perfusion with 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M PB, pH 7.4. Slices obtained with a vibrating microtome (100–200 μ m thick) were washed in PB and postfixed in 1% OsO₄ in PB 0.1 M, dehydrated, and epoxy-resin embedded.

Series of semithin sections were cut and stained with boraxic methylene blue. Ultrathin sections were obtained from trimmed blocks and mounted on one hole grids. To obtain frontal views of the apical processes of cells contacting the CC poles, we made alternating series of sections of different thickness. After reaching the level of the ependymal cells nuclei, several series of semithin and ultrathin sections were cut, mounted on one-hole grids, and examined with a Jeol X 100 transmission electron microscope.

TEM Immunohistochemistry

Sections were processed for revealing nestin using a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) and DAB as chromogen. The selected sections were postfixed for 1 hour (1% OsO_4 in PB 0.1 M), washed, dehydrated, and epoxy-embedded in flat molds. Series of sections were processed as already described.

RESULTS

Progenitor-Like Cells in the CC: Molecular Clues

Some ependymal cells in adult mice express markers of neural precursors [3]. To identify potential progenitor-like cells and their spatial distribution within the ependymal region of the neonatal rat spinal cord, we analyzed the expression of molecules expressed in neural stem cells [18]. Most cells surrounding the CC expressed the ependymal cell marker $S100\beta$ (Fig. 1A) but a narrow strip of tissue on the dorsal pole was unstained (Fig. 1A, arrow). Both the dorsal and ventral poles of the CC were contacted by closely packed nestin+ processes (Fig. 1B-1) that projected within the midline to reach the pia (Fig. 1B-2, 3, arrowheads). Unlike the ventral pole, nestin+ fibers in the dorsal pole of the CC did not coexpress S100 β (Fig. 1C). As revealed by Syto 64, most cell bodies corresponding to nestin+ fibers located far from the CC (Fig. 1D, 1E, arrowheads) with only a few lying close to it (Fig. 1F, arrowhead). We also found a faint expression of nestin in few short radial processes arising from the lateral aspects of the ependyma (data not shown). Vimentin and 3CB2 also expressed in cells that projected their distal processes to the midline. However, unlike nestin+ cells, vimentin+/3CB2+ cells were also abundant on the lateral aspects of the ependyma, giving rise to short processes projecting away from the CC (Fig. 1G, 1H, arrowheads). Although a subset of progenitors in the embryo and the adult brain characteristically expresses GFAP and/or BLBP [19, 20], we did not find GFAP or BLBP expression in ependymal cells but outside the ependymal region (Fig. 1I, 1J). In the spinal cord of neonatal rats, BLBP+ cells had a morphology similar to migrating cells (Fig. 1I, arrowheads), whereas cells expressing GFAP showed the typical morphology of astrocytes (Fig. 1J, arrowheads). Most 3CB2+ cells on the lateral aspects of the CC also expressed $S100\beta$ (supporting information Fig. 1, arrowheads).

Electrophysiological Properties of Cells Lining the CC

Progenitors in the embryo [21] and the adult brain [22-24] have characteristic electrophysiological signatures. To check whether progenitor-like cells in different regions of the ependyma have specialized functional properties, we made patchclamp recordings of cells on the lateral aspects of the ependyma (Fig. 2A). We found cells (n = 36) with linear voltagecurrent relationships (Fig. 2B), relatively low input resistances $(123.63 \pm 24.44 \text{ M}\Omega, n = 34; \text{ Fig. 2B, 2C})$, and hyperpolarized resting membrane potentials (-84.35 \pm 2.13 mV, n =36; Fig. 2C). Morphological analysis revealed that recorded cells belonged to clusters of dye-coupled ependymocytes lining substantial portions of the CC (Fig. 2D, 2F). The low input resistance and dye coupling suggested coupling via gap junctions. In line with this interpretation, the gap junction decoupler carbenoxolone (100 μ M) significantly increased their input resistance (from 103.8 \pm 26.4 to 388.5 \pm 189.6 M Ω , p < .05, Wilcoxon's matched-pairs test, Fig. 2E). The size of the clusters ranged from large groups of cells covering the entire lateral aspect of the CC (Fig. 2F-1) to rather smallcell conglomerates close to the ventral or dorsal poles (Fig. 2F-2-4). Interestingly, some of these clustered cells had processes entering the dorsal or ventral midline (Fig. 2F-2, 3,

arrowheads) and projecting toward the pia (Fig. 2F-4, arrow). Occasionally, we recorded uncoupled cells on the lateral aspects of the CC with a process projecting toward the parenchyma (n = 4, data not shown).

Because the electrophysiological data suggested the existence of gap junctions between clustered cells, we studied the molecular basis of electrical coupling. Although several connexin subtypes are expressed in the developing brain, Cx43 is the most abundant in the subventricular zone (SVZ) of the developing forebrain [25]. Immunohistochemistry for Cx43 revealed a high density of punctae on the lateral aspects of the CC (Fig. 2G, arrow). Notice however, the lack of Cx43 punctae on the dorsal and ventral poles of the ependyma. We conclude that on the lateral aspects of the CC, the non-neuronal cells have morphological and electrophysiological characteristics of ependymocytes and tanycytes [26] functionally associated by means of gap junctions.

Electrophysiological Signature of Midline Progenitor-Like Cells

Because our data indicate that the cells contacting the poles of the CC have molecular phenotypes different from those on the lateral aspects, we speculated that they may also have different electrophysiological properties. Patch-clamp recordings of CC-contacting cells projecting to the raphae revealed that these cells had hyperpolarized resting membrane potentials $(-81.95 \pm 2.31 \text{ mV}, n = 47;$ supporting information Fig. 2A) and high input resistances compared with cells in the lateral aspects of the CC (361.22 \pm 56.29, n = 48, p < .05, independent t test; supporting information Fig. 2A). On the dorsal and ventral poles of the CC, cells had the typical morphology of RG (Figs. 3A, 3F, and 4A) and appeared uncoupled (n = 71). Some cells had a relatively thick apical process (supporting information Fig. 2B-1, arrow) with many finger-like protrusions (supporting information Fig. 2B-2, arrowheads) and a thinner distal fiber projecting to the pia (supporting information Fig. 2B-1, arrowhead). However, other cells had smooth apical and distal processes (supporting information Fig. 2C, arrows). RG contacting the dorsal or ventral aspects of the CC had their cell bodies located at different distances from the CC lumen (supporting information Fig. 2D), resembling the morphology of RG during interkinetic nuclear migration [27]

RG lying within the midline had a complex repertoire of active properties with different types of outward and inward currents. In some RG (16 of 65, supporting information Table 2), depolarizing voltage steps produced an outward current (Fig. 3A, 3B-1) with minimal inactivation in response to sustained depolarization (Fig. 3B-1, 3). This current had an activation threshold close to -40 mV with a $V_{\rm h} = 5.37 \pm 1.77$ mV (Fig. 3B-2, 3C, 3D) and was sensitive to 10 mM tetraethylammonium (TEA) (Fig. 3E; three out of three cells) suggesting the involvement of delayed rectifier K⁺ currents ($I_{\rm KD}$).

In other RG (25 of 65, supporting information Table 2), depolarizing voltage steps (from a holding potential of -90 mV) evoked outward currents that had both noninactivating and inactivating components (Fig. 3F–3H). To separate these components, we applied the same stimulation protocol but from a holding potential of -30 mV (Fig. 3G-2). Under these conditions, we observed an outward current with a slower onset and no inactivation, suggesting the presence of $I_{\rm KD}$ channels. By subtracting the delayed noninactivating current (Fig. 3G-2) from the total current (Fig. 3G-1), we were able to separate an outward current with a fast onset and a prominent time-dependent inactivation (Fig. 3G-1, 2), suggesting an A-type K⁺ current ($I_{\rm A}$, [28]). In line with this interpretation,



Figure 1. CC-contacting progenitor-like cells: molecular clues. (A): Most cells surrounding the CC expressed the ependymal cell marker S100 β . However, a narrow portion on the dorsal pole of the ependyma was devoid of S100 β immunoreactivity (arrow). (B): Nestin immunoreactivity was observed mostly in cells with long radial processes in the dorsal and ventral midline that stretched from the CC lumen (1) to the pia on the dorsal (2, arrowhead) and ventral (3, arrowhead) aspects of the cord. (C): Nestin+ fibers on the dorsal CC did not coexpress S100 β . (D): Location of nuclei (Syto64) belonging to nestin reactive fibers in the dorsal and ventral midline. (E): Nestin+ cells on the dorsal raphe had a bipolar shape with their cell bodies located at various distances from the CC (arrowheads). (F): The cell bodies of nestin+ cells were also found close to the CC lumen (arrowhead). (G, H): Radial glia markers vimentin and 3CB2 expressed in cells on the lateral aspects and poles of the ependyma, with some fibers projecting away from the CC (arrowheads). (I): BLBP is not expressed in the ependyma but in cells outside the ependymal region (arrowheads). (J): GFAP+ cells were not detected in the ependymal layer, but cells with the morphology of astrocytes appeared in the spinal cord outside this region (arrowheads). (A–D, F, and J): single confocal optical planes; (E, G, H): confocal Z-stack projection. Unless otherwise stated, in this and subsequent figures, the dorsal pole of the CC is upward. Abbreviations: BLBP, brain lipid binding protein; CC, central canal; GFAP, glial fibrillary acidic protein.



Figure 2. Functional properties of cells lining the lateral CC: dye coupling and passive responses. (A): Differential interference contrast image of the CC in a live slice. (B): Responses of a cell recorded on the lateral CC to a series of voltage steps (1) that displayed a linear *I/V* relationship (2). This cell lacked voltage-gated currents as shown in the leak subtracted traces (3). (C): Distribution of input resistances and membrane potentials of cells recorded on the lateral aspects of the CC. (D): The cell recorded in (B) appeared dye-coupled with neighboring cells. (E): Carbenoxolone (100 μ M) increased the input resistance of cells in the lateral aspects of the CC (n = 5). (F): Clustered cells covered the whole lateral aspect of the CC (1) or formed rather small-cell conglomerates on the ventral (2) or dorsal (3) halves of the lateral CC. Some clustered cells had processes that entered the dorsal or ventral midline (2 and 3, arrowhead), projecting toward the pia (4, arrow). (G): Cx43 expression in the CC. (X43 punctae concentrated on the lateral aspects of the CC lumen (arrow). (D): Conventional epifluorescence in a living slice; (F1–4): confocal Z-stack projections; (G): single confocal optical plane. Abbreviations: CC, central canal; Cx-43, connexin 43.

TEA (10 mM) blocked the noninactivating component of the outward current (Fig. 3H-1, 2; 10 out of 10 cells) but spared the inactivating current which was blocked by the selective A-type K⁺ channel blocker 4-aminophyridine (4-AP, 2 mM; Fig. 3H-3; 10 of 10 cells). $I_{\rm A}$ activated transiently at membrane potentials of approximately -40 mV with a $V_{\rm h} = -5.79 \pm 1.2$ mV (Fig. 3I, 3J).

Besides displaying $I_{\rm KD}$ and $I_{\rm A}$, another subgroup of RG characterized by generating voltage-gated inward currents (6 of 65; supporting information Table 2). The slow transient inward current required relatively modest depolarizations (threshold approximately -55 mV; Fig. 4B-1) and remained in the presence of both tetrodotoxin (TTX, 1 μ M; data not shown) and K⁺ channel antagonists (Fig. 4B-2). However, the inward current was abolished by 3 mM Mn²⁺ or in low Ca²⁺ Ringer's solution (Fig. 4B-3, n = 7) suggesting the involve-

ment of low voltage-activated Ca^{2+} currents (I_{Ca}). In current clamp mode, this inward current generated a slow low threshold spike (LTS, Fig. 4C-1) that disappeared in low Ca^{2+} Ringer's solution (Fig. 4C-2).

We also found RG that displayed $I_{\rm KD}$ plus $I_{\rm Ca}$ without $I_{\rm A}$ (10 of 65, data not show) and others that only had $I_{\rm Ca}$ (6 of 65, data not shown). Finally, we recorded few cells (2 of 65) displaying passive membrane responses similar to those of lateral ependymocytes. The electrophysiological phenotypes described above were equally found in the ventral or dorsal poles and in animals within the range of explored ages (P0–P5).

To identify the molecular phenotypes of recorded cells, we combined the labeling of recorded cells with immunohistochemistry for specific markers of progenitors. Some cells recorded on the poles of the CC expressed nestin (supporting



Figure 3. $I_{\rm KD}$ and $I_{\rm A}$ in midline radial glia (RG). (A): Alexa 488-filled RG contacting the ventral pole of the CC. (B): Raw (1) and leak-subtracted (3) currents in a RG in response to a series of voltage steps. An outward current with an activation threshold of -40 mV (2) was generated in response to depolarizing voltage steps. (C, D): Current amplitude and activation curves for $I_{\rm KD}$, respectively. (E): The current was blocked by TEA (10 mM). (F): RG recorded in the ventral midline. (G): Currents evoked in the cell shown in (F) by depolarizing voltage steps after a prepulse to -90 mV (1). Currents with a slower onset were evoked with the same protocol as in (1) but after a prepulse to -30 mV (2). By subtracting 1 and 2, we obtained a current with a fast onset and voltage-dependent inactivation. (H): $I_{\rm KD}$ was blocked by TEA (10 mM, 1 and 2) whereas the remaining current was blocked by the $I_{\rm A}$ antagonist 4-AP (2 mM, 2 and 3). (I, J): $I_{\rm A}$ activation/inactivation amplitude curves, respectively. (A and F): Confocal Z-stack projection; (I, J): data pooled from P1–P5 rats. Abbreviations: CC, central canal; TEA, tetraethylammonium; 4-AP, 4-aminophyridine.

information Fig. 3A-1–4), but others (15 of 18) did not react with nestin antibodies (supporting information Fig. 3B). Because the presence of $I_{\rm KD}$ and $I_{\rm A}$ is characteristic of oligodendrocyte progenitor cells [24], we speculated that nestin– cells may be early oligodendrocyte progenitors. To test this idea, we performed immunocytochemistry for oligodendrocyte progenitor markers such as the PDGFR α and the chondroitin sulfate proteoglycan NG2. Although we found abundant PDGFR α and NG2 reactive cells both in the gray and white matter, CC-contacting cells were always negative (supporting information Fig. 3C, 3D).

Fine Structure of Midline CC-Contacting Cells

Progenitors in the embryo and postnatal neurogenic niches have characteristic fine structure features with pronounced apical–basal polarity [18]. A key component of this polarity is the presence in the apical pole of a centrosome, a structure that regulates the cell cycle and microtubule organization [29]. We found that pericentrin—a key component of the pericentriolar material—was expressed in the apical poles of nestin+ cells contacting the midline but not in their processes (Fig. 5A, arrow). The selective location of pericentrin in the apical poles of midline RG may reflect the presence of cilia. Because progenitors typically



Figure 4. I_{Ca} in midline radial glia (RG). (A): RG recorded and filled with Alexa 488. (B): This cell displayed both outward and slow inward currents (1, arrow) in response to depolarizing voltage steps. The inward current remained in the presence of K⁺ channel antagonists (2, arrow, 4-AP 2 mM and TEA 10 mM) but was abolished in low Ca²⁺ Ringer solution (3), suggesting the involvement of voltage-gated Ca²⁺ channels. (C): In current clamp mode, depolarizing current steps applied from a hyperpolarized membrane potential generated a slow spike (1, 2 arrow) that disappeared in low Ca²⁺ (2). (A) Confocal Z-stack projection. Abbreviations: 4-AP, 4-aminophyridine; CC, central canal; TEA, tetraethylammonium.

possess a single primary cilium [30], we made a careful analysis of the apical process of cells contacting the poles of the ependyma. Serial section studies revealed that the apical process of these cells bear a single cilium (Fig. 5B–5D). Interestingly, some of the cilia exhibited a 9 + 0 microtubule organization (Fig. 5C, arrowhead in inset) whereas others had a 9 + 2 organization (Fig. 5C, arrow in inset; 5D, arrowhead). Some of the apical process of the midline RG exhibited irregular profiles with lateral projections and lamella (Fig. 5D). These images probably correspond to the abundant finger-like processes arising from the apical protion fig. 2B).

We extended our TEM analysis to the distal processes of dorsal RG (Fig. 5E, inset). Cross-sections at the level of the dorsal raphe showed a compact population of circular/oval profiles with minor structural differences (Fig. 5E). Despite the similarities in fine structure, our patch-clamp recordings suggested that RG in the midline actually represent a heterogeneous population. TEM immunohistochemistry showed that nestin+ processes running in the raphe (Fig. 5F) were intermingled with others lacking electron-dense precipitate (Fig. 5G, 5H). In line with this, some processes in the midline region only expressed 3CB2 (Fig. 5I, arrow in 5J) whereas some were nestin+/3CB2- (Fig. 5I, asterisks in 5J) and others coexpressed both markers (Fig. 5I, arrowhead in 5J).

Proliferative Potential of CC-Contacting Cells

Because progenitor-like cells located in different portions of the ependyma have heterogenous functional and molecular properties, we explored whether they may have different proliferative activity by means of immunohistochemistry for endogenous cell cycle proteins such as the PCNA (expressed in all phases of the cell cycle) and the phosphohistone H3 (pH3, expressed mostly in M phase). We found abundant cells with PCNA+ nuclei on the lateral aspects of the CC (7.1 \pm 0.79 cells per section, 30 sections, n = 3 rats, Fig. 6A; supporting information Fig. 4A, 4B) that coexpressed vimentin (Fig. 6A, arrowhead; 6C, arrowheads) or 3CB2 (Fig. 6D, arrowhead). PCNA+ nuclei were also observed in the dorsal (Fig. 6B, arrow) or ventral (Fig. 6C, arrow) raphae at different distances from the CC lumen, but their number was significantly lower than in the lateral aspects of the CC (3.6 \pm 0.68 per section, 30 sections, n = 3 rats, p < .05, independent t test; supporting information Fig. 4A, 4B). Many of the PCNA+ nuclei in the midline corresponded to cells that expressed RG markers such as nestin (Fig. 6B-1-3, arrows), vimentin (Fig. 6C-1, 2, arrows), or 3CB2 (Fig. 6D-1-4, arrows). The analysis of pH3 expression showed that mitotic cells appeared all around the CC but as expected from the PCNA immunostaining were more abundant on the lateral aspects of the ependyma (0.96 \pm 0.33 vs. 0.131 \pm 0.08 nuclei per section, 29 sections, n = 3 rats, p < .05, independent t test; Fig. 6E, arrows and supporting information Fig. 4B). pH3+ cells on the poles of the ependyma were nestin+ (Fig. 6F). In contrast with PCNA, pH3+/nestin+ nuclei in the midline were found only close to the CC lumen, suggesting that as during embryogenesis, cell division occurred close to the surface in contact with the cerebrospinal fluid. We conclude that there is proliferative activity all around the CC, but most cell divisions take place on the lateral domains of the ependyma.



Figure 5. Molecular and ultrastructural characteristics of cells contacting the dorsal pole of the ependyma. (A): Nestin+ cells contained pericentrin+ granules in their apical processes (arrow). (B): Electron micrograph of the apical processes of cells contacting the dorsal CC (inset). Each process had the insertion site of a single cilium (arrows). (C): Longitudinal view of a cilium (arrow). Some cilia exhibited a 9 + 0 microtubule organization (inset, arrowhead) while others showed a 9 + 2 structure (inset, arrow). (D): The apical process (shaded in light blue) of midline cells (inset) exhibited lateral projections and lamella (arrows). Note the insertion site of a cilium (arrowhead). The inset illustrates the level of transmission electron microscopy (TEM) sections. (E): Electron microscopy of cross-sections at the level of the dorsal raphe (inset), showing bundles of circular or oval processes. (F): Light microscope image of nestin+ processes in a coronal section. (G): Image from a longitudinal section at the level of the dotted line shown in (G). The nestin+ processes are intermingled with nestin- processes (arrowheads). (H): The section level indicated in (F) as shown by TEM. A dense osmium-3,3-diaminobenzidine precipitate (B) in a nestin+ fiber close to a nonlabeled process (A). (I): Double-labeling of 3CB2 and nestin in the dorsal midline. (J): High magnification of the boxed area in (I) showed the coexistence of nestin+ (asterisks), 3CB2+ (arrow), and nestin+/3CB2+ processes (arrowhead in main panel and orthogonal view). (A): Single confocal optical plane; (I, J): confocal Z-stack projection. Abbreviation: CC, central canal

Collectively, our findings support the idea that the ependyma of neonatal rats contains progenitor-like cells with heterogeneous properties, organized in well-defined spatial domains. It may be possible that as the animal develops, these progenitors disappear or change their properties and organization within spatial domains. To explore this possibility, we made patch-clamp recordings in rats between P15 and P21 (n = 6 cells) because during the first 2 postnatal weeks, spinal circuits mature quickly and rats acquire an adult pattern of locomotion [31]. We found that cells contacting the poles of the ependyma in older rats were still uncoupled with the morphological phenotype of RG and complex electrophysiological properties (supporting information Fig. 5A-5D). Similar to neonatal animals, cells on the lateral aspects were extensively coupled and had passive electrical properties (supporting information Fig. 5E). As in mice [5], the expression of progenitor cell markers was also retained in the mature spinal cord of rats (P40), with nestin predominating on cells contacting the poles (supporting information Fig. 5F, 5G) whereas 3CB2 expressed on both the poles and lateral aspects of the ependyma (supporting information Fig. 5H). Finally, a substantial number of cells on the lateral aspects were positive for PCNA (supporting information Fig. 5I). Thus, progenitors in the ependyma of the mature rat spinal cord maintain the basic properties and compartmentalization observed in neonates.

DISCUSSION

We show here that the ependyma of the rat spinal cord harbors progenitor-like cells organized in spatially defined domains (Fig. 7). Clusters of coupled cells within lateral domains combined molecular features of ependymocytes and RG [18]. Midline domains contained elements with typical characteristics of neural stem cells [32] and complex electrophysiological properties that may reflect different functional states or progenitor competence. The different proliferation potential between lateral and midline domains favors the idea they represent a functional compartmentalization of this spinal stem cell niche.

Structural and Molecular Clues of a Spinal Stem Cell Niche

Classic studies conceived the ependyma of the spinal cord as a layer of epithelial cells [33]. Our findings in the rat and



Figure 6. Cell proliferation around the central canal (CC). (A): PCNA+ nuclei were abundant around vimentin+ cells on the lateral aspects of the CC (1). The PCNA+ nucleus pointed by the arrowhead in (1) corresponded to a vimentin+ cell (2). (B): PCNA+ nucleus in the midline (1, arrow) corresponding to a nestin+ cell (2 and 3, arrows). Notice the presence of many PCNA+ nuclei close to the lumen on the lateral CC (arrowheads). (C): Midline PCNA+ nucleus in a vimentin+ cell (1, arrow). Arrowheads indicated PCNA+ nucleus lining the CC. (2) Higher magnification and orthogonal images of the cell pointed in (1). (D): A PCNA+ nucleus lying in the ventral midline (1, arrow) corresponded to a 3CB2+ cell (1-4, arrows). (E): pH3+ nuclei on the lateral aspects of the CC (arrows). (F): Some midline pH3+ nuclei close to the CC lumen on the ventral pole corresponded to nestin+ cells (arrow). (A, C, and D): Confocal Z stack projections; (B and E): confocal optical sections. Abbreviations: PCNA, proliferating cell nuclear antigen; pH3, phosphohistone H3.

those by others in mice [4, 5, 34, 35] suggest that the region around the CC has a complex organization with heterogeneous progenitor-like cells. As in the brain [36], most cells lining the lateral aspects of the CC expressed the ependymal cell marker S100 β , but some coexpressed the RG marker 3CB2 or vimentin and had a basal process projecting away from the CC suggesting a progenitor cell nature [37]. Indeed, many S100 β +/3CB2+/vimentin+ cells expressed PCNA—thus being within the cell cycle—with few undergoing division as indicated by pH3 expression [38].

The expression of nestin—a marker of neuroepithelial cells and RG [37]—defined a second domain of heterogeneous cells contacting the poles of the CC that may also express RG markers. In adult mice, nestin is expressed preferentially on cells contacting the dorsal pole of the CC [34]. The fact that cells contacting the poles of the CC in human neonates are also nestin+ [39] suggests that this is an evolutionary preserved trait of early stages of postnatal development. Progenitors in adult neurogenic niches express GFAP in addition to nestin [40]. However, the ependyma in the rat lacked GFAP immunoreactivity, in contrast with GFAP-green fluorescent protein transgenic mice which bear GFAP+ cells contacting the dorsal pole [35]. The discrepancy of our data with those in mice may be species specific or age related (neonatal vs. adult). Interestingly, cells contacting the ventral but not the dorsal pole expressed the astrocyte and ependymal cell marker $S100\beta$, raising the possibility that midline domains may not be identical in their potential [37]. In fact, adult mice progenitors generating neurospheres presumably localize on the dorsal aspect of the CC [35]. Alternatively, nestin+/ $S100\beta$ + cells on the ventral pole may be a transitional stage between RG and ependymal cells as described during brain development [36].

Vimentin+ and nestin+ cells contacting the poles of the ependyma had the morphological phenotype of RG with a pronounced apical-basal polarity as embryonic and adult neural stem cells [18]. Although their perikarya laid at various distances from the CC, their centrosomes were always located in apical endfeet. In addition, our electron microscopy study showed that some apical processes had a single cilium with a 9 + 0 organization, a structural specialization thought as a key determinant of neural stem cells [30]. The variety of midline cell morphologies resembled RG undergoing interkinetic nuclear migration during cortical development [27]. Indeed, the fact that pH3 nuclei belonging to nestin+ cells were always close to the CC lumen, whereas PCNA nuclei located



Figure 7. Cartoon depicting the ependyma as a stem cell niche organized in midline and lateral spatial domains. The heterogeneous molecular and functional phenotypes are color coded or illustrated with representative data. Some of our working hypotheses brought about by our current findings are indicated with interrogation marks. Abbreviations: CC, central canal; RG, radial glia; PCNA, proliferating cell nuclear antigen. DCX, doublecortin; PSA-NCAM; poly-sialylated neural cell adhesion molecule.

at various distances, supports the possibility that as in the embryo [18], RG nuclei in the postnatal spinal cord move apically to divide.

Functional Diversity: Simple but Working Together or Complex and Working Individually

Spinal ependymocytes in the neonatal rat had electrophysiological properties similar to those of progenitors during cortical development: low input resistances, passive responses, hyperpolarized resting membrane potentials, and extensive gap junction coupling via Cx43 [21, 41]. These properties together with the expression of RG markers within cell clusters may indicate a lineage relationship from RG to ependymal cells as in the SVZ [36].

In contrast to cells on lateral domains, midline RG were not coupled and thus function as individual units. Unlike neurogenic RG in the developing cortex [21], RG in the postnatal spinal cord had complex electrophysiological phenotypes displaying various combinations of $I_{\rm KD}$, $I_{\rm A}$, and/or $I_{\rm Ca}$. The presence of $I_{\rm KD}$ is a common feature among adult progenitors since it has been reported in hippocampal nestin+ type 2 cells [23] and GFAP+ cells in the SVZ [22]. Although $I_{\rm A}$ was not found in the adult SVZ [22], progenitors from the embryonic [42] and neonatal [43] SVZ and human stem cells [44] express $I_{\rm A}$. The phenotype of midline RG with conspicuous $I_{\rm KD}$ and $I_{\rm A}$ is remarkably similar to that of oligodendrocyte progenitors [24], raising the possibility they are bipolar precursors committed to the oligodendrocyte lineage still negative for NG2 and PDGFR α [45]. The complex repertoire of K⁺ currents may regulate fundamental properties of ependymal progenitor-like cells. I_{KD} channels are major regulators of cell proliferation [46–48], and I_A channels are essential for proliferation of multipotent human neural stem cells [44]. Thus, K⁺ channels in midline RG may be part of epigenetic mechanisms that regulate proliferation. In addition, I_A have been implied in the differentiation of oligodendrocyte precursors [49] and rat spinal cord astrocytes [50]. Thus, another possibility is that K⁺ currents participate in the transition from RG to postmitotic spinal cells.

A minority of midline RG had I_{Ca} strong enough to sustain an LTS, a phenotype described in some floor plate cells [51]. Ca²⁺ electrogenesis plays a central role during development by regulating events from neural induction [52] to various aspects of neuronal differentiation [53]. For example, Ca²⁺ spikes are involved during early steps of differentiation of spinal neurons in Xenopus embryos [54] and newborn neurons in the adult hippocampus [55]. In rats, a subpopulation of doublecortin+ CC-contacting neurons has a robust Ca²⁺ LTS [8]. RG displaying I_{Ca} could be precursors showing the first signs of differentiation into CC-contacting neurons [8].

Heterogeneous Progenitors in Two Spatial Domains

Neural progenitors in the developing and adult brain are heterogenous and regionally specified in terms of lineage potential [56, 57]. Based on the expression of various stem cell markers, it has been recently proposed that CC-contacting progenitors in mice are heterogeneous cells with different potentials [5]. We show here a new level of complexity demonstrating CC-contacting progenitors are also functionally heterogeneous and organized in spatial domains. The cells located in midline domains were almost quiescent exhibiting various molecular and structural features of neural stem cells [18]. It is not clear whether the molecular heterogeneity and complex electrophysiological phenotypes within midline domains represent different types of progenitors or various functional/developmental stages of a single precursor. Progenitor-like cells within lateral domains combined features of ependymocytes and RG functionally grouped in multicellular units by Cx43. Gap junction coupling has been shown to promote stem cell proliferation [58], and this may be a key factor determining the difference in proliferation capabilities between domains. The spatial profile of Cx43 expression and the clusters of coupled progenitors described here resemble those of turtles [16], suggesting a phylogenetically conserved functional organization. However, unlike their reptilian counterpart, clustered progenitors in the rat did not express BLBP, suggesting a non-neurogenic nature [4, 37].

CONCLUSIONS

The fate and potentiality of CC-contacting progenitors as development proceeds remains unclear. Although shortly after birth, RG in the brain [59] and spinal cord [60] differentiate to astrocytes, progenitor-like cells remain in the adult spinal cord retaining the ability to react to injury [4, 5]. Ependymaderived cells migrate away from the CC but unlike their counterparts in the ischemic brain [61] do not become neurons. Our current findings and the fact that some CC-contacting cells display molecular and functional properties of neuroblasts [8] supports the idea that the ependyma of the spinal cord has many elements of adult neurogenic niches. Although

REFERENCES

- Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci 2005;28:223–250.
- 2 Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. Nat Rev Neurosci 2006;7:179–193.
- 3 Hugnot JP, Franzen R. The spinal cord ependymal region: A stem cell niche in the caudal central nervous system. Front Biosci 2011;16: 1044–1059.
- 4 Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M et al. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. PLoS Biol 2008;6:1494–1507.
- 5 Petit A, Sanders AD, Kennedy TE et al. Adult spinal cord radial glia display a unique progenitor phenotype. PLoS One 2011;6:e24538.
- 6 Johansson CB, Momma S, Clarke DL et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 1999; 96:25–34.
- 7 Horner PH, Power AE, Kempermann G et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. J Neurosci 2000;20:2218–2228.
- 8 Marichal N, Garcia G, Radmilovich M et al. Enigmatic central canal contacting cells: Immature neurons in "standby mode"? J Neurosci 2009;29:10010–10024.
- 9 Mothe AJ, Tator CH. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. Neuroscience 2005;131:177–187.
- 10 Ke Y, Chi L, Xu R et al. Early response of endogenous adult neural progenitor cells to acute spinal cord injury in mice. Stem Cells 2006; 24:1011–1019.
- 11 Danilov AI, Covacu R, Moe MC et al. Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis. Eur J Neurosci 2006;23:394–400.

postnatal neurogenesis around the CC in mice has been reported [12], several studies suggest that under normal conditions this is just a latent capability of this stem cell niche [8, 35, 62]. The manipulation of specific functional properties in a heterogeneous population of CC-contacting progenitor-like cells may be useful to regulate their behavior and lineage potential, providing the cell types required to repair injured spinal circuits.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Fabbiani and M.I. Rehermann for technical assistance; the generous gift by Dr. J. Sáez of the antibody against connexin 43, Dr. W. Stallcup of antibodies against NG2 and PDGFRα, and Dr. S. Doxsey of the antibody against pericentrin. The antibodies 40E-C developed by Dr. A. Álvarez-Buylla, 3CB2 developed by Dr. E.J. De La Rosa, and rat-401 developed by S. Hockfield were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. This work was supported by Grant FCE 2369 to N.M. and FCE 2367 to G.G. from ANII; and Grant R01NS048255 from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke to R.E.R. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke or the National Institutes of Health. N.M. is a recipient of an ANII fellowship.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTERESTS

The authors indicate no potential conflicts of interests.

- 12 Shechter R, Ziv Y, Schwartz M. New GABAergic interneurons supported by myelin-specific T cells are formed in intact adult spinal cord. Stem Cells 2007;25:2277–2282.
- 13 Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM et al. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2008;73:357–365.
- 14 Briscoe J, Pierani A, Jessell TM et al. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. Cell 2000;101:435–445.
- 15 Jessell TM. Neuronal specification in the spinal cord: Inductive signals and transcriptional codes. Nat Rev Genet 2000;1:20–29.
- 16 Russo RE, Reali C, Radmilovich M et al. Connexin 43 delimits functional domains of neurogenic precursors in the spinal cord. J Neurosci 2008;28:3298–3309.
- 17 Barry PH, Diamond JM. Junction potentials, electrode standard potentials, and other problems in interpreting electrical properties in membranes. J Membr Biol 1970;3:93–122.
- 18 Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu Rev Neurosci 2009;32:149–184.
- 19 Campbell K, Götz M. Radial glia: Multi-purpose cells for vertebrate brain development. Trends Neurosci 2002;25:235–238.
- 20 Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci 1997;17:5046–5061.
- 21 Noctor SC, Flint AC, Weissman TA et al. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J Neurosci 2002;22:3161–3173.
- 22 Liu X, Bolteus AJ, Balkin DM et al. GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. Glia 2006;54:394–410.
- 23 Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T et al. Subpopulation of nestinexpressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. Mol Cell Neurosci 2003;23:373–382.

- 24 Chittajallu R, Aguirre A, Gallo V. NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. J Physiol 2004;561:109–122.
- 25 Nadarajah B, Jones AM, Evans WH et al. Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. J Neurosci 1997;17:3096–3111.
- 26 Bruni JE. Ependymal development, proliferation, and functions: A review. Microsc Res Technol 1998;41:2–13.
- 27 Noctor SC, Flint AC, Weissman TA et al. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 2001;409:714–720.
- 28 Connor JA, Stevens CF. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. J Physiol 1971;213: 21–30.
- 29 Delaval B, Doxsey SJ. Pericentrin in cellular function and disease. J Cell Biol 2009;188:181–190.
- 30 Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. Nat Rev Neurosci 2001; 2:287–293.
- 31 Vinay L, Brocard F, Pflieger J-F et al. Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. Brain Res Bull 2000;53: 635–647.
- 32 Miller FD, Gauthier-Fisher A. Home at last: Neural stem cell niches defined. Cell Stem Cell 2009;4:507–510.
- 33 Peters A, Palay SL, Webster HdeF. The ependyma. In: Peters A, Palay SL, Webster HdeF, eds. The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells. Oxford: Oxford UP, 1991:312–327.
- 34 Hamilton LK, Truong MK, Bednarczyk MR et al. Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. Neuroscience 2009;164: 1044–1056.
- 35 Sabourin JC, Ackema KB, Ohayon D et al. A mesenchymal-like ZEB1(+) niche harbors dorsal radial glial fibrillary acidic protein-positive stem cells in the spinal cord. Stem Cells 2009;27:2722–2733.
- 36 Spassky N, Merkle FT, Flames N et al. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. J Neurosci 2005;25:10–18.
- 37 Pinto L, Götz M. Radial glial cell heterogeneity—The source of diverse progeny in the CNS. Prog Neurobiol 2007;83:2–23.
- 38 Eisch AJ, Mandyam CD. Adult neurogenesis: Can analysis of cell cycle proteins move us "Beyond BrdU"? Curr Pharm Biotechnol 2007;8:147–165.
- 39 Sakakibara A, Aoki E, Hashizume Y et al. Distribution of nestin and other stem cell-related molecules in developing and diseased human spinal cord. Pathol Int 2007;57:358–368.
- 40 Ma DK, Ming G-I, Gage FH et al. Neurogenic niches in the adult mammalian brain. In: Gage FH, Kempermann G, Song H, eds. Adult Neurogenesis. NY: Cold Spring Harbor, 2008:207–226.
- 41 Bittman K, Owens DF, Kriegstein AR et al. Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. J Neurosci 1997;17:7037–7044.
- 42 Smith DO, Rosenheimer JL, Kalil RE. Delayed rectifier and A-type potassium channels associated with Kv 2.1 and Kv 4.3 expression in embryonic rat neural progenitor cells. PLoS One 2008;3:e1604.
- 43 Stewart RR, Zigova T, Luskin MB. Potassium currents in precursor cells isolated from the anterior subventricular zone of the neonatal rat forebrain. J Neurophysiol 1999;81:95–102.

- 44 Schaarschmidt G, Wegner F, Schwarz SC et al. Characterization of voltage-gated potassium channels in human neural progenitor cells. PLoS One 2009;4:e6168.
- 45 Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. Trends Neurosci 2001;24:39–47.
- 46 Ghiani CA, Yuan X, Eisen AM et al. Voltage-activated K+ channels and membrane depolarization regulate accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(Kip1) and p21(CIP1) in glial progenitor cells. J Neurosci 1999;19:5380–5392.
- 47 MacFarlane SN, Sontheimer H. Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. Glia 2000; 30:39–48.
- 48 Chittajallu R, Chen Y, Wang H et al. Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99: 2350–2355.
- 49 Sontheimer H, Trotter J, Schachner M et al. Channel expression correlates with differentiation stage during the development of oligodendrocytes from their precursor cells in culture. Neuron 1989;2:1135–1145.
- 50 MacFarlane SN, Sontheimer H. Modulation of Kv1.5 currents by Src tyrosine phosphorylation: Potential role in the differentiation of astrocytes. J Neurosci 2000;20:5245–5253.
- 51 Frischknecht F, Randall AD. Voltage- and ligand-gated ion channels in floor plate neuroepithelia of the rat. Neuroscience 1998;85: 1135–1149.
- 52 Webb SE, Moreau M, Leclerc C et al. Calcium transients and neural induction in vertebrates. Cell Calcium 2005;37:375–385.
- 53 Spitzer NC, Root CM, Borodinsky LN. Orchestrating neuronal differentiation: Patterns of Ca²⁺ spikes specify transmitter choice. Trends Neurosci 2004;27:415–421.
- 54 Spitzer NC, Lamborghini JE. The development of the action potential mechanism of amphibian neurons isolated in culture. Proc Natl Acad Sci USA 1976;73:1641–1645.
- 55 Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. Nature 2004;429:184–187.
- 56 Graf T, Stadtfeld M. Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. Cell Stem Cell 2008;3:480-483.
- 57 Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. Science 2007;317:381–384.
- 58 Elias LA, Kriegstein AR. Gap junctions: Multifaceted regulators of embryonic cortical development. Trends Neurosci 2008;31:243–250.
- 59 Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L et al. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci 2004;7:136–144.
- 60 Barry D, McDermott K. Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord. Glia 2005;50:187–197.
- 61 Carlén M, Meletis K, Göritz C et al. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. Nat Neurosci 2009;12:259–267.
- 62 Stoeckel ME, Uhl-Bronner S, Hugel S et al. Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, GAP-43 immunoreactivities: Light and electron microscopic study. J Comp Neurol 2003;457:159–174.

See www.StemCells.com for supporting information available online.