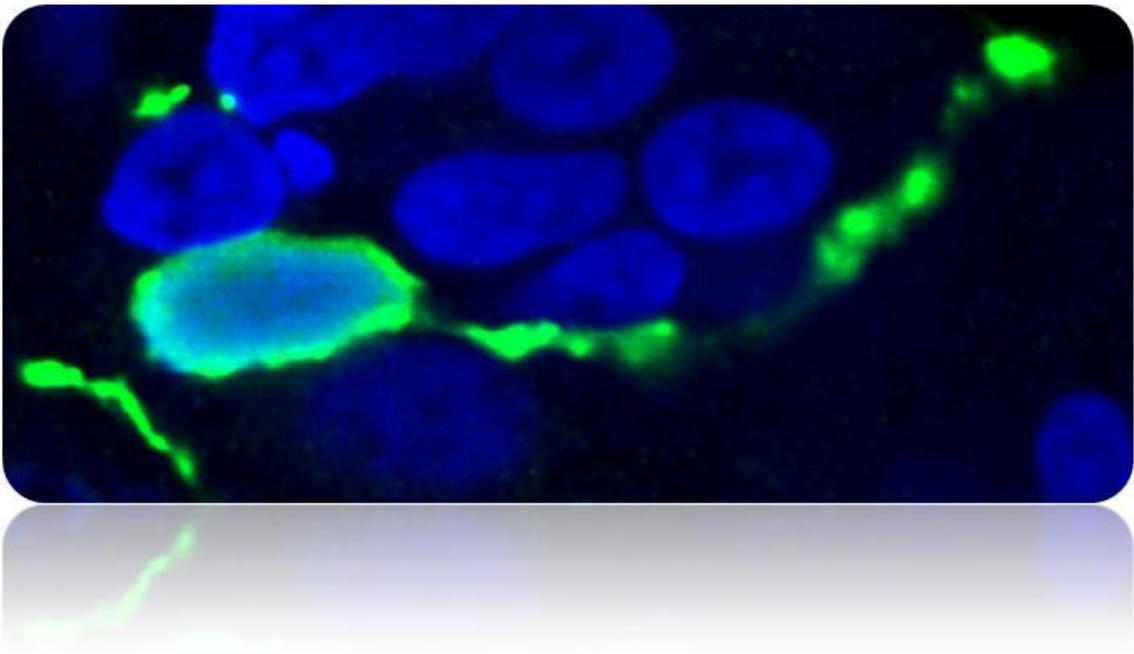


# Plasticidad del sistema serotoninérgico de la médula espinal inducida por la lesión

---



María Gabriela Fabbiani  
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas  
PEDECIBA - Biología

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas  
PEDECIBA - Biología

# Plasticidad del sistema serotoninérgico de la médula espinal inducida por la lesión

---

María Gabriela Fabbiani

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

Orientador: Dr. Raúl E. Russo

Tribunal: Dra. Cecilia Scorza  
Dra. Patricia Lagos  
Dr. Daniel Olazábal

09-10-2015

## Contenido

Agradecimientos.....	4
Resumen.....	5
Introducción.....	7
Lesión de la médula espinal.....	7
Modulación de la locomoción .....	8
La serotonina como neuromodulador del Sistema Nervioso.....	10
Participación del sistema serotoninérgico en fenómenos de plasticidad.....	15
Neurogénesis durante el desarrollo embrionario y la vida post-natal .....	17
Antecedentes.....	23
Hipótesis .....	24
Objetivo general .....	24
Estrategia experimental.....	26
Animales.....	26
Localización del sistema serotoninérgico en el tronco encefálico de la tortuga <i>Trachemys scripta elegans</i> .....	26
Lesiones espinales .....	27
Tratamiento <i>in vivo</i> para marcado de células mitóticas .....	29
Perfusión de los animales, preparación del tejido y detección de los marcadores moleculares .....	29
Análisis estadístico.....	32
Resultados .....	33
Localización del sistema serotoninérgico en el tronco encefálico de la tortuga <i>Trachemys scripta elegans</i> : resultados del análisis tridimensional .....	33
Cuantificación de las células serotoninérgicas en el ensanchamiento lumbar.....	34
Análisis de la presencia de serotonina en condiciones control.....	34
Análisis de la presencia de serotonina en el ensanchamiento lumbar luego de la lesión.....	35
Localización y morfología de las células serotoninérgicas .....	36
Detección de proliferación celular mediante incorporación de BrdU .....	38
Expresión de marcadores neuronales en las células 5-HT+ de la médula lumbar de tortugas normales y lesionadas.....	40
Análisis del linaje de las células 5-HT+ de la médula lumbar de tortugas normales y lesionadas .....	44
Discusión.....	49
Mecanismos subyacentes a la aparición de nuevas neuronas serotoninérgicas.....	50
Conclusiones y Perspectivas.....	56

## **Agradecimientos**

Al PEDECIBA y en particular a la Comisión coordinadora de la Subárea Neurociencias: Dra. Patricia Lagos, Dra. Silvia Olivera, Dr. Sebastián Curti y Dr. Francesco Rossi por su generosidad.

Al Russo por recibirme en el NFCM como técnica y ser mi orientador cuando decidí terminar mis estudios de maestría.

Al Profesor Omar Trujillo por estar presente diariamente en el laboratorio, quien desde la escritura del proyecto, siempre estuvo dispuesto a leer, corregir, recomendar lecturas y aportar ideas.

A Cecilia Scorza, Patricia Lagos y Daniel Olazábal por aceptar formar parte del tribunal y por realizar importantes recomendaciones que indudablemente mejoraron el manuscrito.

Especialmente María Inés Rehermann y Carina Aldecosea por participar en los experimentos.

A Daniel y Alejandro, encargados del acuario, por cuidar las tortugas.

A Nicolás Marichal, compañero de box, por su sensatez.

A Cecilia Reali por enseñarme más sobre las tortugas.

A Rosana Perrone por enseñarme estadística.

A todos los compañeros de NFCM por cuidar las tortugas y sus aportes a esta tesis.

A Anabel, Juan Carlos siempre dispuestos a escuchar y ayudar.

A mis queridas amigas de la Unidad Bases Neurales de la Conducta por hacerme parte de lo importante.

A todo el IIBCE por ser el mejor lugar para trabajar.

A Tabaré mi compañero de vida, incondicional.

A mis padres y mis dos familias.

A Martina y Pedro.

## Resumen

La plasticidad de los circuitos neurales ha tomado relevancia en los últimos años ya que se han encontrado algunas neuronas capaces de cambiar su fenotipo neuroquímico en respuesta a factores epigenéticos (como cambios en la actividad eléctrica o estímulos sensoriales). En esta forma de plasticidad adaptativa la actividad eléctrica es un factor clave. Cuando hay una disminución de la actividad aumenta la cantidad de neuronas que expresan neurotransmisores excitatorios. Cuando ocurre lo opuesto, aumenta la cantidad de neuronas que expresan neurotransmisores inhibitorios. La manipulación de estos mecanismos plásticos mediante la neuromodulación permitiría, por ejemplo, la adaptación de los circuitos motores locales luego de una lesión espinal, facilitando la recuperación funcional.

La sección transversal completa de la médula espinal provoca en los mamíferos una parálisis crónica caudal al sitio de la lesión debida a la pérdida irreversible de los comandos motores supra-espinales y los sistemas neuromoduladores extrínsecos. Sin embargo, los reptiles mantienen la capacidad de regeneración y recuperación funcional a lo largo de toda la vida, lo cual se debe a una mayor plasticidad de los circuitos espinales. En tortugas de agua dulce, la sección completa de la médula espinal interrumpe totalmente la inervación serotoninérgica extrínseca proveniente del tronco encefálico.

Para estudiar una posible plasticidad de la inervación serotoninérgica intrínseca luego de la lesión realizamos una caracterización anatómica y neuroquímica de la médula espinal en condiciones control y luego de una lesión. En los segmentos distales de la médula lesionada encontramos un mayor número de neuronas serotoninérgicas (5-HT+) respecto al control sin lesión. Se localizaron en la sustancia gris, ventrales al canal central. Estas nuevas células serotoninérgicas no se generaron luego de la lesión (no incorporaron BrdU ni expresaron proteínas endógenas del ciclo celular) sino que forman parte de un pool de neuronas pre-existentes que expresa factores de transcripción embrionarios. Son neuronas que luego de la lesión aumentan

significativamente la serotonina intracelular a través de una vía de señalización probablemente dependiente del factor de transcripción Nkx6.1.

Proponemos que se trata de un mecanismo homeostático para compensar de forma intrínseca la modulación serotoninérgica supra-espinal dañada por la lesión. En este modelo, cambios en las señales externas, probablemente el nivel de actividad eléctrica, activan y/o reprimen vías de señalización intracelular desencadenando la re-especificación del neurotransmisor como mecanismo para regular la excitabilidad y mantener la homeostasis de los circuitos espinales.

El conocimiento de los mecanismos íntimos subyacentes a este tipo de plasticidad posibilitaría el desarrollo de estrategias alternativas aplicables a los mamíferos para facilitar la recuperación de las funciones perdidas por una lesión espinal severa.

## Introducción

### Lesión de la médula espinal

La lesión traumática de la médula espinal genera un daño que lleva a diversos niveles de parálisis y disfunciones sensoriales (Hagen, 2015). El trauma produce la sección de axones, la muerte de diversos tipos celulares y la rotura de vasos sanguíneos con la consecuente hemorragia y edema, lo que puede agravar el daño local.

La sección transversal completa de la médula espinal en los mamíferos provoca una parálisis crónica caudal al sitio de la lesión. Esto se debe a la ausencia de los comandos motores superiores, incluyendo los sistemas moduladores supra-espinales tales como los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico (Brustein y Rossignol, 1999) y la pérdida de la interacción entre éstos y las aferencias sensoriales desde los segmentos distales a la lesión. La interrupción de estas vías produce una desregulación del sistema autonómico que, dependiendo del nivel de la lesión, puede provocar disfunciones del sistema cardiovascular y de los aparatos digestivo, urinario y reproductor. La etapa aguda de la lesión se caracteriza por una disminución del tono muscular y ausencia de reflejos. Luego, entre los 2 y 6 meses posteriores a la injuria, en los seres humanos aparecen episodios de espasticidad con reflejos exagerados, aumento del tono y espasmos musculares causados por la descarga repetitiva de las motoneuronas caudales a la lesión. En algunos casos los pacientes relatan diversas experiencias sensoriales incluyendo el dolor neuropático. También es frecuente el dolor muscular, mientras que la ausencia de actividad motora provoca atrofia del músculo esquelético y las articulaciones (Hagen, 2015).

Sin embargo, cuando la lesión se realiza en animales recién nacidos se observa una mejor recuperación funcional que se atribuye a una mayor plasticidad de los circuitos en los animales inmaduros. Esto sucede en la comadreja (Saunders et al., 1998; Mladinic et al., 2009) y en ratas neonatales (Tillakaratne et al., 2010).

Otros vertebrados, como algunos anfibios urodelos y reptiles mantienen la capacidad de regeneración a lo largo de la vida. El modelo clásico es la salamandra, la cual es

capaz de recuperar la locomoción y nadar luego de una sección transversal total de la médula a nivel lumbar (Chevallier et al., 2004).

En tortugas de agua dulce, nuestro grupo ha encontrado que siete a quince días después de realizar un corte transversal que secciona completamente la médula a nivel torácico bajo, se genera un puente de fibras gliales GFAP+ (proteína fibrilar glial) y BLBP+ (proteína cerebral de unión a lípidos) que transcurren en sentido perpendicular al corte, permitiendo la reconexión. Este puente es cruzado por axones provenientes en su mayoría del ganglio de la raíz dorsal y también por fibras varicosas serotoninérgicas (5-HT+), lo que habilita una recuperación parcial de la locomoción (Rehermann et al., 2009, 2011). Otro ejemplo es la lagartija, que luego de una sección total de la médula espinal es capaz de regenerar las extremidades posteriores y el extremo terminal de la médula espinal (Egar et al., 1970).

Es importante profundizar en los mecanismos subyacentes a la recuperación funcional en modelos con capacidad de regeneración ya que esta información puede sugerir nuevas estrategias para la reparación de la médula espinal y la recuperación funcional en los mamíferos.

## **Modulación de la locomoción**

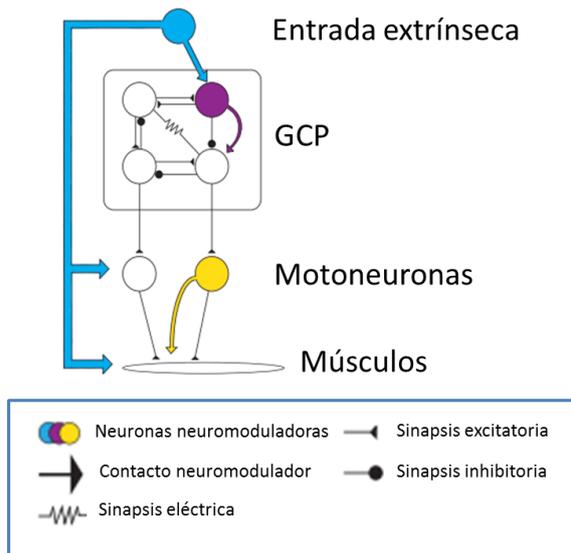
Los sistemas motores de los mamíferos están formados por cuatro circuitos interconectados (Thomas Thach, 1999). En primer lugar se encuentra la médula espinal que contiene los circuitos encargados de organizar los movimientos automáticos y estereotipados. Las motoneuronas representan la vía final común de los sistemas motores. Éstas son moduladas directamente por aferencias sensoriales y a través de interneuronas de la médula espinal, las cuales integran circuitos locales denominados “generadores centrales de patrones” (GCPs), encargados de controlar la postura y la locomoción. Estos GCPs generan un patrón motor básico pero modulable para adaptar la locomoción según las necesidades del organismo.

El segundo nivel son los circuitos localizados en el tronco encefálico, los cuales integran comandos motores descendentes desde los centros superiores y procesan la

información sensorial proveniente de vías ascendentes. El tronco encefálico integra la vía vestibulo-espinal: los núcleos vestibulares reciben información sobre la posición de la cabeza y proyectan a la médula espinal a través del tracto vestibulo-espinal, el cual llega finalmente a las motoneuronas ubicadas en la zona intermedia ventro-medial que inervan a los músculos proximales responsables de la postura y el equilibrio. El tronco encefálico contiene los núcleos del rafe, en los cuales se agrupan neuronas serotoninérgicas y el locus coeruleus, formado por neuronas noradrenérgicas. Ambos sistemas inervan la médula espinal e intervienen en el control motor modulando los GCPs y las motoneuronas.

Finalmente, la corteza motora y premotora son los centros que procesan y organizan los movimientos voluntarios. Los comandos motores descienden formando los tractos cortico-espinal y cortico-bulbar, que inervan las motoneuronas espinales y los núcleos motores del tronco encefálico respectivamente.

Estos sistemas tienen la capacidad de adaptarse a distintas situaciones fisiológicas y ambientales sin perder la integridad funcional básica. El control se logra mediante la neuromodulación, que se puede clasificar según su origen como **intrínseca**, cuando es ejercida por un componente del circuito y **extrínseca**, cuando proviene de componentes ajenos al circuito básico (Marder, 2012) (figura 1).



**Figura 1.** Modulación intrínseca y extrínseca. La modulación intrínseca proviene de una neurona del circuito que libera sustancias neuromoduladoras capaces de modificar las propiedades de otro elemento del circuito. La modulación extrínseca proviene de una fuente o entrada localizada por fuera del circuito. Modificado de (Marder, 2012)

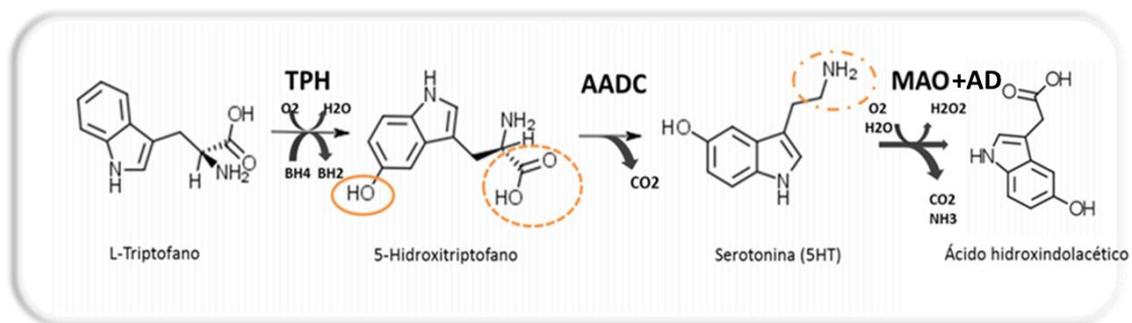
En el caso de la locomoción, ésta depende de tres niveles de control: las aferencias sensoriales, la modulación intrínseca por los GCPs y la modulación extrínseca supraespinal. No obstante, se puede generar actividad motora en ausencia de retroalimentación sensorial cuando los GCPs son activados por los núcleos supraespinales y modulados por los sistemas monoaminérgicos, en particular por el sistema serotoninérgico. Por ejemplo, en la lamprea se ha propuesto la existencia de una cadena de osciladores a lo largo de la médula espinal que controlan la generación del nado y se ha demostrado que son modulados por serotonina. *In vitro* la serotonina modula la llamada “locomoción ficticia” aumentando la excitabilidad de las motoneuronas a dos niveles: reduciendo la hiperpolarización post-potencial y aumentando la duración del potencial “plateau” (Schotland y Grillner, 1993). Luego de una lesión, la plasticidad de estos circuitos locales podría ayudar a la recuperación de la locomoción a pesar de la ausencia de los otros sistemas de control. Esto podría lograrse mediante la neuromodulación y regulando de la excitabilidad de los elementos del circuito, en particular las motoneuronas e interneuronas pre-motoras.

### La serotonina como neuromodulador del Sistema Nervioso

La serotonina es uno de los neuromoduladores más importantes del sistema nervioso por lo cual es esperable que si se interrumpe su presencia en el sistema nervioso se observen diversos efectos en las células sensibles a esta amina.

La serotonina es una molécula hidrofílica que no atraviesa la barrera hematoencefálica y es sintetizada en el sistema nervioso a partir de su precursor, el aminoácido esencial L-triptófano (figura 2). Este neurotransmisor fue descubierto por su capacidad vasoconstrictora cuando es liberado desde las plaquetas y por provocar la contracción del músculo liso gastrointestinal cuando es liberado por las células cromafines (Erspamer y Asero, 1953). Su presencia en el sistema nervioso se demostró estimulando el corazón de molusco con extractos de cerebro.

Posteriormente se observó que el ácido lisérgico (LSD, una molécula con actividad sicotrópica) antagonizaba el efecto de la serotonina sobre el músculo liso gastrointestinal lo que promovió el estudio y desarrollo de numerosos fármacos que actúan sobre las neuronas serotoninérgicas y sobre los receptores de serotonina pre- o post-sinápticos.

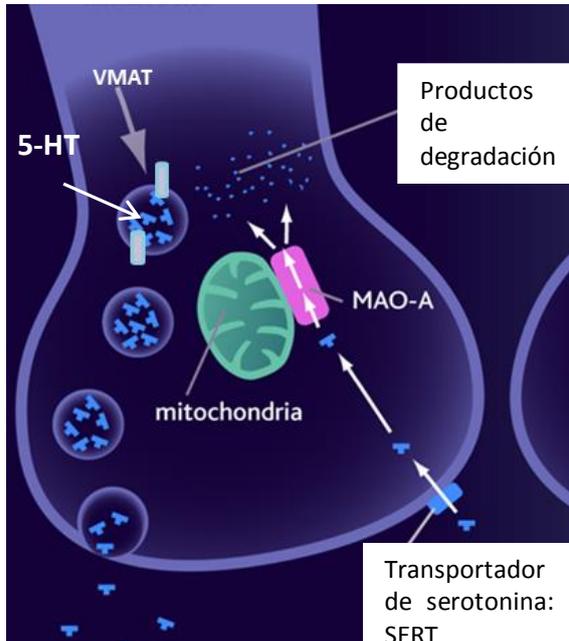


**Figura 2.** Vía de síntesis y degradación de serotonina.

Además de la señalización sináptica clásica, la serotonina puede difundir al espacio extracelular desde su sitio de liberación y unirse a receptores presentes en células cercanas. Se llama señalización en volumen o neurotransmisión parácrina (Bunin y Wightman, 1998). Es muy relevante desde el punto de vista funcional ya que una señalización más amplia en el entorno del sitio de liberación puede actuar como neuromoduladora de la actividad sináptica local, afectando en forma global a una red neural.

La señal serotoninérgica tanto sináptica como parácrina finaliza por tres mecanismos, dos de los cuales involucran transportadores específicos (figura 3). La serotonina liberada al espacio extracelular debe ser re-captada en la membrana pre-sináptica por

un transportador específico de serotonina (SERT); luego en el citoplasma, puede ser incorporada hacia el interior de las vesículas sinápticas por el transportador vesicular de monoaminas VMAT o puede ser degradada por la enzima monoaminaoxidasa.



**Figura 3.** La serotonina liberada puede ser re-captada por el transportador específico (SERT) ubicado en la membrana pre-sináptica. En el citoplasma es degradada por la enzima mitocondrial monoaminaoxidasa (MAO) o puede ser internalizada hacia las vesículas sinápticas por el transportador de monoaminas VMAT. (Modificado de cnsforum.com)

En la tortuga de agua dulce *Trachemys scripta elegans*, la mayoría de las neuronas serotoninérgicas se localiza en los núcleos del rafe del tronco encefálico, fuente principal de serotonina y donde se originan las fibras que inervan todo el Sistema Nervioso Central (SNC). Las neuronas serotoninérgicas que inervan la médula espinal se encuentran formando grupos: sobre la línea media a nivel de los núcleos del rafe superior e inferior y lateralmente a nivel de los núcleos *reticularis superior, inferior e isthmi* (Kiehn et al, 1992). Las neuronas serotoninérgicas proyectan a la médula espinal formando un haz dorso-lateral a nivel del bulbo raquídeo que corre en sentido rostro-caudal por el funículo lateral de la médula espinal.

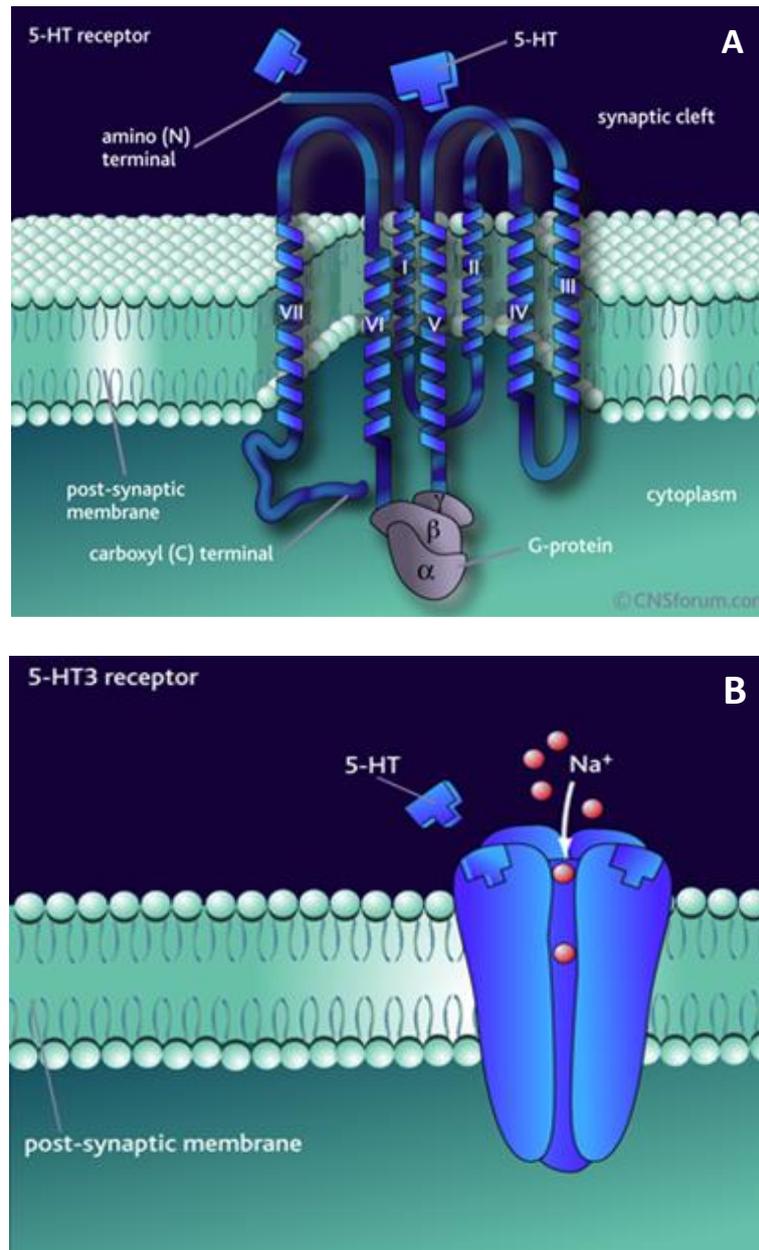
Usualmente se propone que la serotonina establece el “tono” del sistema nervioso según el estado de actividad del individuo. Las neuronas del rafe presentan una descarga espontánea rítmica durante la vigilia, la frecuencia de la misma disminuye cuando el individuo entra en la etapa de sueño y se silencian totalmente durante el sueño REM. Esto nos lleva a relacionar la descarga de las neuronas serotoninérgicas con la actividad motora ya que durante la etapa REM se observa una atonía de los

músculos esqueléticos. La actividad motora rítmica producida por los GCPs estimula a las neuronas del rafe que responden con un aumento de su frecuencia de descarga, lo cual aumenta la cantidad de serotonina liberada en el entorno de las motoneuronas. En el gato se demostró que las neuronas serotoninérgicas del rafe facilitan o estimulan la activación de las motoneuronas en respuesta a la actividad motora (Veasey et al., 1995). De forma similar, la estimulación de la superficie ventral del tronco encefálico del ratón puede activar la locomoción ficticia (Gordon y Whelan, 2008; Dunbar et al., 2010).

Las fibras y botones sinápticos serotoninérgicos se distribuyen en todo el sistema nervioso; con una alta concentración en los núcleos motores craneales y en el asta ventral de la médula espinal. En el gato los botones serotoninérgicos sobre las motoneuronas lumbares representan entre 1 y 3 % del total y se localizan principalmente en las dendritas (Rekling et al., 2000). En la tortuga, nuestro grupo ha utilizado la técnica de inmunofluorescencia para detección de serotonina y ChAT (acetiltransferasa de colina, para identificar motoneuronas) simultáneamente para cuantificar los botones sinápticos 5-HT+ sobre las motoneuronas. Resultados preliminares mostraron que cada motoneurona del ensanchamiento lumbar presenta entre 10 y 15 botones 5-HT+, localizados en el cuerpo celular y las dendritas (Lucía Pérez, comunicación personal).

Se han descrito siete familias de receptores de membrana para la serotonina, subdivididas en 14 subtipos. La mayoría están acoplados a proteína G, a excepción de la familia 3, que son canales iónicos asociados a ligando (figura 4). Un estudio de expresión del subtipo 2C en neuronas corticales en cultivo mostró que el ARNm sufre un proceso de edición dando lugar a isoformas con actividad constitutiva (Chanrion et al., 2008). Este resultado es muy relevante ya que si se suprimiera totalmente la presencia de serotonina, por ejemplo, por una lesión espinal, las neuronas que expresan este tipo de receptores podrían mantener activada la cascada de segundos mensajeros aún sin la señal extracelular. De hecho, se ha reportado que la actividad constitutiva del receptor 2C aumenta la excitabilidad de motoneuronas caudales a una

lesión espinal en ratas, lo que finalmente redundará en la recuperación de algunas funciones motoras (Fouad et al., 2010; Murray et al., 2010).



**Figura 4.** Receptores serotoninérgicos. **A\_** Receptor acoplado a proteína G. Formado por 7 hélices a transmembrana. Cuando se une a la serotonina se activa la proteína G y se inicia una cascada de segundos mensajeros. **B\_** Receptores Tipo 3. Formados por 5 subunidades, son canales iónicos activados por unión a ligando permeables a sodio y potasio. (Modificado de cnsforum.com).

Los receptores serotoninérgicos de los subtipos 1A, 1B (par XII), 1D (motoneuronas gama), 2A, 2B, 2C y 5A se expresan en motoneuronas espinales (Perrier et al., 2013). La serotonina tiene en general, un efecto excitatorio sobre las motoneuronas, facilitando

la generación de potenciales de acción. Sin embargo la respuesta obtenida al estimularlas puede variar dependiendo de los receptores que expresa la neurona y de la localización de éstos en las distintas regiones celulares. Por ejemplo, en la tortuga la activación de receptores localizados en la región somato-dendrítica de motoneuronas espinales tiene un efecto excitatorio, ya que inhibe una corriente hiperpolarizante de potasio (Perrier et al., 2003). Sin embargo, la activación de receptores 5HT1A localizados en el segmento inicial del axón inhibe el potencial de acción bloqueando canales de sodio (Perrier y Cotel, 2008).

Otro ejemplo de la pluralidad de acciones generadas por la serotonina es la activación de receptores 5HT2 presentes en motoneuronas de tortuga, que facilitan la generación de potenciales *plateau* a través de la activación de canales de calcio de tipo L (Perrier y Hounsgaard, 2003). Este efecto se describió también en motoneuronas espinales de ratas con una lesión espinal crónica, en las cuales se observó un aumento de la sensibilidad de las motoneuronas a la serotonina (Li et al., 2007). Es probable que la actividad constitutiva de los receptores 5HT2C (que fue descrita posteriormente) sea la responsable del efecto sensibilizador o facilitador.

Estos datos aportan evidencia de que la activación de los mecanismos plásticos en los circuitos locales espinales luego de una lesión espinal podría facilitar la recuperación funcional.

### **Participación del sistema serotoninérgico en fenómenos de plasticidad**

Varias estrategias experimentales han demostrado la relevancia del **sistema serotoninérgico** en la recuperación de la locomoción luego de una lesión espinal. Por ejemplo, la aplicación de 5-HT en la médula espinal, su precursor (5-Hidroxitriptofano) o agonistas de los receptores serotoninérgicos tipo 1, 2 y 3, activan los circuitos motores locales en gatos con lesión espinal a nivel de T13. Dicha activación redundante en una mejor recuperación de la locomoción en estos animales. Cuando se aplica conjuntamente con norepinefrina o el agonista noradrenérgico  $\alpha$ 1 metoxamina, los animales logran una locomoción prolongada y con mejor estabilidad lateral (Brustein y Rossignol, 1999).

El trasplante de neuronas serotoninérgicas embrionarias es otra estrategia experimental que ha sido utilizada en ratas. Dichas neuronas pueden extender procesos e inervar el sitio de la lesión para lograr la activación de los GCPs (Ghosh y Pearse, 2015). Esta estrategia demostró que la recuperación de la coordinación entre los miembros posteriores depende del nivel re-inervado, sugiriendo que el GCP en la rata se localiza en los segmentos L1 y L2 (Ribotta et al., 2000).

Recientemente se han encontrado ejemplos de plasticidad del sistema serotoninérgico, cuyo rol sería mantener la homeostasis funcional (Spitzer, 2012). Durante el desarrollo de *Xenopus laevis* las neuronas del tronco encefálico generan corrientes de calcio cuando son activadas por señales parácrinas. A su vez, este ión actúa como una señal intracelular que regulando factores de transcripción puede afectar la diferenciación de neuronas serotoninérgicas (Demarque y Spitzer, 2010). Usando herramientas moleculares para modificar la expresión de canales iónicos y afectar las corrientes de calcio, estos autores observaron variaciones en la cantidad de neuronas serotoninérgicas del rafe. El aumento de la frecuencia de las espigas de calcio, que se logró sobre-expresando canales de sodio voltaje dependientes, provocó una disminución en el número de neuronas serotoninérgicas. La disminución de la actividad de calcio se logró por sobre-expresión de canales de potasio voltaje dependiente (Kir) y provocó un aumento en el número de las neuronas serotoninérgicas. En este modelo, un cambio en el nivel de actividad desencadena la re-especificación del neurotransmisor como mecanismo para regular la actividad eléctrica del sistema, de forma de mantener la homeostasis. Este ejemplo propone un novedoso mecanismo de plasticidad que se desencadena cuando señales externas regulan vías de señalización intracelular cambiando el perfil proteico de la neurona y la función que cumple en el circuito. Este tipo de plasticidad controlaría el nado del embrión en el agua.

Otro ejemplo en el cual ocurre la re-especificación de un neurotransmisor con fin adaptativo es el mecanismo de camuflaje de *Xenopus*. En este caso se desencadena por un estímulo sensorial. La luz activa las neuronas ganglionares de la retina que

aumentan la actividad espontánea de células del núcleo supraquiasmático, algunas de las cuales comienzan a sintetizar dopamina. En este caso la dopamina liberada inhibe las células melanotropas y la producción de melanina, palideciendo la piel del embrión para hacerlo menos visible (Dulcis y Spitzer, 2008).

Otro fenómeno plástico que involucra a la serotonina se observó en cultivos organotípicos de la médula espinal de ratón: en la médula espinal aislada se observa una disminución de las fibras serotoninérgicas, lo cual provoca la aparición de células 5-HT+. Ese fenómeno puede ser bloqueado activando receptores serotoninérgicos 5-HT1A (Branchereau et al., 2002). Por lo tanto, la inervación serotoninérgica extrínseca proveniente del rafe inhibiría la síntesis de serotonina en neuronas de la médula espinal. En cultivo fenómeno se revierte al suprimir dicha inervación mediante la sección total. Estas neuronas podrían ser una fuente intrínseca de serotonina que compensaría la denervación.

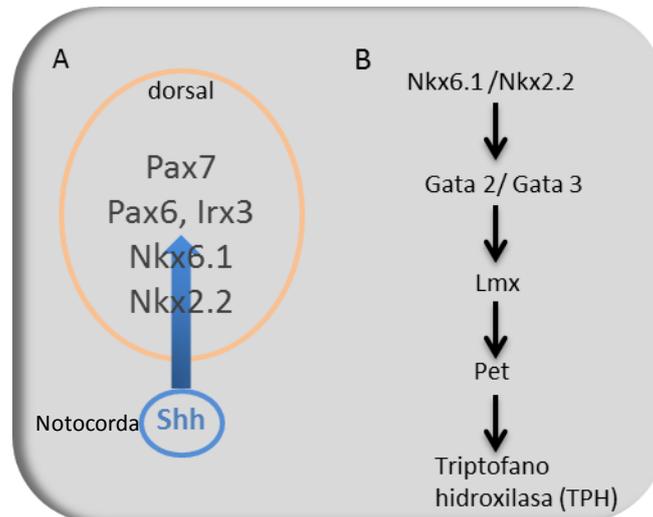
### **Neurogénesis durante el desarrollo embrionario y la vida post-natal**

Los mecanismos de plasticidad y reparación del sistema nervioso son similares a los procesos que ocurren durante la neurogénesis y desarrollo del mismo, por lo tanto es pertinente recordarlos y enfatizar específicamente las vías vinculadas a la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas.

Para comprender el funcionamiento del sistema nervioso se requiere conocer cómo surge y cómo puede modificarse a lo largo de la vida. El desarrollo del sistema nervioso es un mecanismo que depende de factores ambientales y factores de transcripción (FT) que determinan los elementos celulares que lo componen y su interrelación (Sanes et al., 2006). Los principios básicos se han conservado a lo largo de la evolución en los diversos organismos. En los vertebrados se origina a partir del ectodermo, del cual surge la placa neural. Ésta, al plegarse, forma el tubo neural. A partir de este último se generan la mayoría de las neuronas y glías del sistema nervioso central. En la unión del tubo neural y el ectodermo se encuentra la cresta neural que es fuente de la mayoría de las neuronas y glías del sistema nervioso periférico (Sanes et al., 2006).

La interacción con tejidos adyacentes a través de señales difusibles es fundamental para la inducción neural. Se han descrito tres moléculas capaces de inducir la expresión de genes neurales: Noggin, cordina y folistatina que se expresan en la etapa de gastrulación y se unen a BMP o activina. Estas moléculas se liberan desde el mesodermo y son fundamentales para el desarrollo del sistema nervioso ya que bloquean la diferenciación hacia células de la epidermis. Así se activa la expresión de los **genes pro-neurales** que inducen la segregación de neuroblastos. Estudios de expresión génica luego del tratamiento con cordina determinaron que algunos genes de la familia *sox* se expresan tempranamente en la placa neural. Algunos de los genes activados por Sox codifican los factores de transcripción bHLH de unión al ADN, que colaboran en la determinación neuronal.

Posteriormente, la notocorda a través del factor difusible Sonic hedgehog (Shh) determina la polaridad dorso-ventral del tubo neural y el destino de las células de la médula espinal (figura 5A). Según el nivel de Shh se activa la expresión de genes de clase 2 y se apaga la expresión de genes clase 1. Ambas clases se reprimen mutuamente, por lo tanto la expresión de unos no se superpone con los otros. De esta forma se regula la determinación celular y su ubicación final en la médula espinal. En la zona ventral del tubo neural se expresan genes que codifican los FT Nkx2.2 y Nkx6.1. Mientras que Pax6, Irx3 y Pax7 se expresan en la zona intermedia y la zona dorsal, donde la concentración de Shh es más baja. Los FT Nkx2.2 y Nkx6.1 se expresan transitoriamente en los precursores serotoninérgicos (Briscoe et al., 1999). Se ha demostrado que ambos colaboran en la inducción de otros FT como Gata2 y Gata3 (figura 5B). El factor Gata2 activa la transcripción de los FT Lmx y Pet, los cuales son necesarios para la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas (Nefzger et al., 2011). Por lo tanto, la expresión de genes pro-neurales en una célula es un indicador de su potencial neurogénico.



**Figura 5.** **A\_** Esquema del tubo neural y notocorda. La expresión de FT está regulada por el gradiente de Shh durante el desarrollo. **B\_** Vía de señalización intracelular necesaria para la diferenciación de neuronas serotoninérgicas.

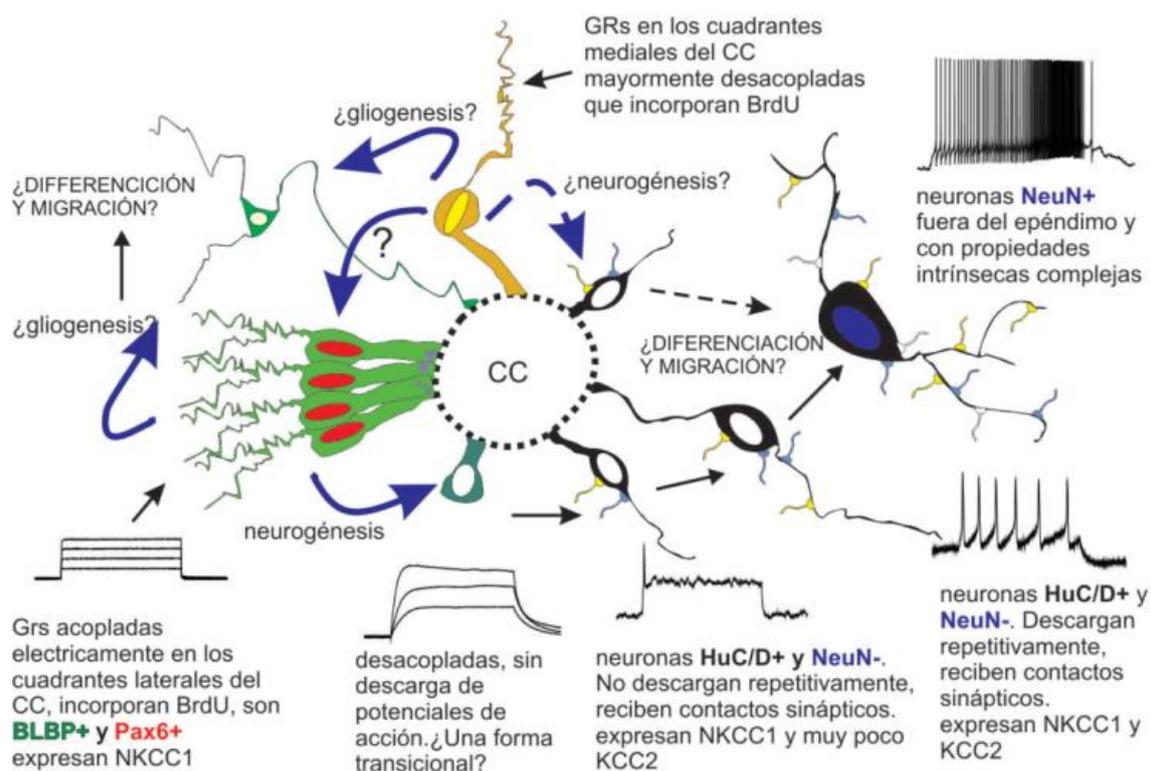
Un aspecto relevante de la señalización por Shh es que afecta la diferenciación neuronal en la médula espinal antes de la formación de las sinapsis regulando las espigas de calcio y otro factor difusible: BDNF (factor neurotrófico cerebral), el cual es liberado en respuesta a dicha actividad y estimula la diferenciación de neuronas inhibitorias (Borodinsky et al., 2012; Güemez-Gamboa et al., 2014). Estos trabajos muestran que el programa genético de una neurona induce la expresión de genes específicos y luego la actividad eléctrica es capaz de regular la expresión de FTs e inducir la re-especificación del neurotransmisor.

Una vez finalizado el desarrollo aún persisten algunas regiones neurogénicas activas en el sistema nervioso. Las primeras publicaciones sobre neurogénesis en el cerebro adulto se basaron en la inyección intratecal o sistémica de timidina tritiada (nucleótido marcado que se incorpora al ADN en la fase de síntesis) y su posterior detección en secciones de tejido fijado (Altman, 1962; Altman y Das, 1965). En esos experimentos se detectaron núcleos marcados en células de tipo glial, neuroblastos y neuronas, sugiriendo la existencia de neurogénesis en algunas regiones del cerebro de mamífero adulto.

Actualmente se reconocen dos regiones en las cuales persiste la neurogénesis post-natal: la zona sub-ventricular del cerebro y la zona sub-granular en el hipocampo (Lledo et al., 2006; Fuentealba et al., 2012). En ambos nichos la generación de nuevas

neuronas y su incorporación a los circuitos son mecanismos plásticos de adaptación a un medio cambiante.

En la médula espinal de tortuga y rata nuestro grupo ha mostrado que la zona alrededor del conducto ependimario o canal central (CC) contiene células con características de progenitores similares a las descritas en otros nichos neurogénicos. Los primeros estudios realizados con marcadores de proliferación (BrdU) en la tortuga de agua dulce demostraron la presencia de células proliferantes tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca de la médula espinal (Fernández et al., 2002). Luego de la inyección de BrdU (1 hora y 24 horas post-inyección) se observó una gran densidad de núcleos marcados alrededor del CC. Las células que proliferaron presentaron fenotipos heterogéneos: seis días después de la inyección de BrdU se encontraron co-localizando con moléculas características de células post-mitóticas como TUC-4, marcadores neuronales como GABA o de glía como GFAP. A los 50 días post-inyección se encontraron células BrdU+/NeuN+, es decir neuronas maduras. Estos datos sugieren que la región que rodea al CC de la médula es la fuente principal de nuevas células. Otro estudio posterior demostró una concentración mayor de núcleos BrdU+ en los cuadrantes laterales de la zona que rodea al canal central (Russo et al., 2008).



**Figura 6.** Esquema de los tipos celulares encontrados en el epéndimo de la médula espinal de *Trachemys dorsalis* (Tomado de C. Reali, Tesis doctoral). GRs: glías radiales.

La caracterización de las células alrededor del canal central demostró que se trata de una población heterogénea (figura 6). Algunas células tienen propiedades eléctricas similares a los precursores neuronales: baja resistencia de entrada, acople eléctrico mediante uniones gap y carecen de corrientes activas. Además, expresan el marcador de glía radial BLBP y el factor de transcripción Pax6 que se expresan en glías radiales con potencial neurogénico. Estos grupos de precursores BLBP+ envuelven células con características de neuronas inmaduras con alta resistencia, pequeñas corrientes activas y que expresan HuC/D, un marcador neuronal temprano. También se encontró un grupo de neuronas HuC/D+ capaces de descargar repetitivamente, con contactos sinápticos, pero que no expresan marcadores de neuronas maduras. Finalmente, en los cuadrantes mediales se encontró una población de glías radiales desacopladas que también incorporaron BrdU, las cuales podrían ser células madres ubicadas alrededor del CC (Russo et al., 2004, 2008).

En los mamíferos también existe una zona proliferativa alrededor del CC con algunas características similares a los nichos neurogénicos del cerebro (Marichal et al., 2009,

2012). En esta zona se propone la existencia de dominios funcionales: en los dominios laterales se agrupan células que combinan características de endimocitos y glías radiales (expresan marcadores como vimentina, S-100 $\beta$ ). Estas células se hallan acopladas mediante Cx43, mientras que en los dominios mediales se encuentran otras células con características morfológicas de glías radiales pero desacopladas y heterogéneas en términos de sus fenotipos electrofisiológicos. En el CC de las ratas, también se encontraron células que expresan marcadores de neuronas inmaduras (HuC/D, DCX, PSAN-CAM) y con fenotipos electrofisiológicos que sugieren diferentes grados de diferenciación de la excitabilidad. Las células endimarias localizadas alrededor del CC de la médula espinal serían las células madre, ya que *in vitro* son capaces de generar neuro-esferas (Barnabé-Heider et al., 2010).

Por lo tanto, en la zona que rodea al canal de reptiles y mamíferos podemos encontrar neuronas en distintos grados de maduración como ocurre en los nichos neurogénicos del cerebro. La presencia de precursores en la médula espinal resulta muy interesante por su potencial capacidad de reparar la médula frente a una lesión. En mamíferos las células localizadas en la región endimaria proliferan, su progenie migra hacia el sitio dañado y se diferencia en astrocitos u oligodendrocitos (Meletis et al., 2008). En zonas lesionadas de la médula espinal de la tortuga también hay un aumento en la proliferación de la glía radial (Rehermann et al., 2011). Un posible abordaje terapéutico podría estar basado en la manipulación del proceso de diferenciación de estas células hacia los distintos tipos neuronales y gliales necesarios para recuperar la funcionalidad. Esta estrategia representa una alternativa al trasplante de células exógenas en el lugar de la lesión.

La serotonina también estaría involucrada en procesos de neurogénesis y diferenciación celular. La “hipótesis neurogénica de la depresión” postula que un fenotipo depresivo puede ser consecuencia de una falla reversible de la neurogénesis en el *Gyrus dentado* (Petrik et al., 2012). El tratamiento con agonistas de los receptores serotoninérgicos tipo 1A y 2 produciría un aumento en la cantidad de células mitóticamente activas (marcadas con el análogo de timidina BrdU) en el hipocampo de ratas adultas (Banar et al., 2004). Por otra parte, el grupo de Gaspar analizó dos

modelos de ratones con depleción constitutiva de serotonina y encontró que la neurogénesis en el *Gyrus dentado* no disminuye sino que aumenta en los plazos estudiados. Una semana después de inyectar BrdU encontró mayor cantidad de núcleos BrdU+ en los mutantes respecto a los controles (Diaz et al., 2013). A las dos semanas las células BrdU+ expresaban también marcadores de neuronas como doblecortina, calretinina y calbindina, lo que indica que las nuevas células sobrevivieron y continuaron el proceso de maduración. En este caso la neurogénesis no disminuye sino que aumenta en ausencia de serotonina y el tratamiento con agonistas de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> normaliza los números obtenidos en los grupos experimentales. Por lo tanto, dependiendo del modelo y el protocolo utilizado se pueden observar distintos efectos de la serotonina sobre la proliferación en el sistema nervioso.

## Antecedentes

En condiciones normales la inervación serotoninérgica de todo el sistema nervioso proviene de los núcleos del rafe, los cuales contienen la mayoría de las neuronas 5-HT+. En la médula espinal hay muy pocas células 5-HT+ (Branchereau et al., 2002). En la tortuga, estas células se localizan en la región ventromedial de la sustancia gris, mayoritariamente de los segmentos cervicales y lumbo-sacros (Kiehn et al., 1992). Esta distribución se ha conservado en toda la escala zoológica (Törk, 1990; Kiehn et al., 1992).

La especificación de las neuronas serotoninérgicas depende de la expresión de factores de transcripción como Nkx2.2, Nkx6.1, Lmx1b y Pet (Briscoe et al., 1999; Nefzger et al., 2011). En *Xenopus laevis* la actividad es capaz de regular la expresión de algunos de ellos (Demarque y Spitzer, 2010). Si provocamos un cambio en la actividad del circuito, por ejemplo al seccionar la médula espinal, es esperable que cambie la regulación de los factores de transcripción y se modifique la expresión de proteínas en neuronas caudales a la lesión. Por lo tanto, es posible que algunas neuronas del circuito afectado comiencen a sintetizar nuevas enzimas, como las que componen la vía de síntesis de serotonina. Estos cambios intracelulares tendrían como objetivo recuperar la homeostasis del sistema, en este caso aumentando el número de neuronas que

expresan neurotransmisores excitatorios. Este contexto valida nuestro interés en evaluar la posible plasticidad de la innervación serotoninérgica a nivel espinal luego de una lesión traumática de la médula espinal (Branchereau et al., 2002) y profundizar en los posibles mecanismos subyacentes. Nos planteamos las siguientes interrogantes: ¿Qué ocurre con la innervación serotoninérgica en el segmento caudal a una lesión que interrumpe la continuidad de las vías descendentes? ¿Aparecen nuevas células serotoninérgicas que intentan compensar el déficit causado por la desaparición de la innervación serotoninérgica descendente? Y si esto ocurre, ¿las nuevas células 5-HT+ son neuronas neo-generadas o cambian su fenotipo neuroquímico?

## **Hipótesis**

En la médula espinal de la tortuga hay mecanismos de plasticidad que mantienen la homeostasis del sistema serotoninérgico. La interrupción de la innervación serotoninérgica descendente por una lesión produciría un aumento en el número de neuronas serotoninérgicas a partir de progenitores o a la transformación de su fenotipo molecular original hacia neuronas que expresen serotonina.

## **Objetivo general**

Determinar los cambios en el sistema serotoninérgico en los segmentos caudales a la lesión espinal en tortugas juveniles.

### *Objetivos específicos*

- 1\_ Cuantificar, estudiar la localización y la morfología de las células serotoninérgicas en la médula de un animal lesionado en relación a la condición control.
  
- 2\_ Analizar, mediante la incorporación de BrdU, si los cambios en el número de células serotoninérgicas pueden deberse a neurogénesis de células 5-HT+.
  
- 3\_ Determinar si las células 5-HT+ de la médula lumbar de la tortuga son neuronas y si expresan otros marcadores moleculares que las caractericen desde el punto de vista de su naturaleza y linaje.

4\_ Revelar si las motoneuronas espinales reciben inervación serotoninérgica luego de la lesión.

## Estrategia experimental

### Animales

#### *Modelo experimental*

Para el estudio de los mecanismos plásticos que ocurren en la médula espinal de la tortuga luego de una lesión utilizamos ejemplares juveniles (tres meses a un año de vida) de la especie *Trachemys scripta elegans*. Los quelonios pertenecen a la clase Reptilia, de la cual han evolucionado los mamíferos. Su SNC es similar en estructuras y funciones al de los mamíferos, lo que nos permite extrapolar algunas generalizaciones. Al igual que los anfibios, estas tortugas no presentan shock espinal y logran una buena recuperación luego del daño medular severo. En suma creemos que estos estudios pueden aportar datos nuevos sobre las capacidades intrínsecas de reparación del SNC de los vertebrados.

#### *Condiciones de hospedaje*

Los protocolos experimentales utilizados y las condiciones del acuario han sido previamente aprobados por la CNEA. Los ejemplares utilizados fueron importados, desde una granja de reproducción y cría localizada en Estados Unidos, según los requisitos solicitados por la Dirección Nacional de Recursos Acuático del MGAP. Se alojaron en el bioterio de poiquiloterms del IIBCE, en un acuario exclusivo para quelonios con temperatura controlada de 28°C, luz natural y artificial. Fueron alimentados tres veces por semana con ración balanceada recomendada para reptiles. Las peceras fueron cambiadas semanalmente.

### **Localización del sistema serotoninérgico en el tronco encefálico de la tortuga *Trachemys scripta elegans***

Para obtener mayor información sobre el origen de la inervación serotoninérgica extrínseca de la médula espinal en los quelonios y visualizar el origen de las vías descendentes realizamos una reconstrucción tridimensional del tronco encefálico de *Trachemys scripta elegans*. Se utilizó un ejemplar juvenil fijado con formaldehído. La pieza se encastró en una mezcla de gelatina al 1,5%: albúmina al 40% en la proporción

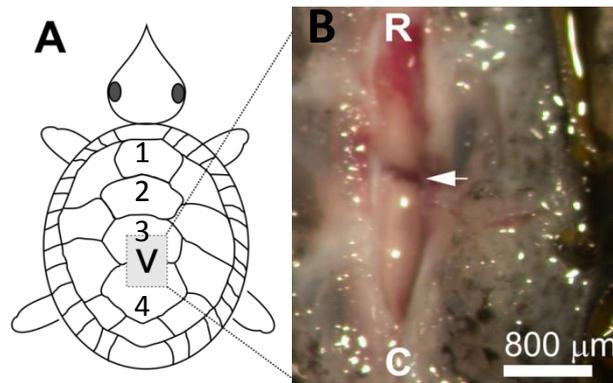
1:2 y se usó glutaraldehído para coagularla. Se obtuvieron secciones seriadas de 70  $\mu\text{m}$  en un vibrátomo y se utilizó una técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar serotonina (5-HT). Una cada tres secciones se fotografió en el microscopio confocal y se usó para la reconstrucción. Se utilizó el programa Biovis3D ([www.biovis3d.com](http://www.biovis3d.com)) que permite dibujar sobre cada fotografía el contorno de la estructura, contornos internos y unidades internas. Una vez dibujadas todas las secciones de la pieza, el programa realiza la reconstrucción 3D, que puede ser fotografiada o filmada desde distintos ángulos.

## Lesiones espinales

Para abordar el **objetivo general** se utilizaron 16 ejemplares a los cuales se les realizó una lesión espinal y se utilizaron 12 ejemplares como controles sham. Con el fin de reducir el número de animales necesario para realizar todos los ensayos cuando fue posible se utilizaron los mismos ejemplares para cuantificar el número de células serotoninérgicas, la proliferación celular y análisis de los marcadores moleculares, ya que son técnicas compatibles.

Para realizar las lesiones se utilizó el siguiente protocolo (Rehermann et al., 2009, 2011):

- 1- Se indujo la sedación de los animales con ketamina (40 mg/kg i.p.).
- 2- Una vez alcanzada la anestesia profunda (cuando el animal no responde a estímulos nociceptivos) se procedió a abrir una pequeña ventana entre la 3ª y 4ª placa dorsal del caparazón y se realizó una laminectomía para exponer la medula espinal torácica baja (figura 7).
- 3- Bajo control visual con lupa se llevó a cabo una **sección completa** en el plano transversal de la médula espinal con una hoja de bisturí pequeña. Los animales **control sham** recibieron el mismo tratamiento anterior, exceptuando la sección medular.
- 4- Posteriormente, se lavó la zona con solución salina y la ventana en el caparazón se selló utilizando cianacrilato en gel.
- 5- Luego de recuperarse de la anestesia (1 a 2 horas) los animales fueron reintroducidos en el acuario y mantenidos en las condiciones ya descritas.



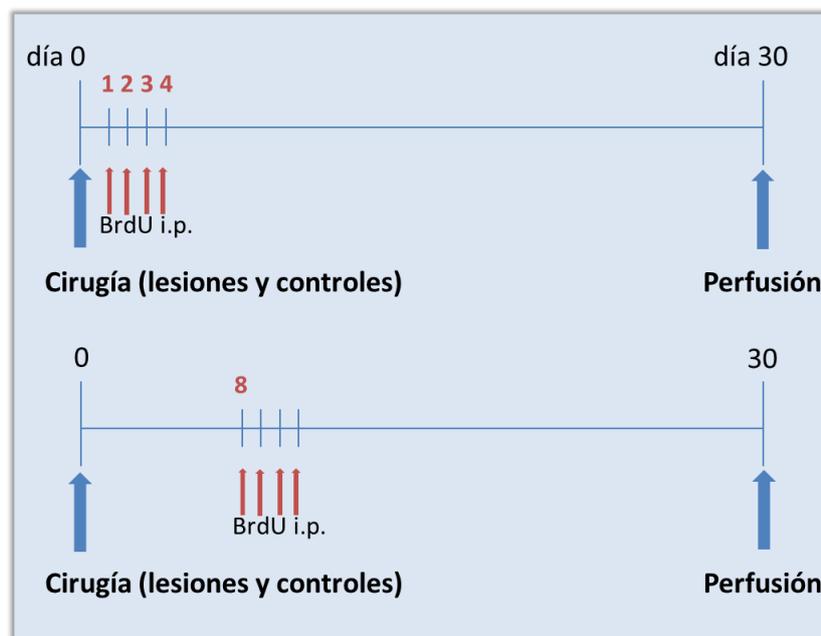
**Figura 7.** **A\_** Esquema de la vista dorsal de una tortuga. La letra “V” indica el nivel en el cual se realizó la ventana para lesionar la médula espinal a nivel torácico bajo. **B\_** Fotografía de la médula inmediatamente después del corte. La flecha muestra la hemorragia causada por la ruptura de vasos sanguíneos (R: rostral; C: caudal).

### *Análisis del comportamiento motor para determinar la magnitud de la lesión*

Luego de la recuperación de la cirugía (aproximadamente 4 horas post-lesión) se realizaron ensayos conductuales a todas las tortugas lesionadas a fin de seleccionar para los estudios morfológicos únicamente aquellos ejemplares con una sección completa de la médula (Rehermann et al., 2009). Al grupo control se le realizaron los mismos ensayos. El primero consistió en fijar el cuerpo de la tortuga por su cara ventral en un soporte elevado sin interferir con el movimiento de las extremidades y observar el despliegue evasivo luego de apretar la cola una vez con una pinza. Las tortugas control realizan una variedad de movimientos evasivos mientras que las tortugas lesionadas presentan una respuesta estereotipada que culmina con los miembros posteriores en extensión (Rehermann et al., 2009). El segundo ensayo consistió en estimularlas mecánicamente a caminar sobre una superficie rígida y plana (aproximadamente 30 cm de largo). En las tortugas control se observa el despliegue locomotor normal. Las tortugas lesionadas arrastran el cuerpo sobre la superficie usando solamente las extremidades anteriores, mientras mantienen las posteriores retraídas bajo el caparazón. (Rehermann et al., 2009). El tercer ensayo consiste en observar la conducta durante el nado en condiciones irrestrictas. Antes de la perfusión de los ejemplares se realizó nuevamente el ensayo conductual para evaluar la recuperación locomotora de cada ejemplar.

## Tratamiento *in vivo* para marcado de células mitóticas

Luego de las lesiones algunas tortugas se utilizaron para realizar el **objetivo específico 2**, el cual se realizó en dos etapas. En primer lugar, *in vivo* se realizó el tratamiento con el análogo de timidina 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) para detectar células mitóticas en ejemplares lesionados (n=6) y control (n=6). Para ello se utilizaron dos protocolos de saturación con BrdU que consistieron en la aplicación de dos inyecciones intraperitoneales diarias de 100 mg/kg cada una, durante cuatro días, comenzando a las 24 hs (Grupo 1: lesionadas n=3, controles n= 3) o comenzando el octavo día post-lesión (Grupo 2: lesionadas n=3, controles n=3). En segundo lugar, treinta días después de la lesión, las tortugas tratadas se perfundieron (figura 8) y posteriormente se continuó el procesamiento del tejido necesario para el análisis de la incorporación de BrdU y 5-HT según el protocolo que se detallará en la siguiente sección. En algunos casos se realizó co-inmunomarcado con otros marcadores celulares.



**Figura 8.** Cronogramas de inyecciones de BrdU. Se usaron dos protocolos de saturación de cuatro días: Grupo 1, días 1 a 4 (línea superior) o Grupo 2, días 8 a 11 (línea inferior).

## Perfusión de los animales, preparación del tejido y detección de los marcadores moleculares

Luego de cumplidos los tiempos de sobrevivencia correspondientes, todos los animales lesionados y controles fueron sometidos a eutanasia y fijados. Los procedimientos se realizaron en ejemplares anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.). Cuando

se logró una anestesia profunda se procedió a remover el plastrón para acceder al corazón, penetrar al ventrículo con la aguja y canular el cayado aórtico. En primer lugar el sistema se lavó con solución de Ringer modificada (NaCl 96,5 mM, KCl 2,6 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 31,5 mM, Glucosa 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, pH 7.6) y luego se perfundió con formaldehído al 10%, tamponado con fosfato de sodio 0,1M, pH 7.4. Posteriormente se disecaron los segmentos correspondientes al ensanchamiento lumbar (largo total= 0.8 a 1 cm). Para obtener secciones representativas del ensanchamiento, éste se cortó a la mitad, ambas mitades se colocaron paralelas de forma de comenzar a cortar la región central del mismo, ambas se encastraron en bloques de gelatina y albúmina. A partir de los bloques se obtuvieron secciones transversales de 70 µm utilizando un micrótopo vibratorio (Leica VT1000S).

En todos los casos se trabajó con las secciones flotantes de 70 µm a las cuales se les realizaron técnicas de inmunofluorescencia para detectar los marcadores moleculares de interés (ver tabla 2). El protocolo general se describe a continuación: una vez obtenidas las secciones y luego de lavar con tampón fosfato, las mismas se incubaron en anticuerpos primarios específicos para los marcadores de interés, diluidos en tampón fosfato y tritón X-100 al 0,3% (tabla 2), durante 48 hs. Finalmente se incubaron en anticuerpos anti-especie conjugados a un fluoróforo y diluidos 1: 1000 en la misma solución que los primarios. En algunos casos se realizó la incubación con múltiples anticuerpos primarios, para lo cual se seleccionaron los fluoróforos adecuados para la detección simultánea sin solapamientos espectrales. Los preparados se fotografiaron utilizando el microscopio confocal Olympus VF300 y el programa Fluoview 5 del IIBCE.

Para abordar el **objetivo específico 1** (cuantificar, estudiar la localización y la morfología de las células serotoninérgicas en la médula de un animal lesionado en relación a la condición control) se realizaron protocolos de inmunofluorescencia para detección y posterior cuantificación de células 5-HT+ en animales lesionados y controles. La presencia de las células 5-HT+ en el ensanchamiento lumbar se estudió en tres tiempos de sobrevida post-lesión: corto plazo (5 días post-lesión [DPL], 3 tortugas), intermedio (10 DPL, 3 tortugas) y largo plazo (30 DPL, 8 tortugas). Si bien se exploraron estos tres grupos, esta tesis se centra en el análisis cuantitativo de los

grupos de 30 DPL (lesionado y control). Los datos aportados por los tiempos más cortos nos sirvieron de contexto para poder interpretar los hallazgos a los 30 DPL y serán foco de un trabajo posterior. Se consideró que a los 5 días el animal se encuentra en condición aguda; entre 10 y 30 días se puede considerar en condición crónica (ver tabla 1). Como controles sham se utilizaron en total 12 tortugas (5 DPL: n=3, 10 DPL n=3, 30 DPL: n=6).

Períodos estudiados	Días post-lesión (DPL)	Condición del animal
corto plazo	5	aguda
plazo intermedio	10	crónica
largo plazo	30	crónica

**Tabla 1.** Tiempos post-lesión en los que se analizó la presencia de serotonina en la médula lumbar.

Para continuar con el **objetivo específico 2** se analizó la incorporación de BrdU en células mitóticas de los individuos tratados mediante la detección por inmunofluorescencia con anti-BrdU y se buscó la co-localización con 5-HT. También se realizó doble inmunomarcado con BrdU y marcadores de células gliales (BLBP, GFAP y S-100).

Para abordar el **objetivo específico 3** (determinar si las células 5-HT+ de la médula lumbar son neuronas y si expresan otros marcadores moleculares que las caractericen desde el punto de vista de su naturaleza y linaje) se utilizó tejido proveniente de tortugas lesionadas y controles. Se realizó doble inmunomarcado con anti-5-HT y anticuerpos específicos para marcadores de neuronas o neuroblastos (HuC/D y DCX) o factores de transcripción (anti-Nkx2.2 o Nkx6.1)

Para abordar el **objetivo específico 4** (revelar si las motoneuronas espinales reciben inervación serotoninérgica luego de la lesión) se utilizó tejido proveniente de tortugas lesionadas y controles en los cuales se realizó doble inmunomarcado con anti-5-HT y anti-ChAT.

ANTICUERPOS PRIMARIOS		
MOLÉCULAS BLANCO	ANTÍGENO (dilución)	PROVEEDOR
ADN	BrdU (1:80)	DSHB
Serotonina	5-HT (1:500)	IMMUNOSTAR
Acetilcolina	ChAT (1:100)	MILLIPORE
MARCADORES NEURONALES	HuC/D (1:100)	LIFE TECHNOLOGIES
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	NKx6.1 (1:10)	DSHB
	NKx2.2 (1:10)	DSHB
MARCADORES DE NEUROBLASTOS/MIGRACION	DCX (1:200)	SANTA CRUZ
MARCADORES DE CICLO CELULAR	PCNA (1:100)	ZYMED
MARCADORES GLIALES	BLBP (1:500)	MILLIPORE
	GFAP (1:500)	SIGMA
	S-100 (1:500)	DAKO

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.

### Análisis estadístico

En todos los ensayos los conteos se realizaron abarcando todo el espesor de la sección (70  $\mu\text{m}$ ) a lo largo del eje z, mediante visualización con el microscopio confocal.

Se contaron todas las neuronas 5-HT+ presentes en 10 secciones correspondientes al ensanchamiento lumbar de cada tortuga (lesionadas, n= 8 y controles, n= 6) y se analizó la distribución de estas células según su localización. Los resultados se expresan como el valor promedio  $\pm$  desvío estándar.

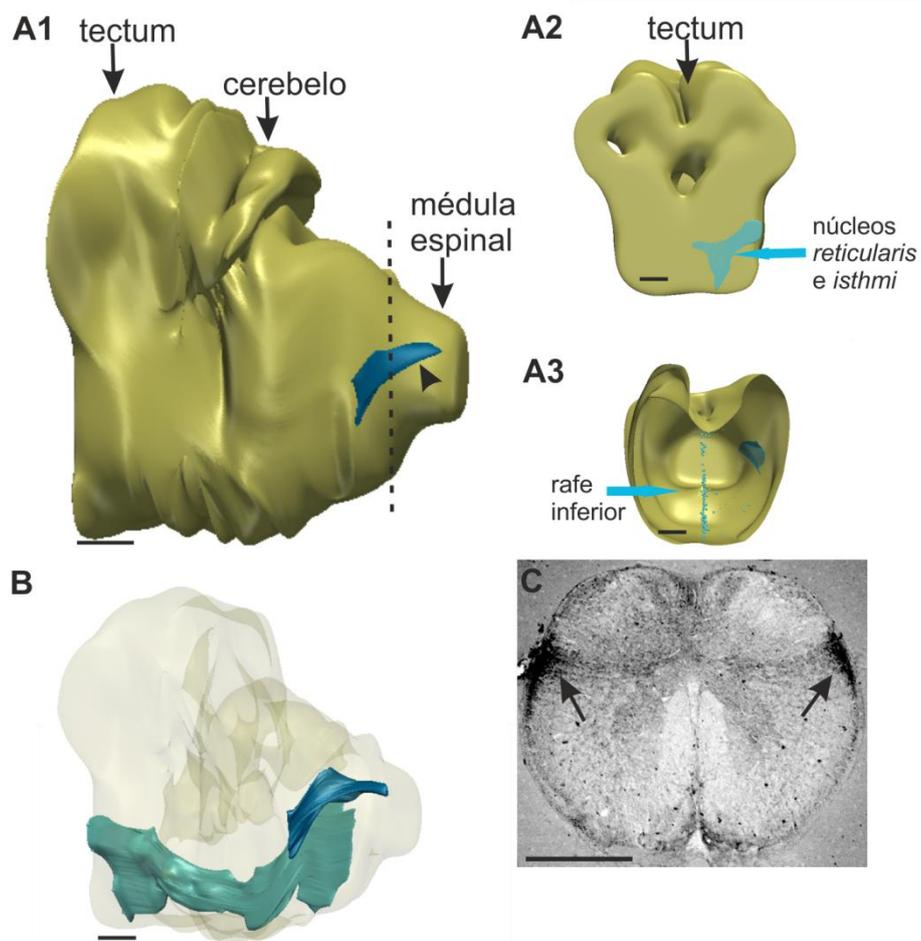
Para el análisis de la proliferación celular se contaron los núcleos BrdU+ localizados en un área de 32000  $\mu\text{m}^2$  alrededor del CC en 10 secciones correspondientes al ensanchamiento lumbar de cada tortuga pertenecientes al grupo 1: tratadas los días 1 a 4 post-lesión (lesionadas: n=3 y controles: n=3). Los resultados se expresan como el valor promedio  $\pm$  desvío estándar.

El valor estadístico de los datos fue estimado aplicando el test no paramétrico “U” de Mann-Whitney con un  $P < 0.05$ .

## Resultados

### Localización del sistema serotoninérgico en el tronco encefálico de la tortuga *Trachemys scripta elegans*: resultados del análisis tridimensional

La reconstrucción tridimensional del tronco encefálico combinada con inmunofluorescencia para serotonina permitió confirmar la localización de las neuronas serotoninérgicas presentes en el mismo (video 1). Cabe resaltar que en la región más caudal de la pieza se logró reconstruir y visualizar un haz de fibras serotoninérgicas que transcurre dorso-lateralmente hacia la médula (figura 9A1, punta de flecha y 9C, flechas). Este haz probablemente está formado por las fibras serotoninérgicas descendentes que inervan la médula espinal.



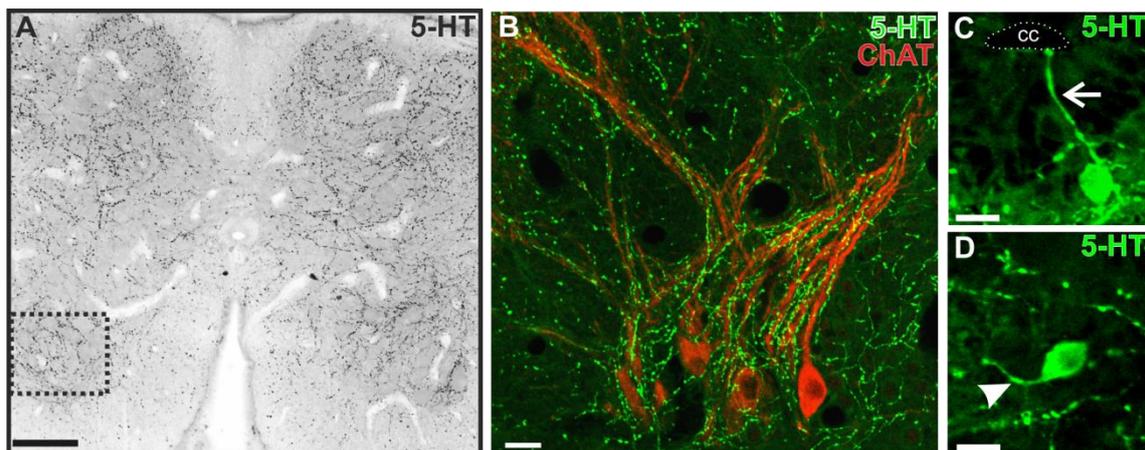
**Figura 9.** Reconstrucción tridimensional del tronco encefálico caudal y el sistema serotoninérgico en un ejemplar juvenil de *Trachemys scripta elegans*. **A1**\_Vista lateral del tronco encefálico y cerebelo (dorado). La punta de flecha señala las fibras 5HT+ que forman un

haz a nivel espinal (azul). La línea punteada señala el nivel del corte mostrado en A3. **A2**\_Vista de frente a nivel rostral con los núcleos *reticularis superior, inferior* e *isthmi* (flecha azul). **A3**\_Vista de frente correspondiente al nivel de la línea punteada en A1. En este nivel se encuentra el núcleo del rafe inferior. **B**\_Modelo 3D transparentado para visualizar la región que contiene las neuronas 5-HT+ (verde). **C**\_Sección transversal de médula cervical con las fibras 5-HT+ localizadas en el funículo lateral. Escala: A1 y B= 1000  $\mu\text{m}$ ; A2, A3, C= 500  $\mu\text{m}$ .

## Cuantificación de las células serotoninérgicas en el ensanchamiento lumbar

### Análisis de la presencia de serotonina en condiciones control

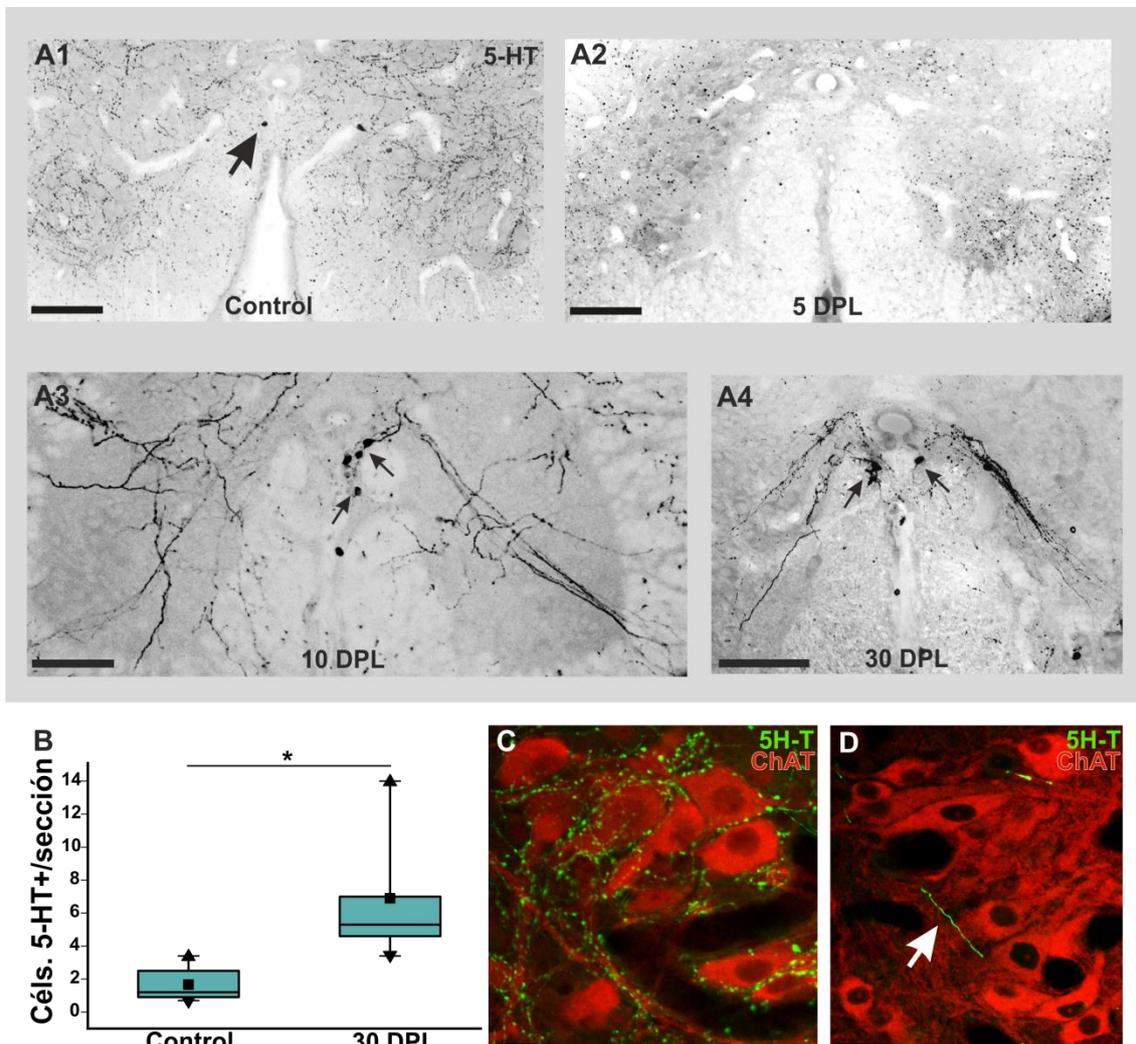
En tortugas control, una sección transversal a nivel de la médula espinal muestra numerosas fibras 5-HT+ varicosas que invaden la sustancia gris y blanca formando una trama densa (figura 10A). En el asta ventral, numerosos botones dibujan el contorno del cuerpo de las motoneuronas y las dendritas principales (figura 10B). En cuanto a la presencia de células serotoninérgicas, se encontraron escasos cuerpos celulares 5-HT+ ( $1,7 \pm 1$ ), algunos con un proceso apical en contacto con el canal central (figura 10C, flecha) y otros alejados del CC, localizados en la comisura gris ventral (figura 10D).



**Figura 10.** Inmunomarcado para detectar serotonina en la médula lumbar. **A**\_ Fibras varicosas en una sección transversal. Se observa gran cantidad de botones sinápticos en el asta ventral (recuadro). **B**\_Doble marcado con anti-5-HT y anti-ChAT. Se destaca la gran cantidad de terminales 5-HT+ (verde) sobre las motoneuronas ChAT+ (rojo). **C**\_Célula 5-HT+ con un proceso apical que llega hasta la luz del CC (flecha). **D**\_Célula 5-HT+ localizada en la comisura gris ventral con un proceso indicado por la punta de flecha. Escala A= 100  $\mu\text{m}$ , B= 20  $\mu\text{m}$ , C y D= 10  $\mu\text{m}$ .

## Análisis de la presencia de serotonina en el ensanchamiento lumbar luego de la lesión

Luego de realizar una sección completa de la médula a nivel torácico bajo, las fibras varicosas 5-HT+ en los segmentos caudales a la lesión van desapareciendo a lo largo del tiempo analizado (figura 11A2-4). A los 10 días post-lesión se observó un aumento en el número de células 5-HT+, algunas con un corto proceso, otras con largos y gruesos procesos (figura 11A3). En el largo plazo (30 días post-lesión, 30 DPL) se encontraron células 5-HT+ localizadas en la zona ventral al CC, en contacto con el mismo o no. Las fibras varicosas desaparecieron casi totalmente (figura 11A4). Por lo tanto, treinta días después de la lesión el perfil serotoninérgico de las secciones de médula lumbar es cualitativa y cuantitativamente distinto al de la médula normal. El análisis cuantitativo en estos animales lesionados mostró un promedio de  $7 \pm 3$  células serotoninérgicas por cada sección de  $70 \mu\text{m}$  de espesor (figura 11B).



**Figura 11. A\_** Inmunomarcado para serotonina en secciones del ensanchamiento lumbar de tortugas control (A1) y lesionadas fijadas a distintos tiempos post-lesión (A2-4). Imágenes de inmunofluorescencia, invertidas y en escala de grises. Las flechas señalan células 5-HT+. **B\_** Cuantificación de células 5-HT+ en el ensanchamiento lumbar. Se detectó una diferencia significativa (\*:  $p < 0.05$ ) entre el grupo control y el grupo analizado 30 días post-lesión (30 DPL). Rango: perc. 75,25, — Mediana. Referencias: ■ promedio, — valor máximo, — valor mínimo, ▲ percentil 99, ▼ percentil 1. **C y D\_** Co-inmunomarcado con anti-ChAT para identificar las motoneuronas (rojo). En el grupo control (C) se observan numerosos botones 5-HT+ (verde), mientras que en el grupo lesionado (D) sólo se observan escasos procesos 5-HT+ (flecha) cercanos a las motoneuronas. Escala: A1-4= 50  $\mu$ m, C y D= 20  $\mu$ m.

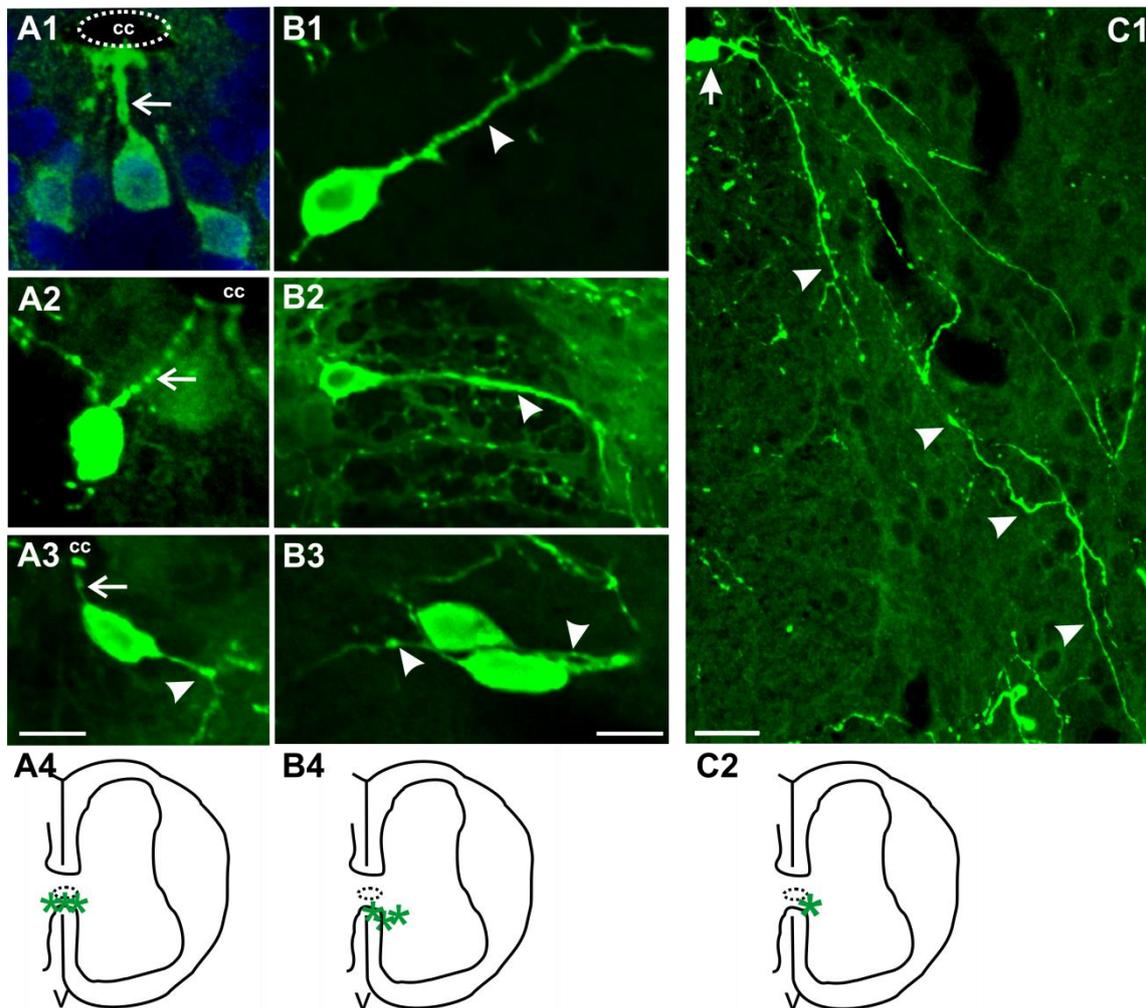
La inervación serotoninérgica sobre las motoneuronas (Mns) del ensanchamiento lumbar a los treinta días después de la lesión cambió sustancialmente ya que no se detectaron botones sinápticos 5-HT+ (figura 11C y D). Sin embargo, considerando que la señalización serotoninérgica puede ser en volumen y que se trata de una molécula pequeña capaz de difundir desde el sitio de liberación, podemos suponer que la serotonina liberada desde los procesos (figura 11D) podría llegar al pool de motoneuronas, como se ha demostrado recientemente (Cotel et al., 2013).

### Localización y morfología de las células serotoninérgicas

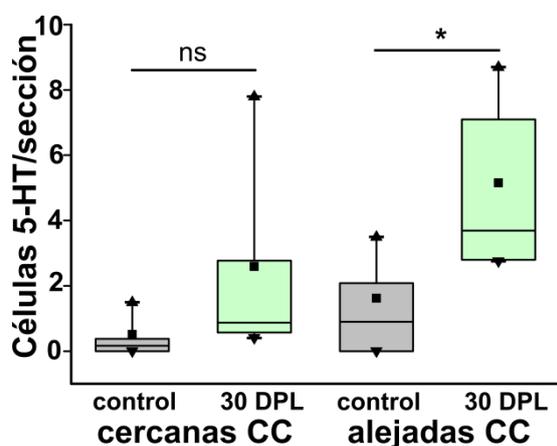
Las células 5-HT+ son pequeñas (10 a 20  $\mu$ m) y tienen morfologías diversas, tanto en la médula lesionada (30 DPL) (figura 12) como en la médula control (figura 10C y D). Todas se localizaron en zonas ventrales de la médula, en la región del CC y en la comisura gris. En la figura 12 se muestran células 5-HT+ encontradas en tortugas lesionadas. En la figura 12A se muestran ejemplos de células 5-HT+ localizadas en la región ventral del CC con un proceso apical en contacto con la luz del mismo, similares a las descritas previamente como neuroblastos (Russo et al., 2004; Reali et al., 2011). Algunas presentaron además otro proceso basal que se proyectaba hacia el parénquima (figura 12A3). Las células 5-HT+ alejadas del epéndimo encontradas en tortugas lesionadas presentaron morfología de tipo neuronal, con procesos de longitudes variables (figura 12B). Cabe resaltar que solamente en las tortugas lesionadas se encontraron células 5-HT+ con procesos largos que invadían el asta ventral y que en algunos casos llegaban hasta la piamadre (figura 12C).

Por lo tanto, nuestro análisis permitió distinguir dos poblaciones de células 5-HT+: a) una población que forma parte de la cohorte de células que rodean el CC, poseen un

proceso apical que llega hasta la luz del canal y las denominamos Cercanas al CC; b) otra población, sin contacto visible con el CC, se agrupa aquí bajo la denominación genérica de Células alejadas. El análisis cuantitativo de estas células 5-HT+ mostró en las tortugas lesionadas un leve aumento en el número de células que contactan el CC respecto al control, aunque la diferencia no fue significativa. Para la población de células alejadas del CC si se encontró una diferencia entre las tortugas control ( $1,6 \pm 1,5$ ) y las lesionadas 30 DPL ( $5,1 \pm 2,5$ ) (figura 13).



**Figura 12.** Células 5-HT+ en médula lumbar de tortugas lesionadas. **A1-A3**\_Células 5-HT+ con proceso apical (flechas) en contacto con el CC. **B1-3**\_Células 5-HT+ sin proceso apical visible. Las puntas de flecha señalan otras prolongaciones 5-HT+. **C**\_Célula 5-HT+ cercana al cc, encontrada en una tortuga lesionada. Presenta una prolongación que transcurre por el asta ventral y llega casi hasta la superficie medular. La localización de las células que se muestran en los distintos paneles se indica con asterisco en los esquemas correspondiente debajo de cada columna (A4, B4 y C2). Escala: A y B= 10  $\mu$ m, C= 20  $\mu$ m.



**Figura 13.** Localización de las células 5-HT+: células con un proceso que llega al CC (“cercanas CC”) y células sin contacto visible (“alejadas CC”) (\*:  $p < 0.05$ ). **Gris:** grupo control; **verde:** grupo lesionado (30 DPL).

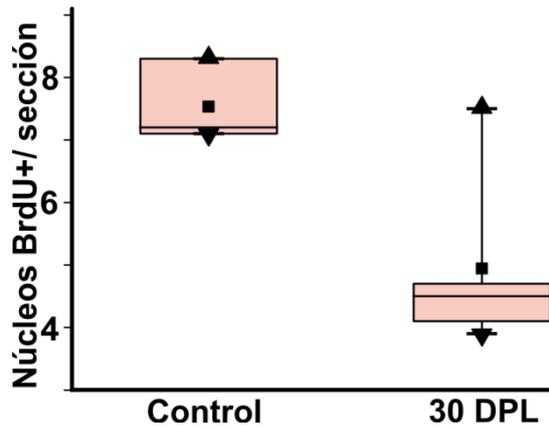
Desde el punto de vista de la recuperación de la locomoción, encontramos tortugas que comenzaron a recuperar la movilidad de los miembros posteriores a los 30 días post-lesión (Tabla 3). Cuando las tortugas se colocaron en el agua sólo utilizaron sus extremidades anteriores para desplazarse, mientras que las posteriores permanecían flexionadas o extendidas. Al entrar en contacto con una superficie sólida, las extremidades posteriores se retrajeron y en algunas ocasiones realizaron una secuencia de movimientos similar al paso.

Tortugas 30 DPL	No mueve miembros posteriores	mueve alguno de los miembros posteriores	mueve ambos miembros posteriores	camina
10	8	2	0	0

**Tabla 3.** Recuperación de la movilidad 30 días después de la lesión (DPL).

### Detección de proliferación celular mediante incorporación de BrdU

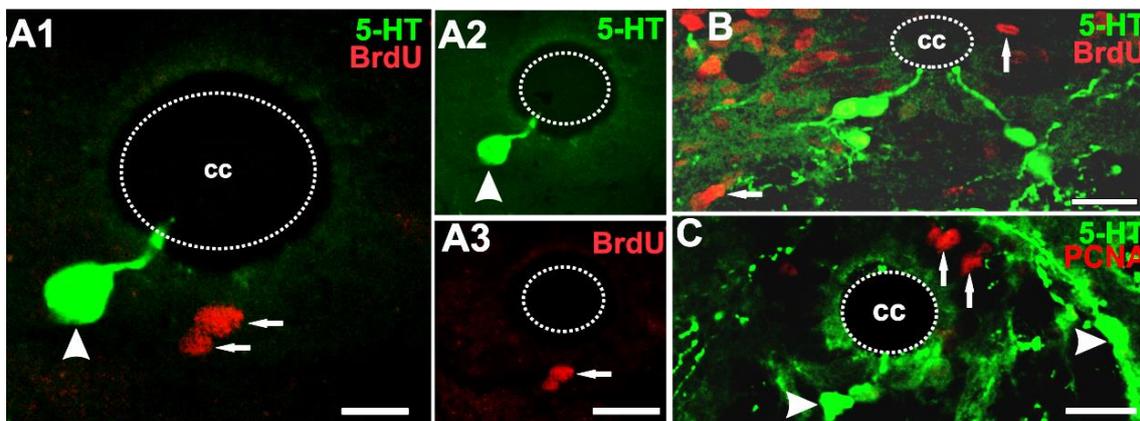
En el epicentro de la médula lesionada de tortuga se observa un aumento de la proliferación celular (Rehermann et al., 2011), por lo cual nos preguntamos si el aumento de células 5-HT+ en el ensanchamiento lumbar se podía explicar por la generación de nuevas células. Para investigar la posible proliferación en células 5-HT+ realizamos dos protocolos de inyección de BrdU luego de la lesión espinal: inmediatamente después de realizada la lesión y una semana post-lesión (figura 8, Estrategia experimental). En todos los casos encontramos núcleos marcados con el análogo de timidina. La diferencia entre tortugas control y lesionadas no fue significativa (control:  $7,7 \pm 0,8$ ; lesionadas:  $4,9 \pm 1,5$ ) (figura 14).



**Figura 14.** Núcleos BrdU+ alrededor del CC en 10 secciones de tortugas control y lesionadas (30 DPL).

Sin embargo, a los 30 días post-lesión no detectamos co-localización de BrdU con serotonina (0 de 443 células) (figura 15A y B). Es decir que, en el período analizado, las células 5-HT+ no se encontraban en la fase de síntesis de ADN, ni se generaron por división de progenitores pre-existentes.

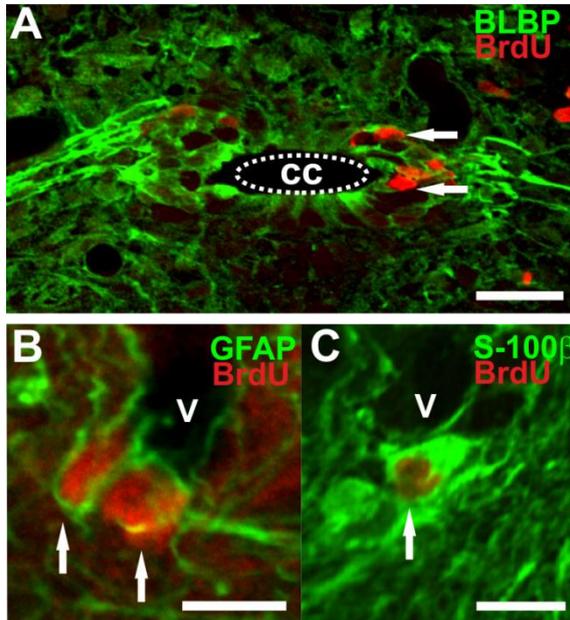
Para profundizar más sobre la capacidad proliferativa de las células serotoninérgicas usamos otro indicador de proliferación celular: PCNA, un antígeno que se expresa en las células dentro del ciclo mitótico. Se encontraron núcleos PCNA+ en el segmento lumbar pero éstos no pertenecían a células 5-HT+ (figura 15C). Por lo tanto las células serotoninérgicas son post-mitóticas ya que PCNA no se detecta en la etapa G0. Estos datos sugieren que el aumento en el número de las células 5-HT+ observado luego de la lesión espinal resulta de un cambio fenotípico de células pre-existentes, probablemente en respuesta a un cambio dependiente de la actividad o el microambiente neuroquímico.



**Figura 15.** Co-inmunomarcado para 5-HT y marcadores de ciclo celular a 30 DPL. **A y B\_** BrdU/5-HT. **A\_** Célula 5-HT+ con proceso apical (verde, cabeza de flecha) y núcleos BrdU+ (rojo, flechas). **B\_** Imagen panorámica de la región cercana al cc en la cual hay núcleos BrdU+ (rojo,

flechas) y células 5-HT+ (verde). C\_PCNA/5-HT. Imagen panorámica en la cual hay núcleos PCNA+ (rojo, flechas) y células 5-HT+ (verde, puntas de flechas). Escala: A1= 10  $\mu$ m, A2 y 3= 5  $\mu$ m, B y C= 25  $\mu$ m.

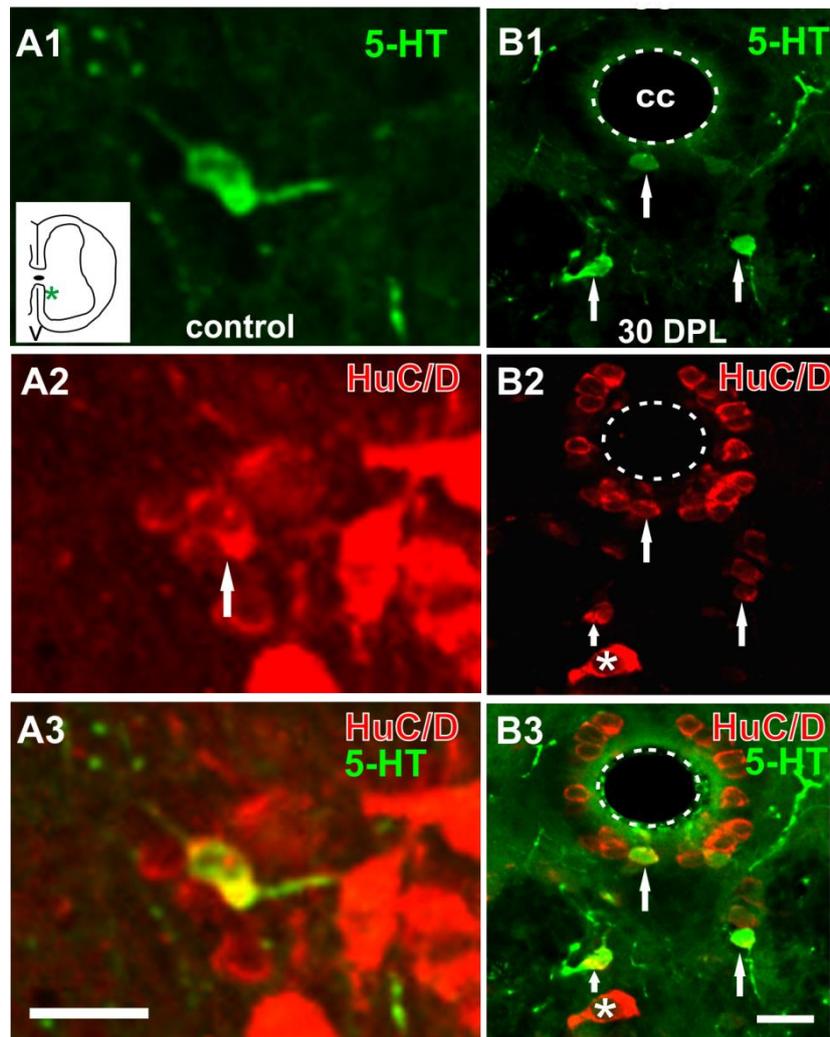
Algunos núcleos BrdU+ correspondieron a células gliales, positivas para marcadores como BLBP (figura 16A), GFAP (figura 16B) y S-100 $\beta$  (figura 16C).



**Figura 16.** Doble inmunomarcado para BrdU y marcadores gliales. Las flechas señalan células doble marcadas: A\_BrdU/BLBP. Imagen panorámica de la región cercana al cc. En los cuadrantes laterales se observan los grupos de células BLBP, algunas de ellas son BrdU+/BLBP+. B\_BrdU/GFAP. Células doble marcadas en cercana aposición a un vaso sanguíneo, probablemente astrocitos (flechas). C\_BrdU/S-100 $\beta$ . Célula doblemente marcada, cercana a un vaso. B y C: "V", vaso sanguíneo. Escala: A= 25  $\mu$ m, B y C= 10  $\mu$ m.

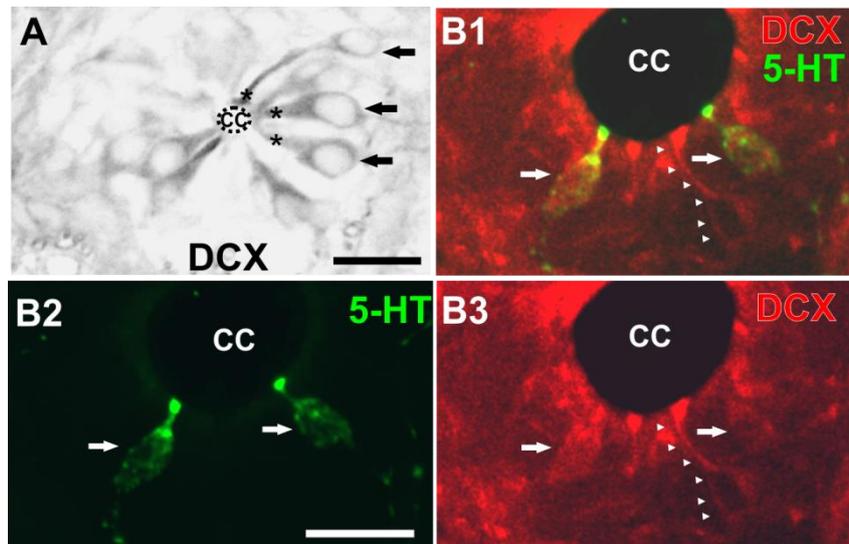
## Expresión de marcadores neuronales en las células 5-HT+ de la médula lumbar de tortugas normales y lesionadas

A continuación, nos preguntamos si las células 5-HT+ eran de naturaleza neuronal. Para responder esta pregunta utilizamos doble inmunomarcado. Encontramos que el 96% de las células 5-HT+ son inmuno-reactivas para el anticuerpo anti-HuC/D (76 de 79 células 5-HT+) (figura 17 A y B), el cual detecta proteínas que se expresan exclusivamente en neuronas (Russo et al., 2004, 2008). También se encontraron otras neuronas HuC/D+ pero 5-HT-.



**Figura 17.** Co-inmunomarcado para 5-HT y HuC/D. **A**\_Imágenes de una sección de médula lumbar de una tortuga control. **A1-3**\_ Célula 5-HT+/HuC/D+ localizada en el asta ventral (ver recuadro en A1). **B**\_Región del CC en una sección lumbar de una tortuga lesionada (30 DPL). Las flechas señalan tres células 5-HT+/HuC/D+ (B3). En la sección hay células HuC/D+ que no son serotoninérgicas (\* en B2 y B3). Escala A y B1= 20  $\mu$ m; B2 y 3= 10  $\mu$ m.

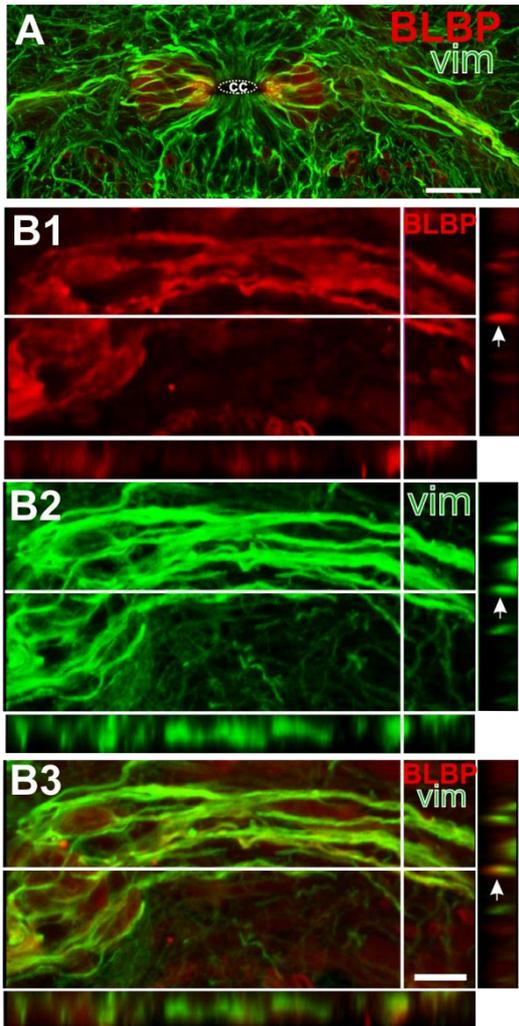
Alrededor del CC de la médula de tortuga hay células que expresan la proteína de neuronas inmaduras doblecortina (DCX) (figura 18A) (Kuhn y Peterson, 2008; Marichal et al., 2009; Toriyama et al., 2012). Dado que algunas células 5-HT+ se localizaron en la misma región, se buscó en tortugas lesionadas y control la co-expresión de esta proteína en las neuronas serotoninérgicas. Mediante co-inmunomarcado para DCX y 5-HT se observó que el 66% de las neuronas 5-HT+ son DCX+ (39 de 59 células 5-HT+) (figura 18B). En conjunto, los datos sugieren que las células serotoninérgicas del ensanchamiento lumbar serían neuronas inmaduras ya que expresan HuC/D y DCX.



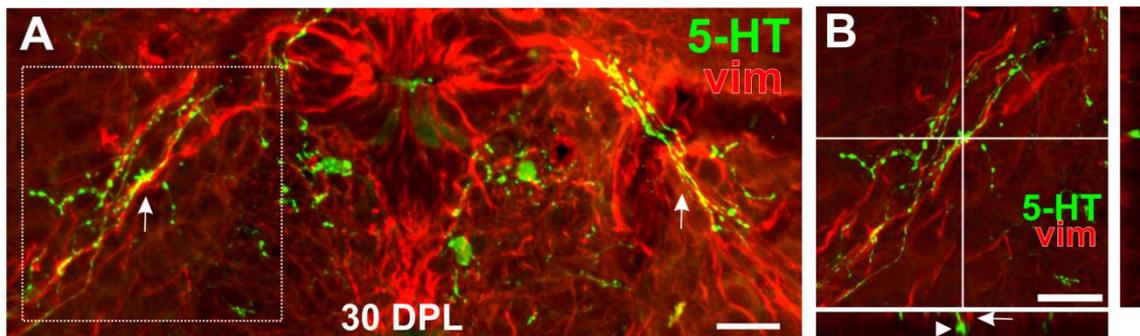
**Figura 18.** Detección de doblecortina (DCX) en la médula de la tortuga. **A\_** Células DCX+ (flechas) con un proceso apical en contacto con el cc (asteriscos). **B\_** Co-inmunomarcado de DCX con 5-HT. Las flechas señalan dos células DCX+/5-HT+ en contacto con el cc. Otras células DCX+ no son serotoninérgicas (puntas de flecha). Escala: A y B= 20  $\mu$ m.

Los procesos serotoninérgicos detectados en las tortugas lesionadas transcurren hacia el asta ventral en una disposición que recuerda a los procesos BLBP+ de glías radiales (Russo et al., 2008), por lo cual se marcaron ambos grupos celulares para determinar una posible cercanía entre sus procesos.

En primer lugar se realizó doble inmunomarcado para detectar BLBP con vimentina, otro filamento intermedio que también se expresa en glías radiales. Encontramos un solapamiento parcial de ambos marcadores en las células de los cuadrantes laterales del CC y en sus procesos (figura 19A y B). No obstante la señal de vimentina se observó alrededor de todo el CC (figura 19A). En segundo lugar se realizó doble inmunomarcado con anti-vimentina y anti-5HT se encontró que las fibras que contienen vimentina transcurren en paralelo y en cercana aposición a las fibras 5-HT+ (figura 20A), aunque no co-localizaron en la misma fibra (figura 20B). Dado que la DCX está relacionada con la migración celular durante el desarrollo, es posible que esas fibras gliales actúen como caminos o guías para la migración de las neuronas serotoninérgicas en la médula lesionada como ocurre en otros sistemas (Feng y Heintz, 1995).



**Figura 19.** Detección de glías radiales. **A\_** Co-inmunomarcado para BLBP (rojo) y vimentina (verde) en el ensanchamiento lumbar de tortugas lesionadas (30 DPL). Nótese la fuerte señal en las células de los cuadrantes laterales del cc y sus fibras laterales. **B\_** planos ortogonales en los cuales se confirma que hay co-localización de ambos marcadores en algunas fibras laterales (flechas). Escala: A=20  $\mu$ m; B= 10  $\mu$ m.

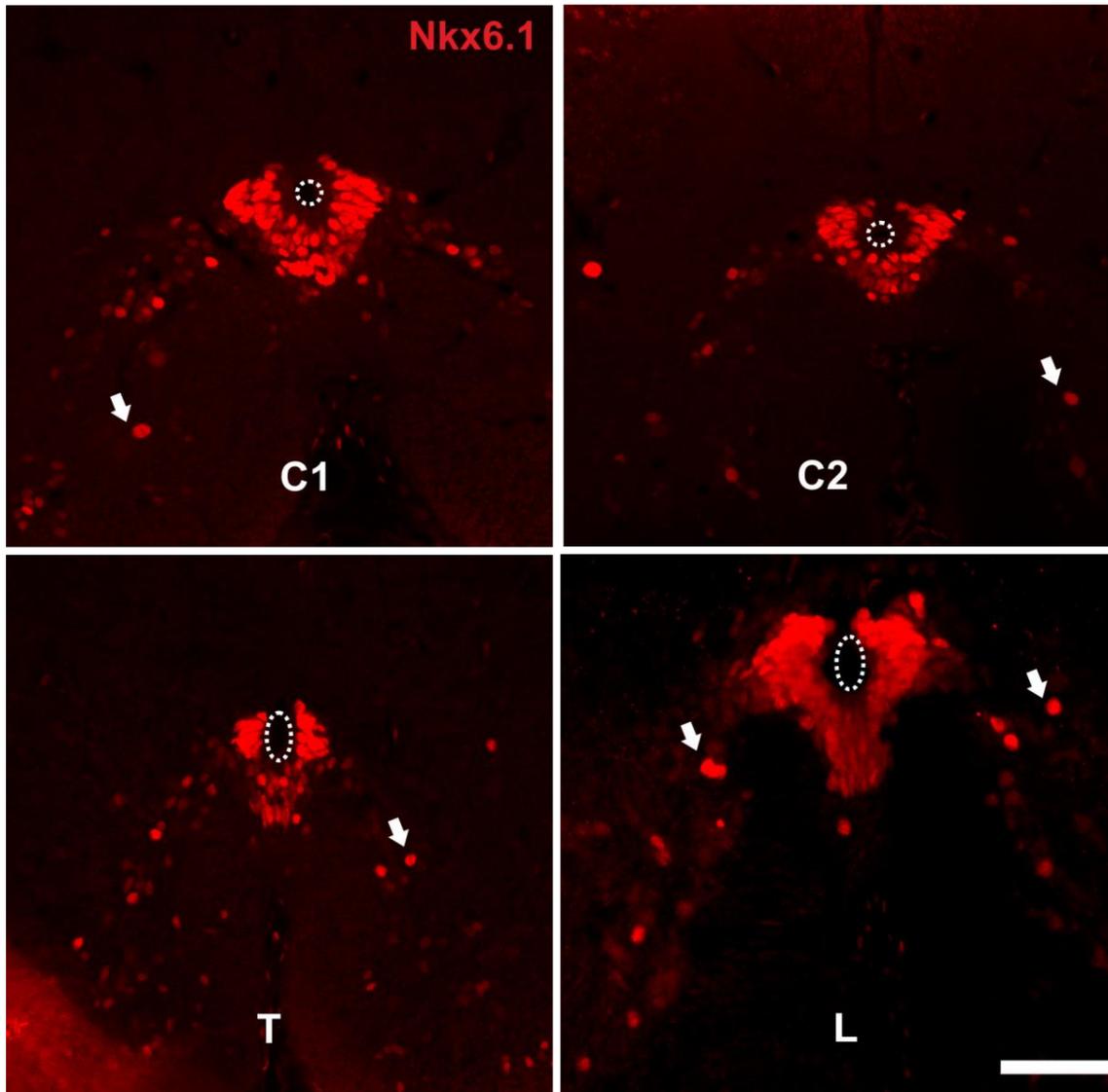


**Figura 20.** Doble inmunomarcado para vimentina (rojo) y 5-HT (verde) en una tortuga lesionada. **A\_** Nótese las fibras serotoninérgicas en aposición con las vimentina+ (flechas). **B\_** Planos ortogonales de la sección en el recuadro de A. La flecha señala una fibra vim+ y la punta de flecha señala una fibra 5-HT+. Nótese que no hay co-localización de ambas señales. Escala 20  $\mu$ m.

## **Análisis del linaje de las células 5-HT+ de la médula lumbar de tortugas normales y lesionadas**

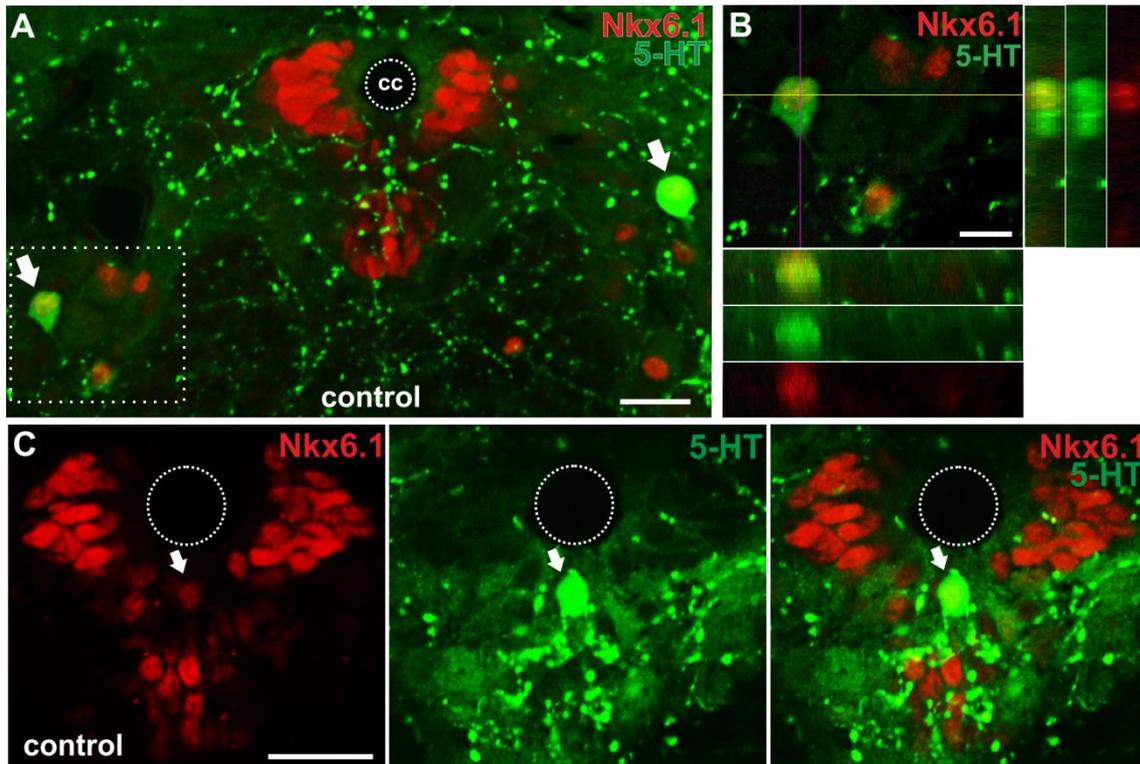
La médula de la tortuga mantiene una zona proliferativa alrededor del CC con células en diferentes grados de diferenciación. La expresión de genes pro-neurales puede brindar información sobre el linaje y las vías de señalización activas en dichas células. En particular, los factores de transcripción NKx6.1 y Nkx2.2 están relacionados con la diferenciación de neuronas serotoninérgicas, por lo cual se analizó su expresión en la médula espinal.

Se encontraron núcleos Nkx6.1+ localizados principalmente alrededor del cc en los cuadrantes laterales y ventral (figura 21), en la sustancia gris ventro-medial y en las astas ventrales (figura 21, flechas), a lo largo de todo el eje rostro-caudal. En los dominios laterales la localización de los núcleos Nkx6.1+ parecería coincidir con los progenitores BLBP+/PAX6+ previamente descritos (Russo et al., 2008).

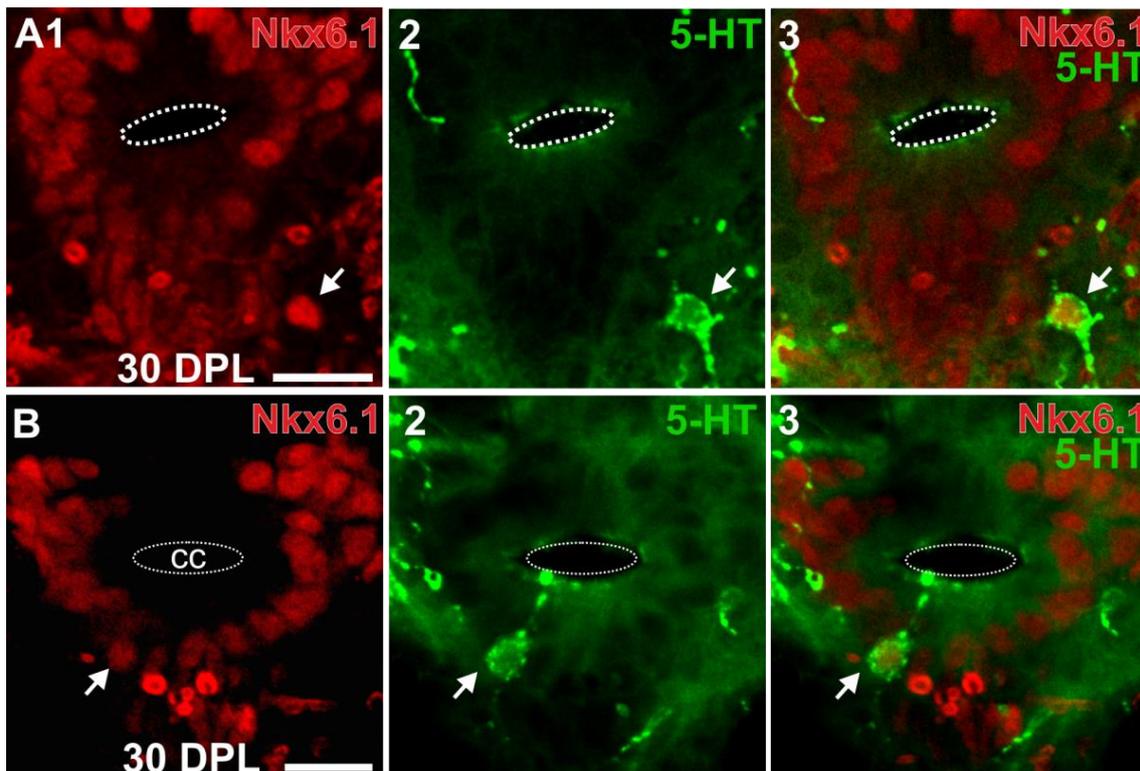


**Figura 21.** Expresión del factor de transcripción Nkx6.1 en la médula espinal de la tortuga. Se encontraron núcleos positivos (rojo) alrededor del CC (línea punteada) y en la sustancia gris ventral (flechas). C1: médula cervical alta, C2: ensanchamiento cervical, T: torácica, L: lumbar. Escala 50  $\mu$ m.

Dado que se detectaron células serotoninérgicas localizadas en la zona de expresión de Nkx6.1 se realizó inmunomarcado doble con anti-5-HT. Encontramos que las células 5-HT+ expresan Nkx6.1, tanto en el grupo control (20 de 21 células 5-HT+, 95%) (figura 22) como en el grupo lesionado (120 de 125 células 5-HT+, 84%) (figura 23). Estos datos muestran que el sistema nervioso central de tortugas juveniles contiene un pool de neuronas que expresan FTs embrionarios y que frente a una lesión severa de la médula espinal aumentan significativamente la producción de serotonina a través de una vía de señalización probablemente dependiente de Nkx6.1.



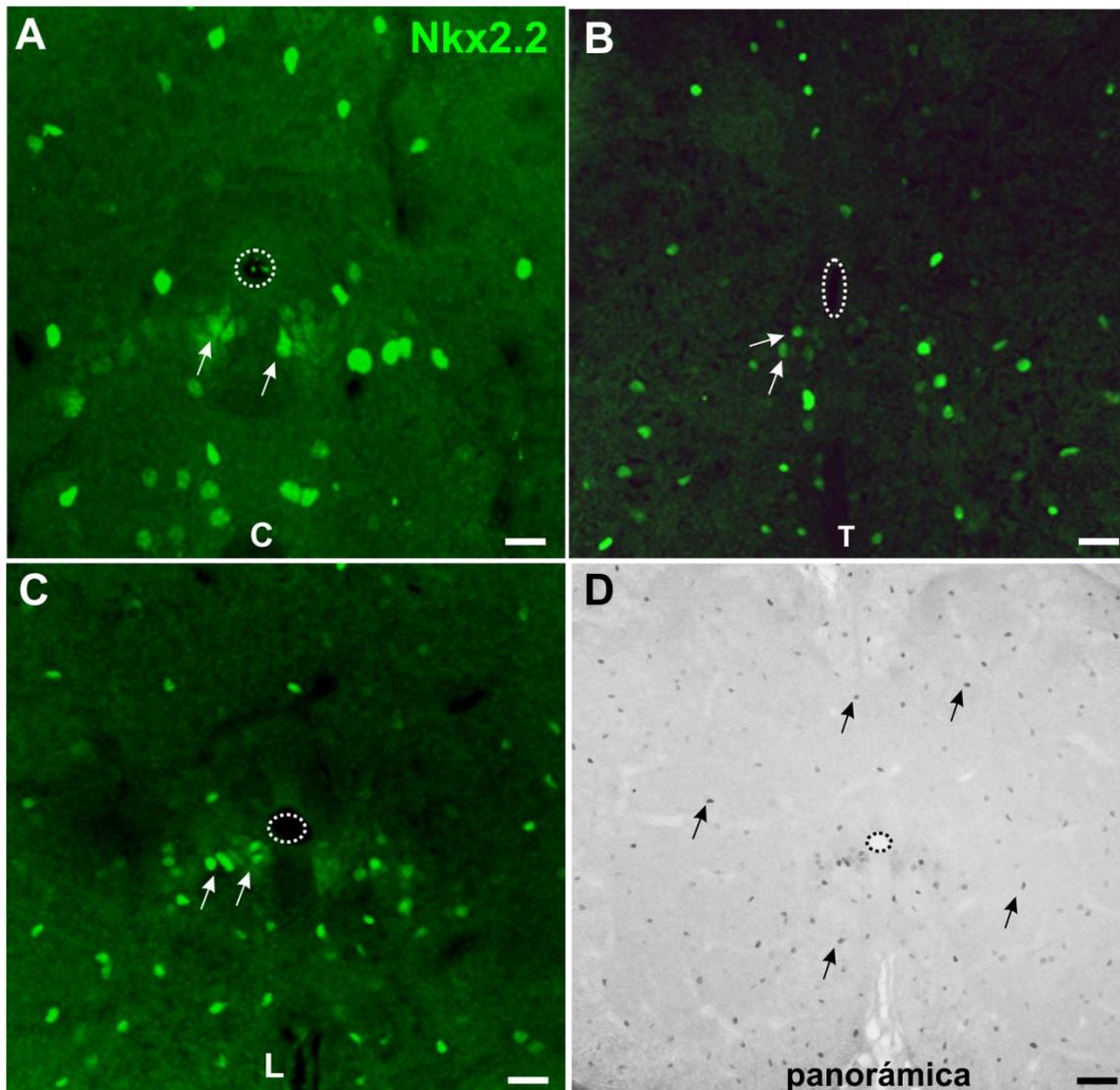
**Figura 22.** Co-expresión del factor de transcripción Nkx6.1 (rojo) y serotonina (verde) en el ensanchamiento lumbar de una tortuga control. **A\_** Células doble-marcadas en el asta ventral (flechas). **B\_** Planos ortogonales de la célula en el recuadro de A. Nótese la expresión de Nkx6.1 en el núcleo (rojo). **C\_** Célula doble-marcada ventral al cc (flecha). Escala: A=20  $\mu$ m, B= 10  $\mu$ m, C= 20 $\mu$ m.



**Figura 23.** Co-expresión del factor de transcripción Nkx6.1 (rojo) y serotonina (verde) en el ensanchamiento lumbar de tortugas lesionadas. **A\_** Célula doble-marcada en la región ventral

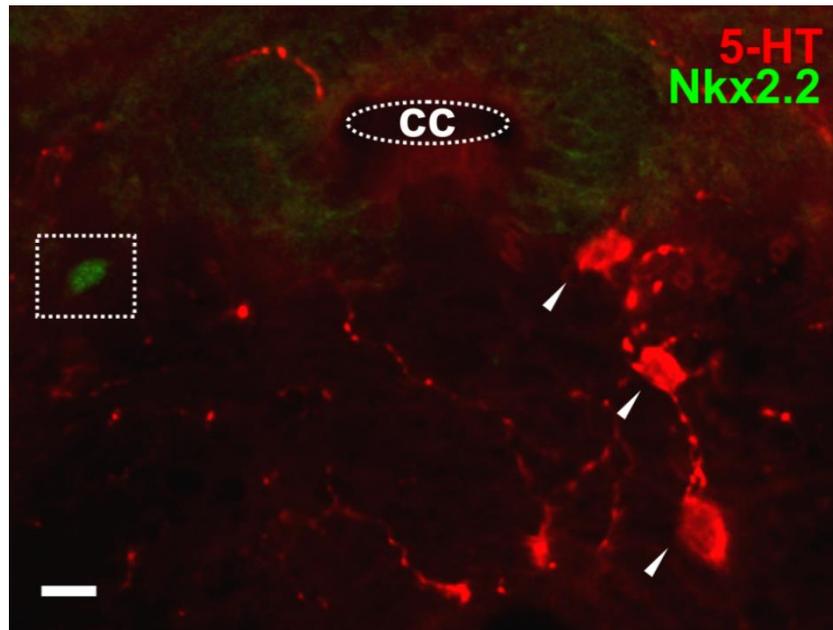
al CC (flechas) en la que no se detectó un proceso en contacto con la luz del CC. **B\_** Célula doble-marcada con proceso apical en contacto con el CC (flecha). Escala: A y B=20  $\mu$ m.

El factor de transcripción Nkx2.2 es otra proteína pro-neural importante para el desarrollo del sistema nervioso; entre otras funciones, activa la vía de diferenciación de las neuronas serotoninérgicas. En la médula espinal de la tortuga se expresa en células de la sustancia gris y la sustancia blanca, en todos los niveles (figura 24). Estos núcleos Nkx2.2+ probablemente correspondan a progenitores de oligodendrocitos, como se ha descrito en otros vertebrados (Fu et al., 2002). Sin embargo, las células 5-HT+ de tortugas control y lesionadas no expresan Nkx2.2 (0 de 67 células 5-HT+) (figura 25).



**Figura 24.** Expresión del factor de transcripción Nkx2.2 en los niveles cervical (C), torácico (T) y lumbar (L) de la médula espinal de la tortuga. **A-C\_** Algunos núcleos Nkx2.2+ se concentran en la zona ventral del CC, a ambos lados de la línea media (flechas blancas). **D\_** Imagen

panorámica de la sección lumbar (L). Las flechas señalan algunos núcleos positivos localizados en la sustancia gris y en la sustancia blanca (flechas negras). Escala: A-C= 20  $\mu$ m; D= 40  $\mu$ m.



**Figura 25.** Expresión del factor de transcripción Nkx2.2 en el ensanchamiento lumbar de una tortuga lesionada. Recuadro: núcleo Nkx2.2+ (verde). Las puntas de flecha señalan 3 neuronas 5-HT+ (rojo). Escala: 10  $\mu$ m.

Finalmente analizamos la co-expresión con LMX, otro FT que se activa en la cascada de señalización de la vía de diferenciación de las neuronas serotoninérgicas. Tampoco detectamos co-marcado con las neuronas serotoninérgicas de la médula de tortuga (datos no ilustrados). En caso de confirmarse esta diferencia con los resultados obtenidos en *Xenopus* por el grupo de Spitzer, el cambio fenotípico de las neuronas serotoninérgicas en la lesión espinal sería un mecanismo de plasticidad novedoso, distinto al descrito anteriormente en otras especies.

Estos resultados muestran la expresión de genes pro-neurales en células del CC de la médula espinal de tortugas juveniles. Este trabajo aporta más evidencia del potencial neurogénico de esa región.

## Discusión

Este trabajo describe, en la médula espinal de la tortuga, un fenómeno de plasticidad desencadenado por una lesión que implica la aparición de células con un nuevo fenotipo neuroquímico. Este fenómeno se observó a partir de los 10 días post-lesión. Nuestros resultados demostraron que treinta días después de realizar la sección completa de la médula espinal a nivel torácico bajo, la cantidad de células serotoninérgicas en los segmentos caudales a la misma aumenta de forma significativa. Este aumento no se debe a proliferación celular, ya que las neuronas 5-HT+ no incorporaron BrdU. Estas células son post-mitóticas, ya que no expresan el antígeno nuclear PCNA y se localizaron en la sustancia gris ventro-medial y el asta ventral de los segmentos espinales correspondientes al ensanchamiento lumbar, caudales a la lesión espinal. Confirmamos que las células 5-HT+ de la médula lumbar son neuronas ya que expresan los marcadores neuronales HuC/D y DCX. Por otra parte, todas las neuronas 5-HT+ de tortugas lesionadas y controles expresan el factor de transcripción Nkx6.1, que integra la vía de diferenciación de neuronas serotoninérgicas, mientras que no expresan el factor de transcripción Nkx2.2. La señal desencadenante sería un cambio en la señalización serotoninérgica provocado por la lesión. Proponemos que el mecanismo implicaría la activación de la vía de síntesis de serotonina en estas células al desaparecer la inervación serotoninérgica descendente desde niveles supraespinales.

Como se ha descrito en otros modelos, la aparición de nuevas neuronas 5-HT sería un cambio homeostático para compensar una deficiencia del sistema (Demarque y Spitzer, 2010): la eliminación de las aferencias serotoninérgicas por la sección completa disminuye la serotonina disponible normalmente en los segmentos caudales a la lesión, lo que genera la respuesta de algunas células locales que producen serotonina hasta alcanzar niveles detectables. Es decir que la médula espinal contiene células con la potencialidad de responder a un cambio en el ambiente (por ejemplo, la actividad eléctrica y/o neuroquímica), lo que representa un mecanismo adaptativo que podría contribuir a la recuperación funcional en estos animales.

## Mecanismos subyacentes a la aparición de nuevas neuronas serotoninérgicas

En esta sección se discutirán los posibles mecanismos subyacentes al aumento de las neuronas serotoninérgicas para el modelo de lesión espinal.

### *Señalización intracelular en respuesta a cambios en la actividad del circuito*

En la médula espinal de las tortugas control y lesionadas encontramos núcleos celulares con el factor de transcripción Nkx2.2, tanto en la sustancia blanca como en la gris. Sin embargo, fue llamativo que las neuronas serotoninérgicas espinales no lo expresaran ya que se ha descrito que es un factor necesario para su diferenciación en el tronco encefálico (Briscoe et al., 1999). La ausencia de Nkx2.2 podría deberse a que las neuronas 5-HT+ espinales se encuentran en un grado de maduración tal que ya no lo expresan, como ocurre en el tronco encefálico del ratón, en el cual se expresa en las neuronas serotoninérgicas transitoriamente durante el desarrollo y luego se apaga (Cheng et al., 2003). Alternativamente, la vía de señalización para generar nuevas neuronas 5-HT en respuesta a la lesión podría ser distinta a la vía canónica que se ha descrito durante el desarrollo.

Por otra parte, en las neuronas serotoninérgicas espinales encontramos el FT Nkx6.1. Este FT también ha sido descrito como activador de la vía de síntesis de serotonina (Briscoe et al., 1999) y como inductor de la diferenciación de un grupo de neuronas serotoninérgicas localizadas en regiones anteriores del tronco encefálico (Jensen et al., 2008; Kiyasova y Gaspar, 2011; Smidt y van Hooft, 2013). Por lo tanto, el FT Nkx6.1 podría ser el factor modulador de la vía de síntesis de serotonina en las neuronas espinales y es probable que sea un factor clave en la capacidad plástica de las mismas.

No obstante, no encontramos diferencias en la expresión del FT Nkx6.1 entre el grupo control y el grupo lesionado. Es posible que la disminución de la actividad desencadenara el cambio fenotípico de las neuronas serotoninérgicas regulando la vía de síntesis sin afectar la expresión del FT Nkx6.1. Esto podría ocurrir de forma similar a

lo que ocurre en el embrión de *Xenopus*, en el cual la actividad no afecta la expresión de Nkx2.2 (Demarque y Spitzer, 2010). En dicho caso la disminución de la actividad en las neuronas del rafe provoca un aumento en la cantidad de neuronas que expresan la enzima TPH y de la serotonina detectada en las mismas. Dicho aumento se debe a que la despolarización aumenta el  $Ca^{2+}$  intracelular el cual regula la expresión génica en estas células, en particular al FT *Imx1b*. Por lo tanto, dichas neuronas son capaces de detectar una disminución de la actividad eléctrica del circuito y traducirla en una señal intracelular que activa la expresión de genes de la vía de síntesis de serotonina. De forma análoga, en el modelo de lesión espinal, la disminución de la actividad eléctrica sería detectada por células de los segmentos caudales a la lesión, las cuales responden aumentando la serotonina intracelular, ya sea por síntesis, activación o aumento de la actividad de la enzima TPH. Si asumimos que la serotonina es un neurotransmisor excitatorio, estos cambios son consistentes con la hipótesis del cambio homeostático, según la cual al disminuir la actividad del sistema éste responde aumentando los neurotransmisores excitatorios (Spitzer, 2012).

Un análisis exhaustivo de los factores de transcripción expresados en estas neuronas nos permitiría conocer más detalles sobre la vía de señalización que activa las neuronas serotoninérgicas y a qué nivel celular ocurre modulación. Hay que tener en cuenta que la obtención de resultados dudosos o negativos no excluye la existencia de alguno de los mecanismos que se proponen ya que algunos de los anticuerpos que usamos han sido desarrollados para antígenos de otras especies y en nuestro modelo experimental muchas veces no está comprobada la eficacia de los mismos. Por lo tanto, al ensayarlos en tortuga es común encontrar inconvenientes técnicos, lo cual dificulta la interpretación de los datos.

En suma, dado que las neuronas 5-HT+ de la médula espinal expresan el FT *Nkx6.1*, tanto en tortugas normales como en lesionadas, es probable que este factor sea el responsable de mantener dichas células en un estado plástico, con capacidad de transformar su fenotipo neuroquímico cuando son activadas por una señal externa. Estas células conformarían un grupo de células de reserva (Dulcis y Spitzer, 2012).

### *Interacciones célula-célula*

Los núcleos Nkx6.1+ se encontraron tanto alrededor del CC como en la sustancia gris ventral, en la misma región en que se encuentran las glías radiales BLBP+ y sus procesos. De forma similar, los nuevos procesos 5-HT+ transcurren en paralelo a dichas glías radiales. Esta disposición sugiere una relación causal que permitiría la comunicación entre ellos. Una interacción similar ha sido demostrada previamente en el sistema nervioso de ratón: neuronas inmaduras son capaces de inducir la expresión de BLBP en glías radiales cercanas cuyos procesos sirven como guías para orientar la migración de aquellas (Feng y Heintz, 1995). Cabe agregar que, datos obtenidos mediante registros electrofisiológicos en rodajas de médula espinal de tortuga demostraron que las glías radiales (BLBP+ y/o vimentina+) son capaces de generar una corriente en respuesta a la aplicación local de serotonina (Cecilia Reali, comunicación personal). Por lo tanto, es probable las glías radiales BLBP+ detecten la disminución de la señal serotoninérgica luego de la lesión. Dado que en la médula lesionada los procesos 5-HT+ transcurren en cercana aposición a los procesos de las glías radiales, éstas podrían enviar a las células Nkx6.1+ una señal para activar el cambio fenotípico. Sería interesante confirmar si las glías radiales poseen receptores serotoninérgicos y qué subtipos, para luego usar herramientas farmacológicas o moleculares y determinar si efectivamente hay una interacción entre ambos tipos celulares que pueda desencadenar la síntesis de serotonina en las neuronas Nkx6.1+.

### *Activación de las enzimas de síntesis de serotonina*

Otro mecanismo propuesto para la conversión a un fenotipo serotoninérgico es la activación por sustrato de la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) en células espinales luego de la lesión (Wienecke et al., 2014). Esta enzima cataliza la síntesis de serotonina a partir del precursor 5-HTP y se encontró en neuronas de la médula sacra de la rata. Sin embargo, en condiciones fisiológicas no se detectó serotonina ni otras catecolaminas en las mismas, sugiriendo que no se encontraba activa. En dicho trabajo se produjo una sección total de la médula a nivel sacro que interrumpía la inervación serotoninérgica extrínseca a la misma, de forma similar a nuestro modelo de lesión. Posteriormente, mediante la aplicación sistémica del

precursor 5-HTP se logró aumentar el número de neuronas que contenían 5-HT, la cual fue producida por la activación por sustrato de la enzima AADC presente en las mismas. En el mecanismo propuesto, la sección de la médula provocaría una disminución de la serotonina disponible y la desinhibición de la enzima AADC+; la serotonina actuaría a través de receptores 5-HT1B localizados en dichas neuronas. Cabe resaltar que en dicho trabajo se administró el sustrato de la enzima de forma exógena para poder detectar la serotonina. Si bien no descartamos que el precursor pudiera ser liberado al espacio extracelular a partir de fibras degeneradas luego de la lesión, es poco probable que aún se encuentre disponible 30 días después de la misma para ser el responsable del aumento de serotonina en nuestro modelo.

### *Señalización sináptica*

A nivel sináptico estarían involucrados receptores de serotonina de la membrana post-sináptica. Hemos realizado experimentos preliminares en tortugas lesionadas que consistieron en el tratamiento durante 10 días con 8-OH-DPAT, un agonista de los receptores 5-HT1A. Los resultados obtenidos sugieren que disminuye la cantidad de neuronas 5-HT+ en el ensanchamiento lumbar de las tortugas lesionadas tratadas con 8-OH-DPAT respecto a tortugas lesionadas no tratadas. De confirmarse estos resultados indicarían que la inervación serotoninérgica descendente inhibe las células lumbares a través de receptores 5-HT1A.

Otros trabajos apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, el grupo de Gaspar demostró que el mismo agonista bloquea la diferenciación de neuronas en el hipocampo (Diaz et al., 2013). Esta evidencia apoya los resultados obtenidos en la tortuga y sugiere que el receptor 5-HT1A podría estar involucrado en el control de la diferenciación o maduración neuronal en regiones muy distintas del sistema nervioso. Otro ejemplo fue realizado en cultivos organotípicos del sistema nervioso de ratón, en el cual mecanismo subyacente depende también de receptores 5-HT1A (Branchereau et al., 2002). En dicho trabajo se realizaron cultivos de sistema nervioso que incluían el bulbo raquídeo y médula espinal los cuales carecían de neuronas serotoninérgicas a nivel de la médula; mientras que cuando se cultivó la médula espinal aislada, sin bulbo

raquídeo, se detectó una mayor cantidad de neuronas serotoninérgicas en la misma. Este aumento no se observa al incubarla con serotonina, mientras que aparecía al tratar el cultivo completo con el antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> spiroxatrine. Cabe agregar que la médula espinal se desarrolló normalmente cuando se cultivó sin bulbo, es decir que la serotonina sintetizada localmente fue suficiente para compensar la ausencia de inervación desde el bulbo.

Estos datos apoyan nuestra hipótesis del cambio homeostático en el cual la serotonina aportada por las vías descendentes inhibiría las neuronas locales. Luego de la lesión, el sistema local buscaría compensar la función de las vías descendentes aumentando la disponibilidad de serotonina.

#### *Neuromodulación extrínseca e intrínseca*

Datos preliminares obtenidos en tortugas de 4 meses y 4 años post-lesión revelaron escasas células serotoninérgicas en el ensanchamiento lumbar, presencia de fibras varicosas y presencia de botones 5-HT<sup>+</sup> sobre las motoneuronas, de forma análoga a lo observado en el grupo control. Probablemente las fibras 5-HT<sup>+</sup> correspondan a procesos descendentes que lograron cruzar el sitio de la lesión o puente, llegaron nuevamente a sus blancos en la médula lumbar y provocaron el “apagado” de las neuronas serotoninérgicas locales.

Estos resultados demuestran que el aumento de las neuronas serotoninérgicas observado es un cambio homeostático mediante el cual el sistema, que perdió la neuromodulación serotoninérgica extrínseca por la lesión, potencia la modulación intrínseca en un intento de recuperar la homeostasis (ver figura 1) (Marder, 2012). Posteriormente cuando se recupera la inervación serotoninérgica extrínseca el fenómeno revierte, lo que evidencia la capacidad plástica de este sistema.

Las sustancias neuromoduladoras afectan neuronas únicas o circuitos modificando la respuesta de los mismos según las distintas situaciones fisiológicas. La neuromodulación extrínseca puede afectar al mismo tiempo circuitos muy diferentes y

de esa forma adecuar la respuesta o estado de los mismos a una conducta específica en un momento dado, como ocurre durante el sueño. El sistema serotoninérgico inerva todo el sistema nervioso, siendo modulador de la mayoría de los circuitos locales del cerebro y la médula espinal. Por lo tanto, no es extraño que la lesión produzca una reacción a nivel de los circuitos locales que fueron afectados por la pérdida de la neuromodulación extrínseca serotoninérgica (y también otras, como la noradrenérgica). Dicha reacción incluye la activación de células locales que modifican sus características neuroquímicas y probablemente también sus propiedades eléctricas. Estos elementos re-configurados del circuito probablemente también pasen a cumplir funciones diferentes en el mismo, como neuromoduladores intrínsecos (Katz y Frost, 1996).

En el grupo de tortugas lesionadas no se encontraron estructuras similares a botones sinápticos 5-HT+ sobre las motoneuronas. No obstante, la serotonina podría ser liberada desde los procesos cercanos que atraviesan las astas ventrales y difundir en el espacio extracelular hasta alcanzar las motoneuronas. La disponibilidad de serotonina extracelular podría medirse por voltametría y predecir si sería suficiente para producir un efecto en las motoneuronas (Cotel et al., 2013).

Por otra parte, registros electrofisiológicos de motoneuronas de la médula lumbar realizados en nuestro laboratorio (datos no ilustrados) mostraron que la aplicación de serotonina en la región del cuerpo celular tiene efectos opuestos antes y después de la lesión. En tortugas lesionadas (30 DPL) se observó un efecto excitatorio, mientras que en los controles fue inhibitorio (coincidiendo con publicaciones previas, ver Perrier y Cotel, 2008). Por lo tanto, si la serotonina produce un aumento de la excitabilidad de las motoneuronas (Perrier et al., 2003; Perrier y Hounsgaard, 2003) podemos esperar que en las tortugas lesionadas, actúe como una señal excitatoria que contribuya a la recuperación de la locomoción. Resultados preliminares sugieren que el transportador SERT no estaría presente en dichos procesos 5-HT+, lo que habilitaría una mayor duración de la señal en el entorno de las motoneuronas. Si además, éstas reaccionan a la lesión con cambios en la expresión de receptores serotoninérgicos, podría aumentar considerablemente la capacidad de respuesta a la señal neuromoduladora ejercida

ahora en forma intrínseca por las nuevas neuronas serotoninérgicas. Todos estos cambios redundarían en la recuperación temprana de la movilidad de los miembros posteriores.

Finalmente, los estudios del ganglio estomatogástrico del cangrejo ilustran el nivel de complejidad que puede alcanzar la modulación de los sistemas: se han descrito y caracterizado 25 sustancias neuromoduladoras (Marder, 2012). Aunque en vertebrados no se ha logrado un análisis tan exhaustivo sobre la neuromodulación de los circuitos, lo más probable es que la complejidad sea similar. Por lo tanto, si bien nuestros resultados son muy interesantes pues provocan un cambio en la visión de la estructura de los circuitos introduciendo la capacidad plástica adaptativa de sus componentes, seguramente hemos visto solo la punta del iceberg. Para continuar avanzando en la comprensión de la neuromodulación de los circuitos motores y lograr determinar mecanismos que logren una mejora funcional aún queda mucho por hacer, como por ejemplo, caracterizar la respuesta de las motoneuronas espinales y otros componentes celulares del circuito local bajo la influencia de los diversos neuromoduladores, a distintos tiempos luego de la lesión espinal. Seguramente varios neuromoduladores son capaces de activar el mismo circuito y generar una respuesta útil para lograr el objetivo: activar el GCP. Esto hace que parezca suficiente activar uno sólo de ellos o que son sustituibles uno por el otro, pero en realidad solamente combinados son capaces de modular el sistema y lograr la estabilidad del circuito. Dicha complejidad es la que dificulta la creación de modelos computacionales válidos.

## **Conclusiones y Perspectivas**

En la bibliografía se ha discutido la presencia de células capaces de captar serotonina extracelular sin ser capaces de producirla, por lo cual algunos autores prefieren usar la enzima TPH como marcador de fenotipo serotoninérgico en lugar de detectar serotonina. Sería interesante probar anticuerpos anti TPH para comprobar que en las neuronas serotoninérgicas se activó la maquinaria de síntesis de serotonina y descartar que se trate de captación desde el medio extracelular. Otra posibilidad es usar un anticuerpo contra el transportador SERT para marcar en la médula todas las células capaces de internalizar serotonina. Resultados preliminares de nuestro laboratorio

indican que el SERT se localiza únicamente en fibras varicosas 5-HT+ de la médula control .

Las neuronas serotoninérgicas encontradas en la médula lesionada son pequeñas y poco abundantes pero están localizadas en una zona restringida de la médula lumbar: el cuadrante ventral del CC, la comisura gris ventral y las astas ventrales. Si bien parece difícil, sería muy interesante registrarlas para caracterizar su actividad eléctrica: si presentan propiedades activas, determinar si tienen actividad espontánea y cuáles son los canales involucrados, a distintos tiempos post-lesión. Por otra parte, las neuronas HuC/D+ que contactan el canal central tienen características electrofisiológicas de neuronas inmaduras (Russo et al., 2004, 2008). Sería interesante poder registrar las neuronas 5-HT+/HuC/D+ y comparar sus propiedades eléctricas con las neuronas inmaduras descriptas previamente.

Cabe agregar que sería interesante ampliar el estudio a otros modelos. Por ejemplo, el grupo de Gaspar usó dos cepas de ratones con depleción constitutiva de serotonina aunque no muestra el patrón de expresión de serotonina en la médula espinal de dichos animales. Sería muy interesante estudiar la médula espinal de estos ratones luego de una lesión. En una de las cepas se bloquea uno de los FT que controlan la diferenciación de neuronas serotoninérgicas, por lo cual esperaríamos no encontrar neuronas serotoninérgicas en la médula espinal luego de la lesión. En la otra cepa se encuentra bloqueada la captación vesicular de serotonina; por lo tanto la médula espinal normal de esos ratones debería comportarse como en la tortuga lesionada con carencia de innervación serotoninérgica. En este caso esperaríamos encontrar neuronas serotoninérgicas a nivel espinal y también en otras regiones del sistema nervioso si el mecanismo plástico estuviera presente en estos mamíferos.

En conjunto los resultados sugieren que la re-especificación de neurotransmisores en la médula espinal puede ser un mecanismo por el cual el sistema nervioso cambia su configuración funcional en respuesta a factores internos o externos, tanto para regular la diferenciación neuronal adecuada como para mantener la homeostasis. Para disecar los mecanismos intracelulares de señalización, se pueden mejorar las herramientas

farmacológicas ya usadas y desarrollar otras estrategias que permitan estimular o bloquear el mecanismo plástico en condiciones normales y luego de una lesión. Este fenómeno de plasticidad homeostática sería por definición, reversible. A futuro intentaremos confirmar los resultados preliminares analizando a distintos tiempos de sobrevivencia, las médulas de ejemplares lesionados. También sería interesante analizar qué sucede si se bloquea mecánicamente la formación del puente, de forma de impedir que las fibras descendentes lleguen nuevamente a la médula lumbar a silenciar las neuronas serotoninérgicas.

En el caso de la serotonina, por tratarse de una sustancia neuromoduladora, los cambios en la señalización a través de este neurotransmisor pueden afectar las propiedades intrínsecas de las neuronas, modificar su excitabilidad y su capacidad de descargar potenciales de acción. Por lo tanto, es importante analizar los cambios inducidos por la lesión espinal en la respuesta eléctrica de las motoneuronas a la serotonina, así como la expresión de receptores específicos, ya que pueden redundar en la activación de los músculos responsables de la locomoción. Además, por tratarse de una molécula soluble, capaz de difundir por el espacio extracelular puede afectar al mismo tiempo a todas las neuronas cercanas al sitio de liberación, generando una respuesta simultánea y coordinada. De esta forma se puede lograr re-configurar los circuitos espinales involucrados en la generación de actividad motora.

## Bibliografía

- Altman J (1962) Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals ? Science 135:1127-1128.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. Journal of Comparative neurology 124:319-336.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A (2004) Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. Neuropsychopharmacology 29:450-460.
- Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, Takebayashi H, Pfrieder FW, Meletis K, Frisén J (2010) Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. Cell Stem Cell 7:470-482.
- Borodinsky LN, Belgacem YH, Swapna I (2012) Electrical activity as a developmental regulator in the formation of spinal cord circuits. Current Opinion in Neurobiology 22:624-630.
- Branchereau P, Chapron J, Meyrand P (2002) Descending 5-hydroxytryptamine raphe inputs repress the expression of serotonergic neurons and slow the maturation of inhibitory systems in mouse embryonic spinal cord. The Journal of neuroscience : 22:2598-2606.
- Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL, Ericson J (1999) Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. Nature 398:622-627.
- Brustein E, Rossignol S (1999) Recovery of Locomotion After Ventral and Ventrolateral Spinal Lesions in the Cat . II. Effects of Noradrenergic and Serotonergic Drugs. Journal of Neurophysiology 81:1513-1530.
- Bunin M a, Wightman RM (1998) Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. The Journal of neuroscience 18:4854-4860.
- Chanrion B, Mannoury C, Gavarini S, Seimandi M, Vincent L, Marin P, Millan MJ (2008) Inverse Agonist and Neutral Antagonist Actions of Antidepressants at Recombinant and Native 5- Hydroxytryptamine 2C Receptors: Differential Modulation of Cell Surface Expression and Signal Transduction. MOLECULAR PHARMACOLOGY 73:748-757.

- Cheng L, Chen C, Luo P, Tan M, Qiu M, Johnson R, Ma Q (2003) Lmx1b, Pet-1, and Nkx2.2 Coordinately Specify Serotonergic Neurotransmitter Phenotype. *The Journal of Neuroscience* 23:9961-9967.
- Chevallier S, Landry M, Nagy F, Cabelguyen J (2004) Recovery of bimodal locomotion in the spinal-transected salamander, *Pleurodeles waltlii*. *Eur J Neurosci* 20:1995-2007.
- Cotel F, Exley R, Cragg SJ, Perrier J-F (2013) Serotonin spillover onto the axon initial segment of motoneurons induces central fatigue by inhibiting action potential initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:4774-4779.
- Demarque M, Spitzer NC (2010) Activity-Dependent Expression of Lmx1b Regulates Specification of Serotonergic Neurons Modulating Swimming Behavior. *Neuron* 67:321-334.
- Diaz SL, Narboux-Nême N, Trowbridge S, Scotto-Lomassese S, Kleine Borgmann FB, Jessberger S, Giros B, Maroteaux L, Deneris E, Gaspar P (2013) Paradoxical increase in survival of newborn neurons in the dentate gyrus of mice with constitutive depletion of serotonin. *The European journal of neuroscience* 38:2650-2658.
- Dulcis D, Spitzer NC (2008) Illumination controls differentiation of dopamine neurons regulating behaviour. *Nature* 456:195-201.
- Dulcis D, Spitzer NC (2012) Reserve pool neuron transmitter respecification: novel neuroplasticity. *Dev Neurobiol* 72:465-474.
- Dunbar MJ, Tran M a, Whelan PJ (2010) Endogenous extracellular serotonin modulates the spinal locomotor network of the neonatal mouse. *The Journal of physiology* 588:139-156 A.
- Egar M, Simpson SB, Singer M (1970) The growth and differentiation of the regenerating spinal cord of the lizard, *Anolis carolinensis*. *Journal of morphology* 131:131-151.
- Erspamer V, Asero B (1953) ISOLATION OF ENTERAMINE FROM EXTRACTS OF POSTERIOR SALIVARY GLANDS OF OCTOPUS VULGARIS AND OF DISCOGLOSSUS PICTUS SKIN. *Journal of biological chemistry* 200:311-318.
- Feng L, Heintz N (1995) Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development (Cambridge, England)* 121:1719-1730.
- Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O (2002) Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. *The Journal of comparative neurology* 453:131-144.

- Fouad K, Rank MM, Vavrek R, Murray KC, Sanelli L, Bennett DJ (2010) Locomotion after spinal cord injury depends on constitutive activity in serotonin receptors. *Journal of neurophysiology* 104:2975-2984.
- Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Takebayashi H, Nakafuku M, Richardson W, Qiu M (2002) Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development (Cambridge, England)* 129:681-693.
- Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A (2012) Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell* 10:698-708.
- Ghosh M, Pearse DD (2015) The role of the serotonergic system in locomotor recovery after spinal cord injury. *Frontiers in Neural Circuits* 8:1-14.
- Gordon IT, Whelan PJ (2008) Brainstem modulation of locomotion in the neonatal mouse spinal cord. *The Journal of physiology* 586:2487-2497.
- Guemez-Gamboa A, Xu L, Meng D, Spitzer NC (2014) Non-cell-autonomous mechanism of activity-dependent neurotransmitter switching. *Neuron* 82:1004-1016.
- Hagen EM (2015) Acute complications of spinal cord injuries. *World J Orthop* 18:17-23.
- Jensen P, Farago AF, Awatramani RB, Scott MM, Deneris ES, Dymecki SM (2008) Redefining the serotonergic system by genetic lineage. *Nature neuroscience* 11:417-419.
- Katz PS, Frost WN (1996) Intrinsic neuromodulation: altering neuronal circuits from within. *TINS* 19:54-61.
- Kiehn O, Rostrup E, Møller M (1992) Monoaminergic systems in the brainstem and spinal cord of the turtle *Pseudemys scripta elegans* as revealed by antibodies against serotonin and tyrosine hydroxylase. *The Journal of comparative neurology* 325:527-547.
- Kiyasova V, Gaspar P (2011) Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. *The European journal of neuroscience* 34:1553-1562.
- Kuhn HG, Peterson DA (2008) Detection and Phenotypic Characterization of Adult Neurogenesis. En: *Adult Neurogenesis, 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Press, pp. 25-47., 2nd ed. (Gage FH, Kempermann G, Song H, eds), pp 25-47. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Li X, Murray K, Harvey PJ, Ballou EW, Bennett DJ (2007) Serotonin facilitates a persistent calcium current in motoneurons of rats with and without chronic spinal cord injury. *Journal of neurophysiology* 97:1236-1246.

- Lledo P-M, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews Neuroscience* 7:179-193.
- Marder E (2012) Neuromodulation of Neuronal Circuits: Back to the Future. *Neuron* 76:1-11.
- Marichal N, García G, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O, Russo RE (2009) Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in «standby mode»? *The Journal of neuroscience* 29:10010-10024.
- 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* 30:2020-2031.
- Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisén J (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS biology* 6:e182.
- Mladinic M, Muller KJ, Nicholls JG (2009) Central nervous system regeneration: from leech to opossum. *The Journal of physiology* 587:2775-2782.
- Murray KC, Nakae A, Stephens MJ, Rank M, Amico JD, Harvey PJ, Li X, Harris RLW, Ballou EW, Anelli R, Charles J (2010) Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Nat Med* 16:694-700.
- Nefzger CM, Haynes JM, Pouton CW (2011) Directed expression of Gata2, Mash1, and Foxa2 synergize to induce the serotonergic neuron phenotype during in vitro differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells* 29:928-939.
- Perrier J-F, Alaburda A, Hounsgaard J (2003) 5-HT<sub>1A</sub> receptors increase excitability of spinal motoneurons by inhibiting a TASK-1-like K<sup>+</sup> current in the adult turtle. *The Journal of physiology* 548:485-492.
- Perrier J-F, Cotel F (2008a) Serotonin differentially modulates the intrinsic properties of spinal motoneurons from the adult turtle. *The Journal of physiology* 586:1233-1238.
- Perrier J-F, Cotel F (2008b) Serotonin differentially modulates the intrinsic properties of spinal motoneurons from the adult turtle. *The Journal of physiology* 586:1233-1238.
- Perrier J-F, Hounsgaard J (2003) 5-HT<sub>2</sub> receptors promote plateau potentials in turtle spinal motoneurons by facilitating an L-type calcium current. *Journal of neurophysiology* 89:954-959.

- Perrier J-F, Rasmussen HB, Christensen RK, Petersen AV (2013) Modulation of the intrinsic properties of motoneurons by serotonin. *Current pharmaceutical design* 19:4371-4384.
- Petrik D, Lagace DC, Eisch A (2012) The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? *Neuropharmacology* 62:21-34.
- Reali C, Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O, Russo RE (2011) GABAergic signalling in a neurogenic niche of the turtle spinal cord. *The Journal of physiology* 589:5633-5647.
- Rehermann MI, Marichal N, Russo RE, Trujillo-Cenóz O (2009) Neural reconnection in the transected spinal cord of the freshwater turtle *Trachemys dorsalis*. *Journal of Comparative Neurology* 515:197-214].
- Rehermann MI, Santiñaque FF, López-Carro B, Russo RE, Trujillo-Cenóz O (2011) Cell proliferation and cytoarchitectural remodeling during spinal cord reconnection in the fresh-water turtle *Trachemys dorsalis*. *Cell and Tissue Research* 344:415-433.
- Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL (2000) Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiological reviews* 80:767-852.
- Ribotta MG, Provencher J, Feraboli-Lohnherr D, Rossignol S, Privat a, Orsal D (2000) Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level. *The Journal of neuroscience* 20:5144-5152.
- 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. *The Journal of physiology* 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. *The Journal of neuroscience* 28:3298-3309.
- Sanes DH, Reh TA, Harris WA (2006) DEVELOPMENT OF THE NERVOUS SYSTEM SECOND EDITION, second. Burlington: Elsevier Academic Press publications.
- Saunders NR, Kitchener P, Knott GW, Nicholls JG, Potter a, Smith TJ (1998) Development of walking, swimming and neuronal connections after complete spinal cord transection in the neonatal opossum, *Monodelphis domestica*. *The Journal of neuroscience* 18:339-355.
- Schotland JL, Grillner S (1993) Effects of serotonin on fictive locomotion coordinated by a neural network deprived of NMDA receptor-mediated cellular properties. *Exp Brain Res* 93:391-398.

- Smidt MP, van Hooft J a (2013) Subset specification of central serotonergic neurons. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:200.
- Spitzer NC (2012) Activity-dependent neurotransmitter respecification. *Nature reviews Neuroscience* 13:94-106 .
- Thomas Thach W (1999) Fundamentals of Motor Systems. En: *Fundamental Neuroscience, Primera ed.* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds), pp 855-861. San Diego: Academic Press.
- Tillakaratne NJK, Guu JJ, Leon RD De, Bigbee AJ, London NJL, Zhong H, Ziegler M, Joynes R, Roy RR, Edgerton VR (2010) Functional recovery of stepping in rats after a complete neonatal spinal cord transection is not due to regrowth across the lesion site. *166:1-22.*
- Toriyama M, Mizuno N, Fukami T, Iguchi T, Toriyama M, Tago K, Itoh H (2012) Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration. *Journal of Biological Chemistry* 287:12691-12702.
- Törk I (1990) Anatomy of the serotonergic system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 600:9-34; discussion 34-35.
- Veasey SC, Fornal C a, Metzler CW, Jacobs BL (1995) Response of serotonergic caudal raphe neurons in relation to specific motor activities in freely moving cats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:5346-5359.
- Wienecke J, Ren L-Q, Hultborn H, Chen M, Moller M, Zhang Y, Zhang M (2014) Spinal Cord Injury Enables Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Cells to Synthesize Monoamines. *Journal of Neuroscience* 34:11984-12000.