

Rol de la Cx43 en la génesis y propagación de ondas de Ca^{2+} en el epéndimo de la médula espinal

Vidal, Mateo¹ ; Benítez, Milagros¹ ; Falco, María Victoria¹ ;

Fabbiani, Gabriela¹ ; Prieto, Daniel¹ ; Trigo, Federico¹ ; Russo, Raúl E¹.

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



Introducción

El epéndimo de la médula espinal (ME) es un nicho latente de células madre, que responde a una lesión de la médula espinal (LME) reactivando su actividad mitótica y generando nuevas células que contribuyen a limitar el daño (**Fig.1 a,b**). La comunicación entre las células ependimarias (CEs) ocurre a través de conexiones -canales formados por conexinas- y es clave para la reactivación del nicho. En particular la Cx43 resulta relevante, ya que su eliminación reduce la proliferación y migración de células ependimarias luego de una LME (**Fig.1 a,b**). La respuesta del epéndimo puede ser inducida de forma similar con la aplicación de BzATP, un agonista de P2X7. La señalización a partir de estos receptores purinérgicos resulta indispensable para la respuesta de las CEs (**Fig.1 c,d**).

Hipotetizamos que la Cx43 regula la comunicación de señales de Ca^{2+} , generadas por activación de receptores P2X7, entre las CEs.

Antecedentes

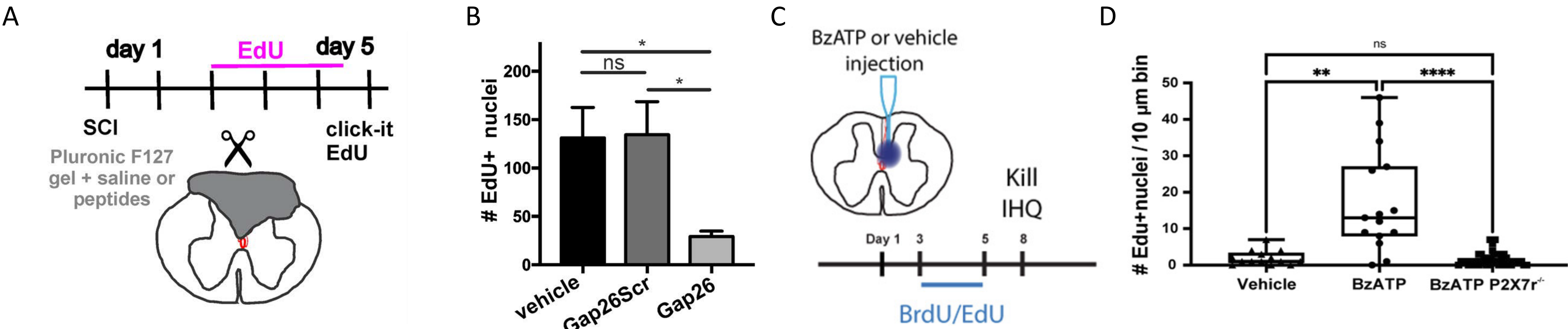


Figura 1. La señalización por receptores purinérgicos y conexinas (hemicanales y/o uniones gap) es necesaria para la respuesta del epéndimo a una lesión. **A.** Diseño experimental de ensayo de proliferación en respuesta a una LME. **B.** El número de núcleos EdU⁺ a los 5 días post lesión (DPI) disminuyó significativamente cuando el hidrogel contenía el bloqueador de hemicanales y uniones gap Gap26 a una concentración de 10 mM ($p < 0.05$). **C.** Diseño experimental de ensayo de proliferación en respuesta a inyección de BzATP. **D.** El número de núcleos EdU⁺ 8 días después de vehículo y BzATP fue significativamente diferente en ratones silvestres. Los ratones P2X7^{-/-} inyectados con BzATP generaron significativamente menos núcleos EdU⁺ que los ratones silvestres. No hubo diferencias significativas en las inyecciones de vehículo. Figuras adaptadas de Fabbiani et. al. 2020 doi: 10.1523/JNEUROSCI.2056-19.2020 (**A y B**) y Falco et. al. 2023 doi:10.3389/fncel.2023.1288676 (**C y D**).

Métodos Gráficos

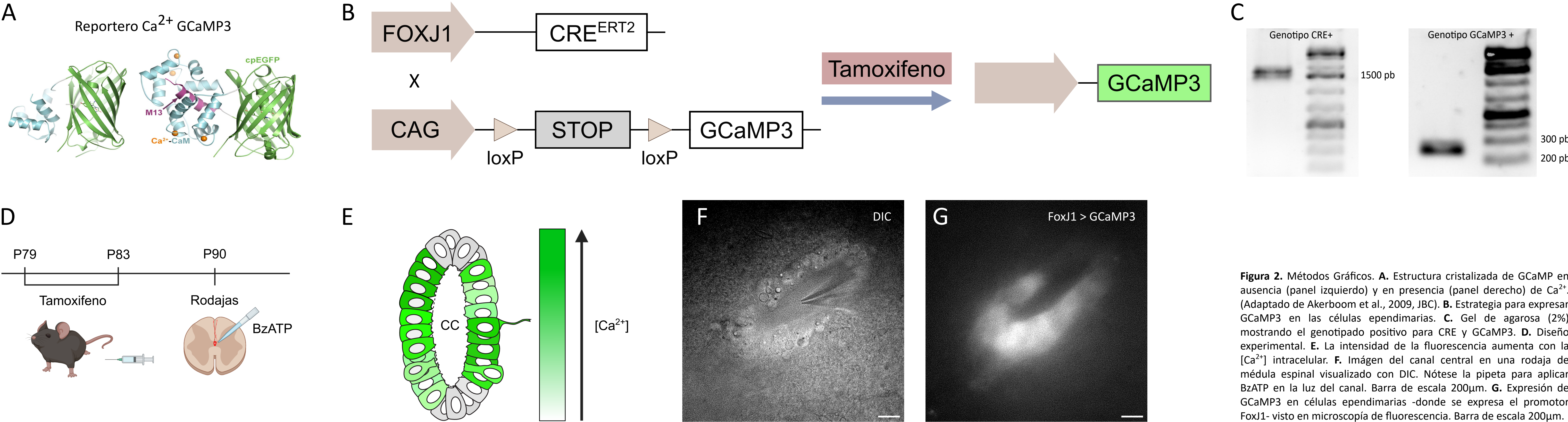


Figura 2. Métodos Gráficos. **A.** Estructura cristalizada de GCaMP3 en ausencia (panel izquierdo) y en presencia (panel derecho) de Ca^{2+} . (Adaptado de Akerboom et al., 2009, JBC). **B.** Estrategia para expresar GCaMP3 en las células ependimarias. **C.** Gel de agarosa (2%) mostrando el genotipado positivo para CRE y GCaMP3. **D.** Diseño experimental. **E.** La intensidad de la fluorescencia aumenta con la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular. **F.** Imagen del canal central en una rodaja de médula espinal visualizado con DIC. Nótese la pipeta para aplicar BzATP en la luz del canal. Barra de escala 200 μm . **G.** Expresión de GCaMP3 en células ependimarias -donde se expresa el promotor FoxJ1- visto en microscopía de fluorescencia. Barra de escala 200 μm .

Resultados

1. Propagación de la onda de Ca^{2+} apico-basal

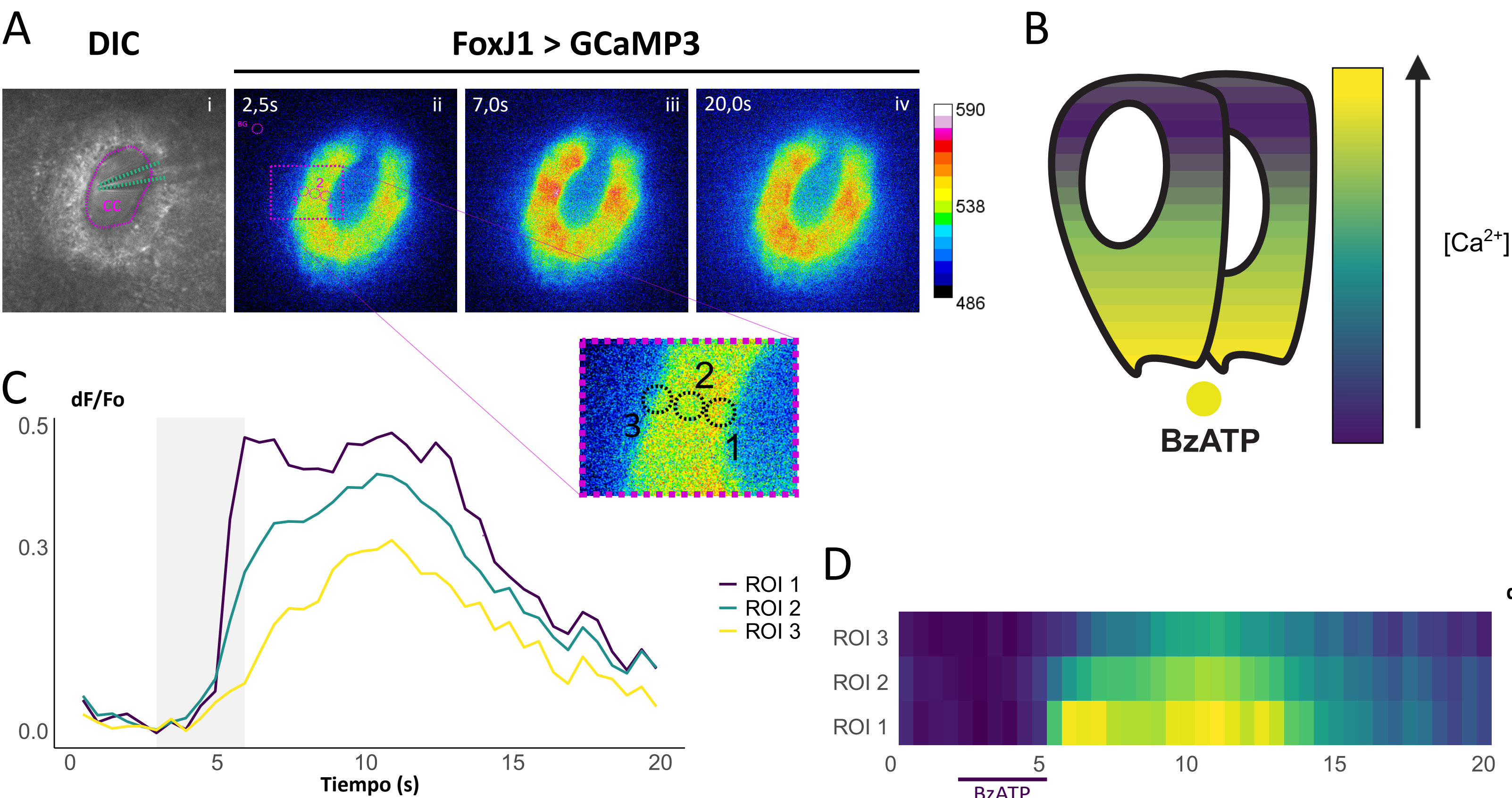


Figura 3. Propagación de la onda de Ca^{2+} apico-basal. **A.** (i) Imagen de DIC correspondiente a la pipeta en el canal central. (ii, iii, iv) Imágenes en pseudocolor de células FoxJ1 expresando GCaMP3 bajo protocolo de inyección de BzATP a distintos tiempos. Se referencian las regiones de interés (ROIs) analizadas. **B.** Representación esquemática de resultados. **C.** dF/Fo para cada roi en función de tiempo. En sombreado gris la duración del pulso de BzATP. **D.** Mapa de calor para cada roi en función de tiempo.

2. Propagación de la onda de Ca^{2+} dentro del epéndimo

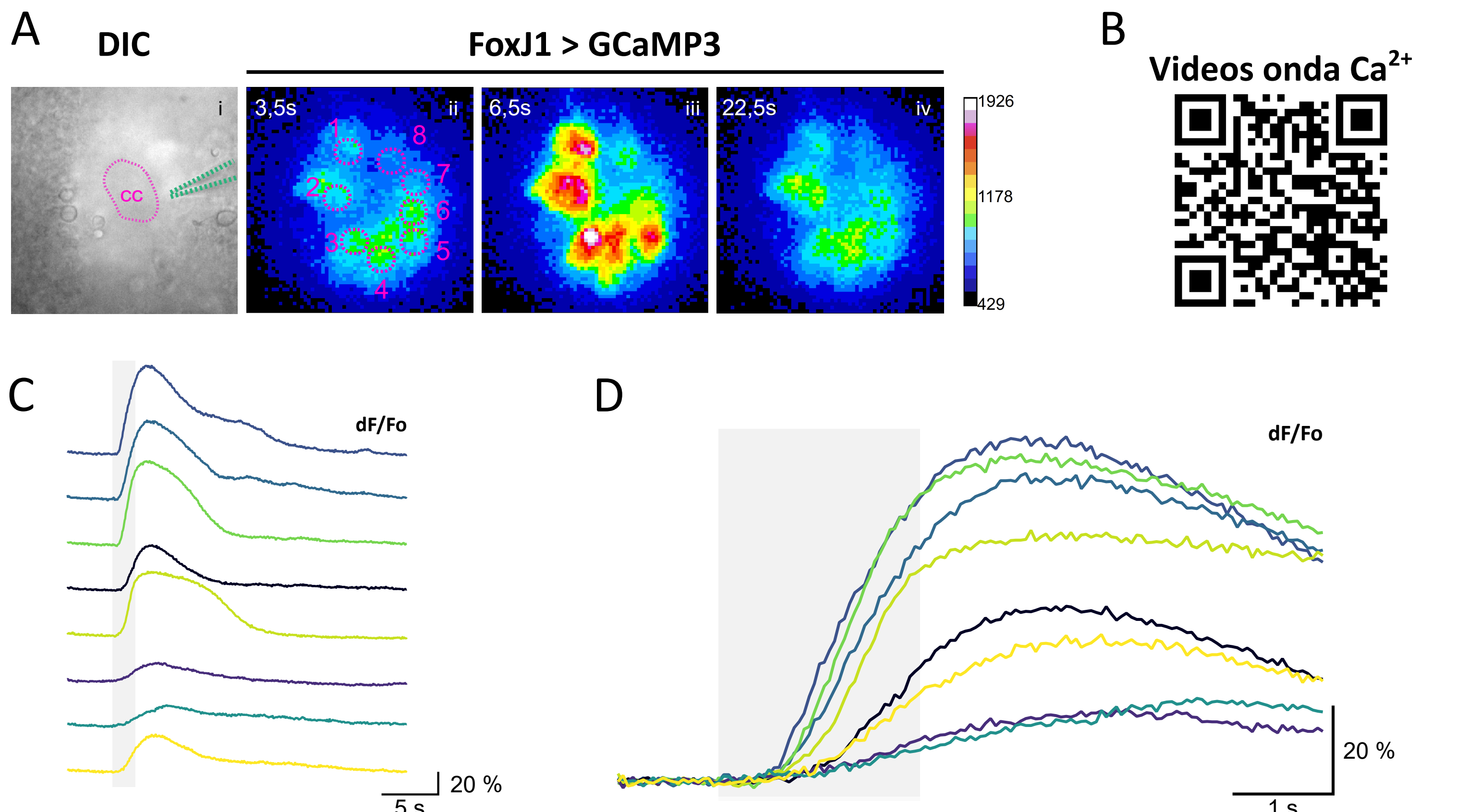


Figura 4. Propagación de la onda de Ca^{2+} dentro del epéndimo. **A.** (i) Imagen de DIC correspondiente a la pipeta en el canal central. (ii, iii, iv) Imágenes en pseudocolor de células FoxJ1 expresando GCaMP3 bajo protocolo de inyección de BzATP a distintos tiempos. Se referencian ROIs analizadas. **B.** Código QR para acceso a videos de dinámicas de Ca^{2+} . **C.** dF/Fo para cada roi en función de tiempo. En sombreado gris la duración del pulso de BzATP.

3. La propagación de la onda Ca^{2+} depende de conexiones

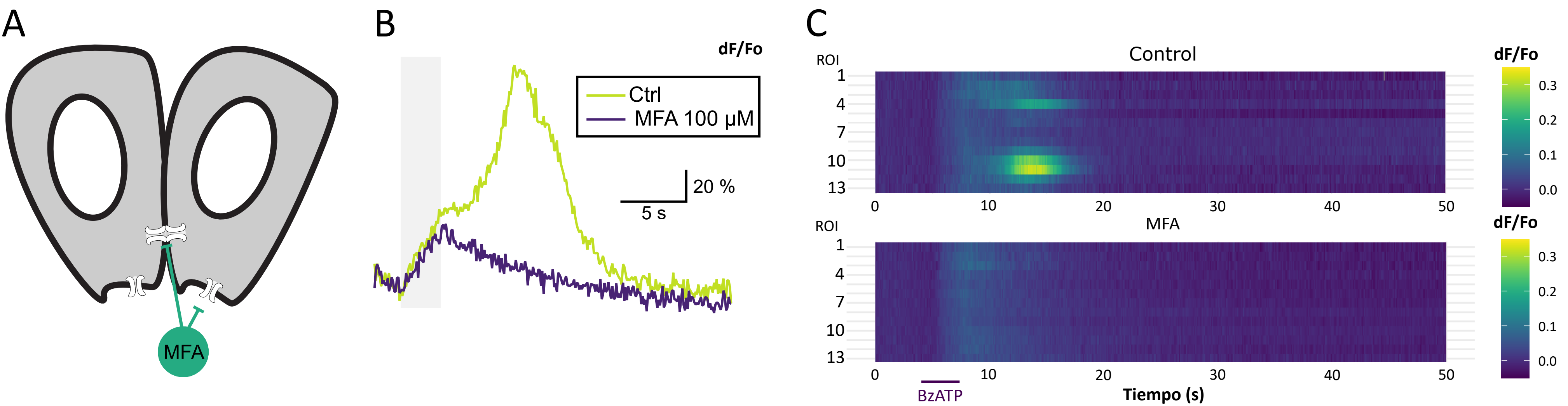


Figura 5. La dinámica de propagación de Ca^{2+} depende de conexiones. **A.** Representación esquemática de abordaje farmacológico. **B.** dF/Fo para cada tratamiento. En sombreado gris la duración del pulso de BzATP. **C.** Mapa de calor para cada roi en función de tiempo.

Hipótesis de trabajo

