

Introducción

Las lesiones en la médula espinal (ME) resultan un desafío en mamíferos debido a su limitada capacidad de reparación. En animales adultos, el epéndimo de la médula espinal es un nicho latente de células madre que se reactiva tras una lesión. Por el contrario, en ratones neonatos este nicho activo y las células ependimarias están acopladas por uniones de tipo "gap junction". En esta etapa las conexinas (Cx) 26 y 43 muestran alta expresión. En ratones adultos la expresión de Cx26 es casi nula, pero la de Cx43 se mantiene constante. Tras una lesión, aumentan el acople y la expresión de Cx26, posiblemente imitando lo que ocurre durante el desarrollo postnatal. (Fabbiani et al., 2020).

Objetivo

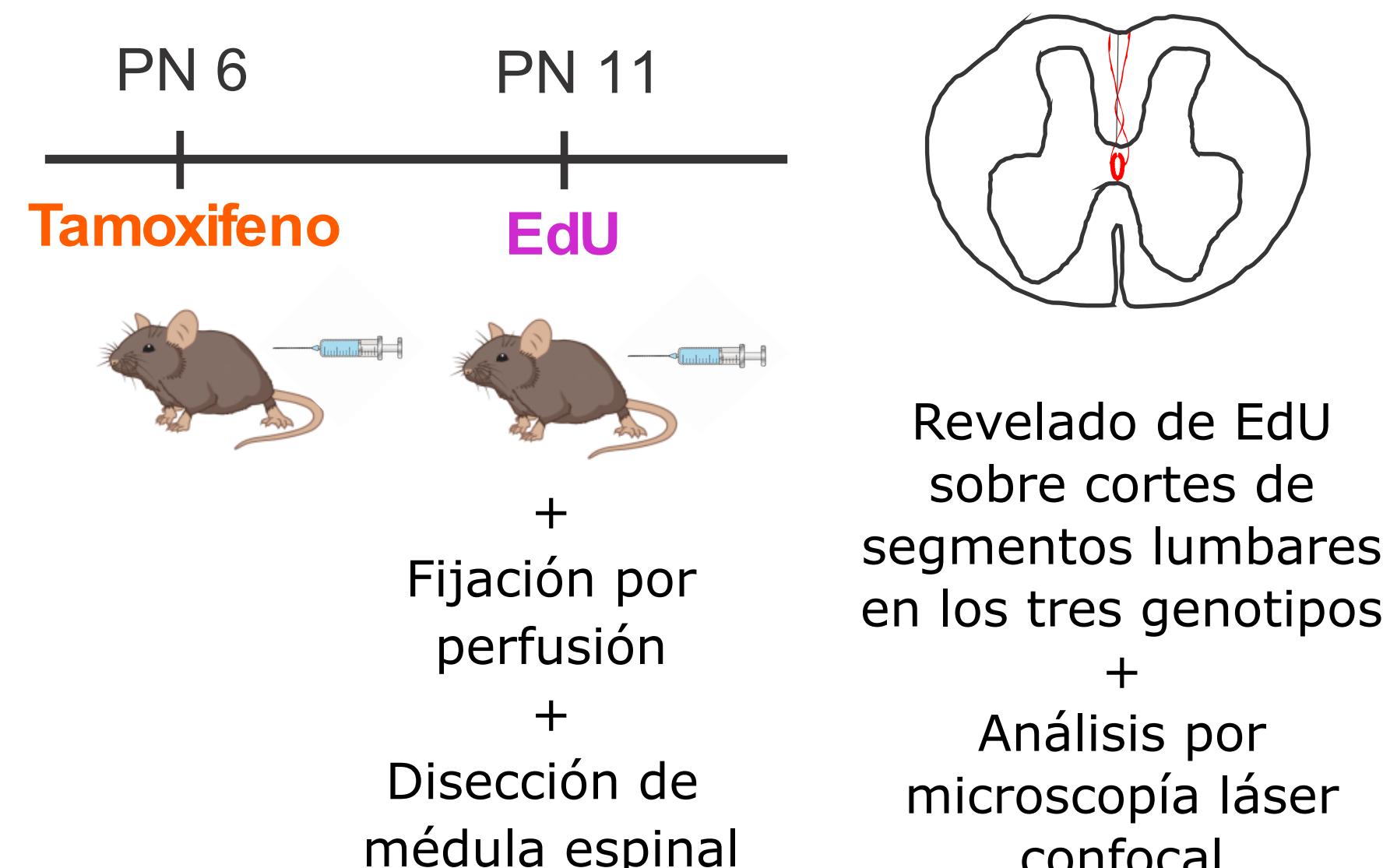
El objetivo de este trabajo es estudiar el rol de la Cx26 y la Cx43 en la proliferación de las células ependimarias y en el acople vía "gap junctions" durante el desarrollo postnatal temprano.

Conclusiones

Los resultados muestran que al eliminar la Cx43, la proliferación en los ECs es menor que en el control y en los ratones Cx26^{fl/fl}. En los ratones Cx43^{fl/fl} los clusters registrados tienen un volumen menor que en ratones control y Cx26^{fl/fl}. En los ratones Cx43^{fl/fl} los clusters registrados tienen un volumen menor que en ratones control y Cx26^{fl/fl}, mientras que la resistencia de entrada es 100 veces mayor. Estos datos sugieren que la Cx43 es la principal responsable del acople vía "gap junctions" pero ambas son necesarias para mantener el epéndimo como un nicho activo de células progenitoras.

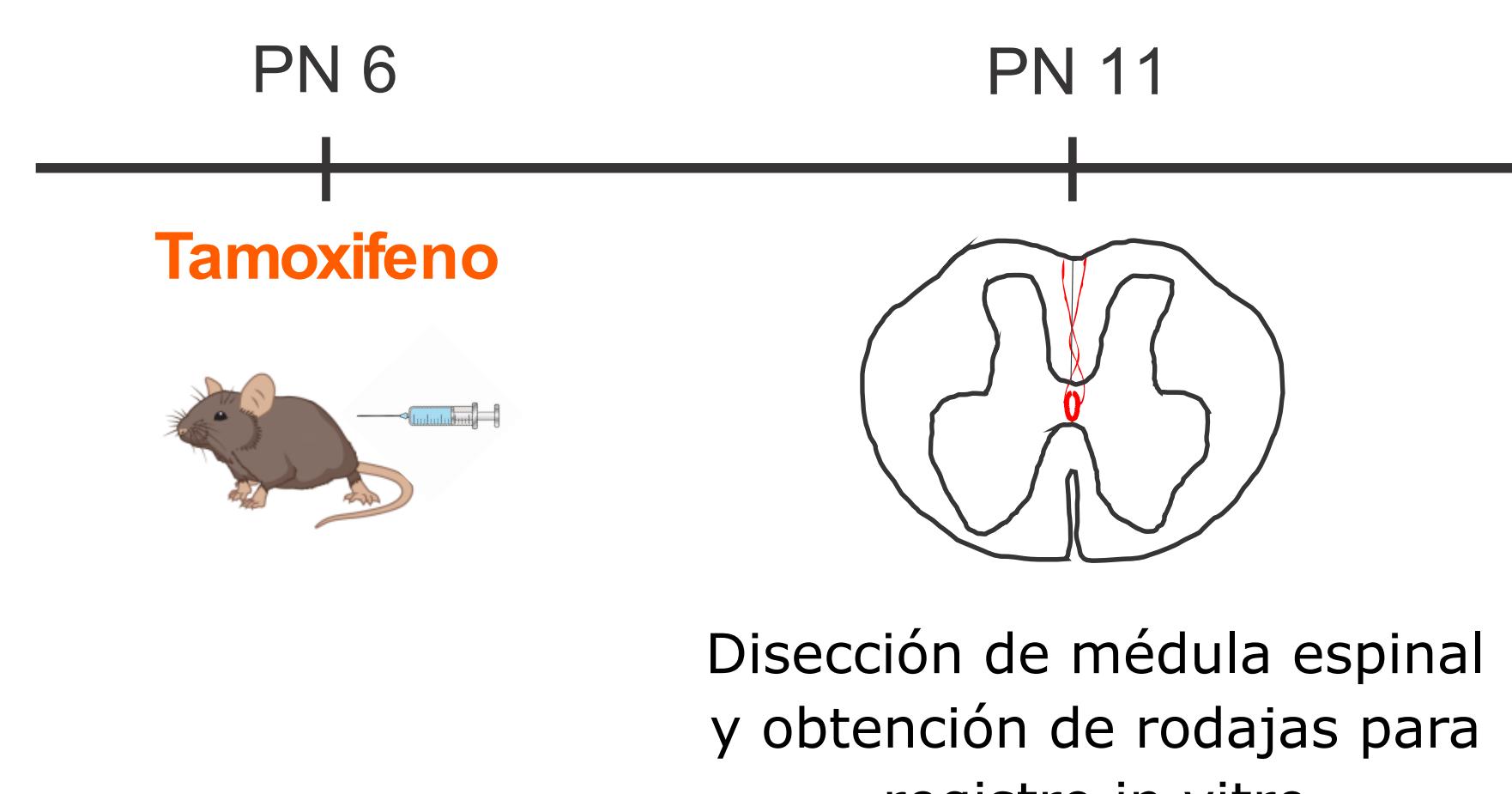
Estrategia experimental

Ensayo de proliferación de células ependimarias por captación de EdU en ratones control, Cx26^{fl/fl}, Cx43^{fl/fl}



Registro electrofisiológico de células ependimarias en rodajas de ME

Se utilizó la técnica de fijación de voltaje para caracterizar la respuesta de las células frente a pulsos en el rango de -60 a +50 mV y construimos curvas I/V. A partir de estos datos, extrajimos los valores de conductancia y resistencia de cada célula, y comparamos el acople para los tres genotipos. La solución de registro contenía biocitina, que utilizamos para visualizar las CE acopladas con microscopía confocal.



Resultados

La estrategia de eliminación selectiva de Cx26 o Cx43 en células ependimarias es eficaz

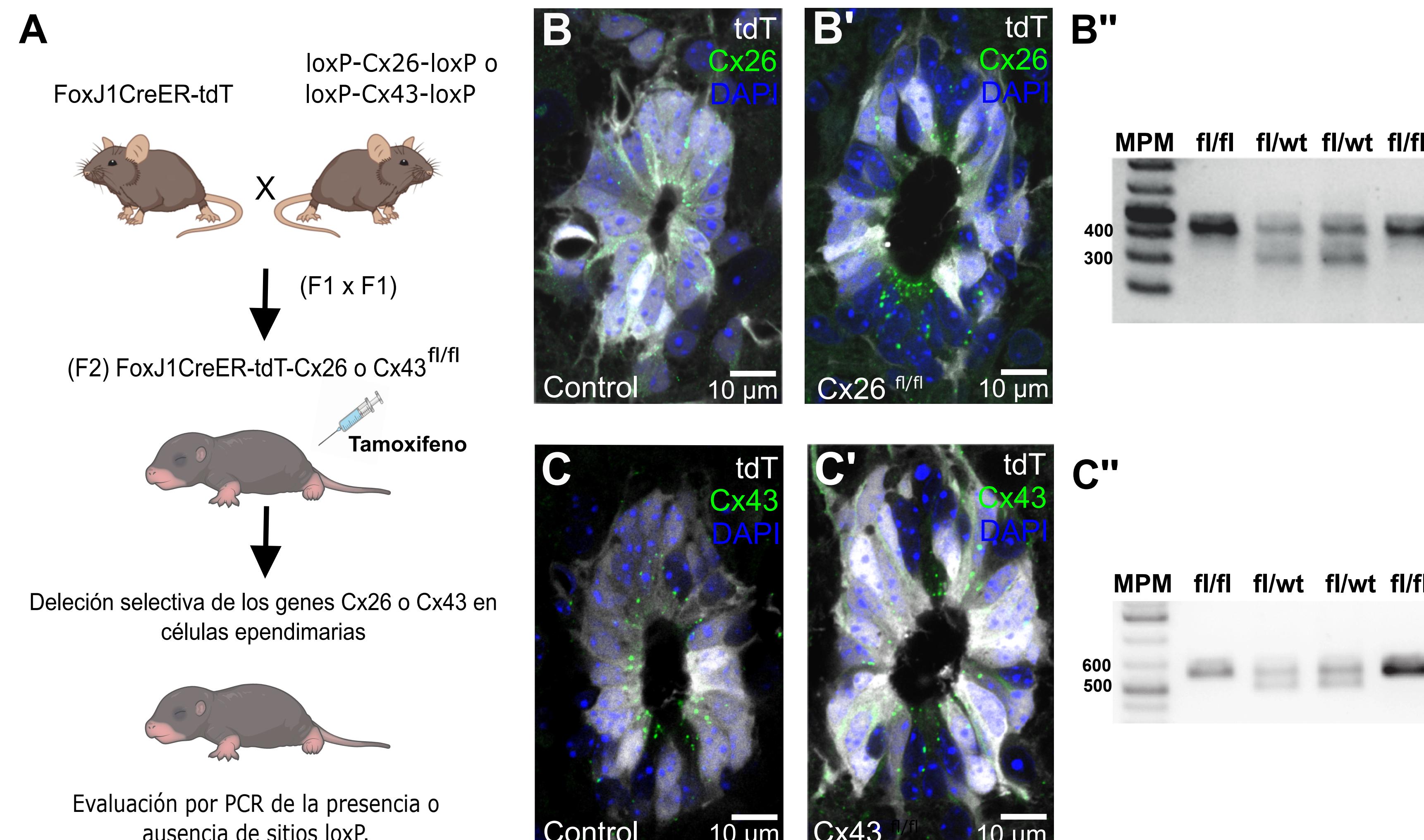


Figura 1. A. Estrategia de selección del gen Cx26 o Cx43 en células ependimarias por medio del uso del sistema CreER-loxP. B. Patrón de expresión de la Cx26 en células ependimarias del canal central de la médula espinal de ratones neonatos (P11). B'. Patrón de expresión de la Cx26 en células ependimarias del canal central de la médula espinal de ratones Cx26^{fl/fl} neonatos (P11). B''. Gel de agarosa 2% que muestra el genotipo de ratones heterocigotos (fl/wt) y homocigotos (fl/fl). La banda de 400pb representa la presencia de un sitio loxP en el gel, mientras que la de 300pb indica la ausencia del mismo. C. Patrón de expresión de la Cx43 en células ependimarias del canal central de ratones neonatos control (P11). C'. Patrón de expresión de la Cx43 en células ependimarias del canal central de ratones Cx43^{fl/fl} neonatos (P11). C''. Gel de agarosa 2% que muestra el genotipo de ratones heterocigotos (fl/wt) y homocigotos (fl/fl). La banda de 600pb representa la presencia de un sitio loxP en el gel, mientras que la de 500pb indica la ausencia del mismo.

La eliminación selectiva de Cx43 - pero no la de Cx26 - reduce la proliferación

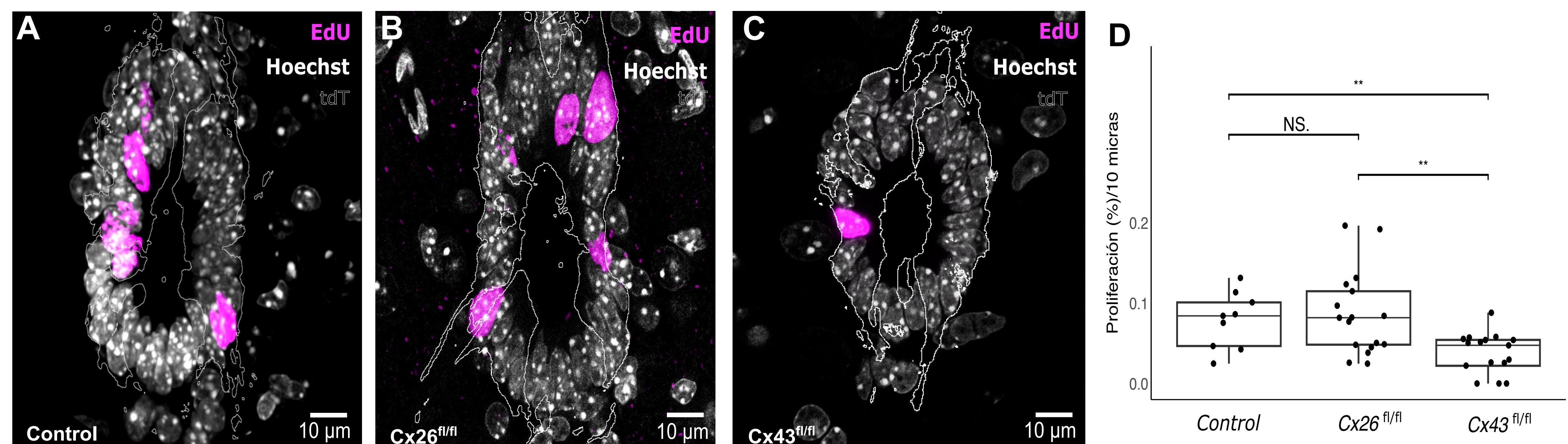


Figura 2. A-C. Proyecciones en Z representativas de la captación de EdU en células ependimarias del segmento lumbar de la médula espinal de ratones neonatos PN11 control, floxeados Cx26 y Cx43. D. Cuantificación del porcentaje de proliferación en los tres genotipos, en cortes que abarcan un volumen total de 100-120 micras a distintos niveles del segmento lumbar y con porcentajes de recombinación mayores al 75%. NS, No Significativo; p<0.01, Prueba de Student.

Las células ependimarias están acopladas por uniones gap

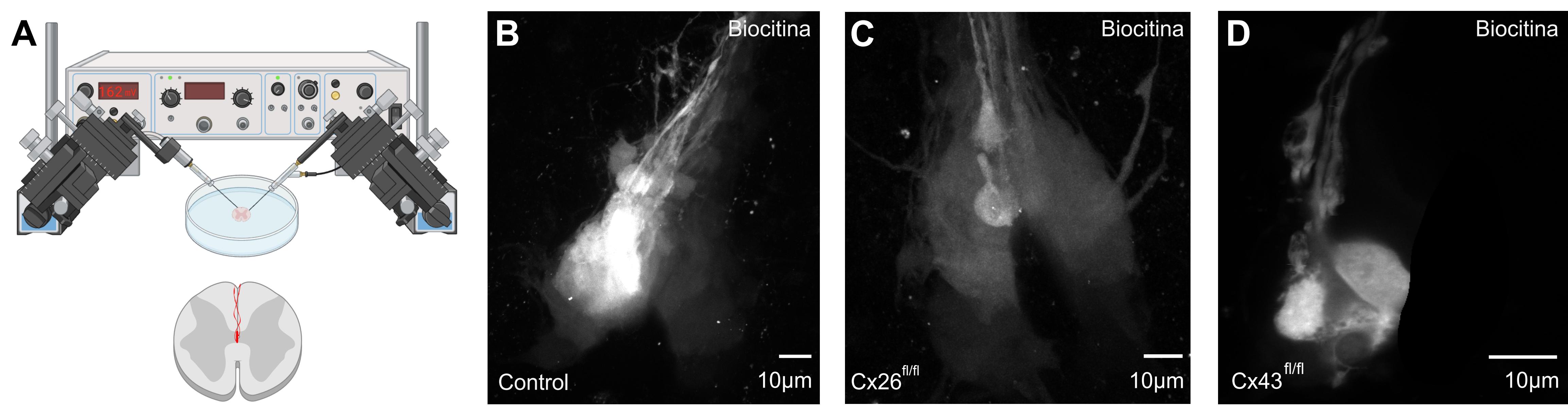


Figura 3. A. Representación esquemática de la técnica de registro electrofisiológico de las células ependimarias de ratón. B,C,D: Difusión de la Biocitina inyectada en una sola célula, revelada con estreptavidina-Alexa 488. En condiciones control y Cx26^{fl/fl} se revelaron grandes clusters que abarcaban los dominios dorsal y lateral del epéndimo. E. Representación esquemática de las regiones del canal central de la ME. F. Distribución de los clusters. La mayoría de los clusters registrados abarcaban los dominios lateral y dorsal. G. En ratones control y Cx26^{fl/fl} el volumen de los clusters es similar, mientras que en los ratones Cx43^{fl/fl} son más pequeños.

La resistencia de entrada aumenta al bloquear las Cx

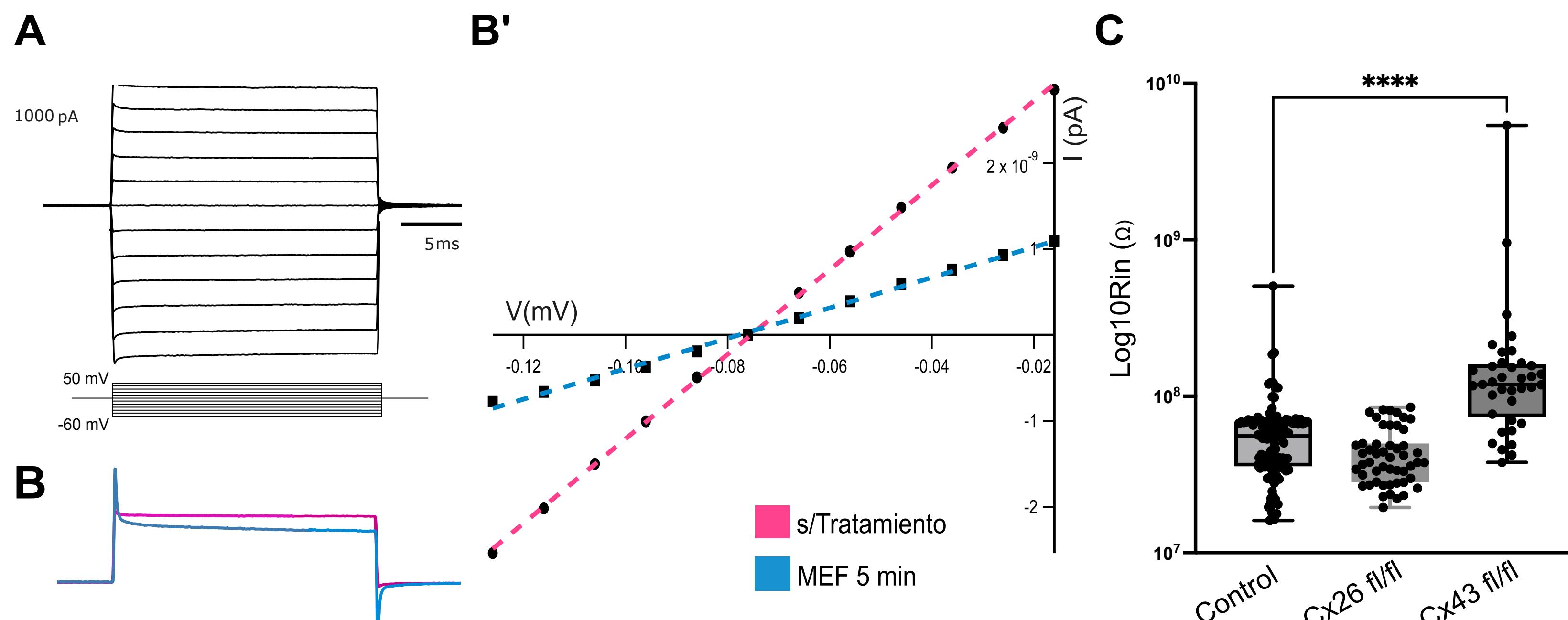


Figura 4. Caracterización de los ependimocitos. A. Corrientes inducidas por una serie de escalones de voltaje aplicados a un ependimocito del dominio dorsal del canal central en un ratón neonato. B. Registro crudo de una célula control en condiciones basales (rojo) y 5 minutos después de la aplicación de un bloqueante de uniones gap (Ácido meclofenámico, MEF) (azul). B'. Representación gráfica de la corriente en función de los cambios de voltaje antes (azul) y después del MEF (rojo). La curva I/V muestra una respuesta pasiva a los cambios del voltaje y una disminución de la conductancia (pendiente de la curva I/V) cuando se bloquean las uniones gap. C. La resistencia de entrada calculada es similar en los ratones control y Cx26^{fl/fl}. En ratones Cx43^{fl/fl} la resistencia calculada es mayor que en ratones control.